

# 商品植物油的稳定碳、氢同位素比值的测定

吴玉銮<sup>1</sup>, 董浩<sup>1</sup>, 王超<sup>2</sup>, 王莉<sup>1</sup>, 王斌<sup>1</sup>, 郭新东<sup>1</sup>, 洗燕萍<sup>1</sup>

(1. 广州质量监督检测研究院, 广州 511447) (2. 暨南大学理工学院, 广州 510000)

**摘要:** 建立了元素分析-同位素比率质谱联用技术(EA-IRMS)分析植物油样品的稳定碳、氢同位素比值的方法, 利用该方法测定了13份玉米油、20份大豆油、20份花生油以及15份植物调和油的 $\delta^2\text{H}$ 值和 $\delta^{13}\text{C}$ 值。结果发现: 三种植物油的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围分别为: 玉米油-30.475‰~-14.15‰、大豆油-30.11‰~-25.103‰及花生油-29.775‰~-24.44‰, 三种植物油的 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在显著性差异( $p<0.01$ )。剔除部分可能掺假样品后得到玉米油、大豆油和花生油的 $\delta^2\text{H}$ 值范围分别为-277.431‰~-261.493‰、-262.658‰~-232.687‰和-290.164‰~-231.233‰,  $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为-16.606‰~-14.15‰、-25.98‰~-25.103‰和-29.775‰~-26.032‰, 无论是 $\delta^2\text{H}$ 值还是 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 三种植物油样品之间都具有显著性差异( $p<0.01$ )。此外, 植物调和油的 $\delta^2\text{H}$ 值分布较广, 在-260.033‰~-220.234‰之间。通过植物调和油与三种植物油的碳、氢同位素比值的二维分布对比, 可以更为全面的评价和鉴别市售植物油的掺杂掺假情况, 为市售植物油的掺假鉴别提供了一定的研究基础和技术支持。

**关键词:** 同位素比率质谱; 商品植物油; 碳同位素比值; 氢同位素比值; 掺杂; 鉴别

文章编号: 1673-9078(2016)8-323-327

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.048

## Determination of Stable Carbon and Hydrogen Isotope Ratios of Commercial Vegetable Oils

WU Yu-luan<sup>1</sup>, DONG Hao<sup>1</sup>, WANG Chao<sup>2</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, GUO Xin-dong<sup>1</sup>, XIAN Yan-ping<sup>1</sup>

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

(2. College of Science and Technology, Ji'nan University, Guangzhou 510000, China)

**Abstract:** A method using element analyzer-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS) was established to analyze the stable hydrogen and carbon isotope ratios ( $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ , respectively) of 13 corn oil, 20 soybean oil, 20 peanut oil, and 15 blend oil samples. The results showed that  $\delta^{13}\text{C}$  values of corn oil, soybean oil, and peanut oil samples were -30.475‰ to -14.15‰, -30.11‰ to -25.103‰, and -29.775‰ to -24.44‰, respectively. The  $\delta^{13}\text{C}$  values were significantly different among samples of the three kinds of vegetable oils ( $p<0.01$ ). After eliminating possible adulterated samples, the  $\delta^2\text{H}$  values of the corn oil, soybean oil, and peanut oil samples were -277.431‰ to -261.493‰, -262.658‰ to -232.687‰, and -290.164‰ to -231.233‰, respectively. The  $\delta^{13}\text{C}$  values of the corn oil, soybean oil, and peanut oil samples were -16.606‰ to -14.15‰, -25.98‰ to -25.103‰, and -29.775‰ to -26.032‰, respectively. Significant differences were observed in the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values among samples of the three kinds of vegetable oils ( $p<0.01$ ). In addition, blend oil displayed a wide distribution of  $\delta^2\text{H}$  values ranging between -260.033‰ and -220.234‰. Comparison of the two-dimensional distribution of carbon and hydrogen isotope ratios of blend oil with those of the other three kinds of vegetable oils can contribute towards comprehensively evaluating and identifying adulterated commercial vegetable oil samples and can provide a foundation for research and technical support for determining adulteration in commercial vegetable oils.

**Key words:** isotope ratio mass spectrometry; commercial vegetable oil; carbon isotope ratio; hydrogen isotope ratio; adulteration; identification

食用油脂作为人类机体代谢过程中不可或缺的成分, 对人们的身体健康有着极其重要的作用<sup>[1]</sup>。目前最为常见的食用植物油主要有大豆油、花生油、玉米油、芝麻油和菜籽油等。这些食用植物油含有较多的

收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 广州市对外科技合作项目(2014J4500020)

作者简介: 吴玉銮, 女, 教授级高工, 研究方向: 食品安全检测研究

通讯作者: 洗燕萍, 女, 教授级高工, 研究方向: 食品安全检测研究

不饱和脂肪酸, 如亚油酸和亚麻酸等, 易于被人体吸收和利用, 因此也最受大众的喜爱。然而食用植物油因为品种、纯度以及营养价值的不同而在价格上存在较大的差异性, 从而导致一些不法厂家和经销商在高价食用植物油中掺入低价油或者直接把低价油当高价油销售, 从中牟取暴利, 不仅欺骗了消费者的知情权, 而且影响人们的身体健康<sup>[2-4]</sup>。为了维护诚信生产者的利益, 保护消费者的健康不受侵害, 建立简单、快速、

准确及有效的植物油掺假鉴别方法显得尤为迫切。

我国在鉴别食用植物油掺杂的研究中已逐渐形成一些现代检测方法,如比色法、电子鼻法、气相色谱法(GC)<sup>[5]</sup>、红外光谱法(FT-IR)<sup>[6]</sup>和核磁共振法等。国外也开展过食用植物油掺假鉴别的研究,如Gozde<sup>[7]</sup>等就曾利用中红外光谱(mid-infrared spectroscopy)结合化学计量学的方法鉴别橄榄油的掺假问题,并取得了很好的结果。Stewart<sup>[8]</sup>等则采用近红外光谱技术对动物饲料用油的掺假现象进行了鉴别研究,结果表明利用拉曼光谱技术和近红外光谱法可以快速鉴别食品工业用油的掺假。Gema<sup>[9]</sup>等采用固相微萃取-多维气相色谱法对橄榄油的掺杂掺假进行了鉴别,他们利用该方法对21种不同产地、不同品种及不同比例的橄榄油和榛树油的混合物进行了评价,结果发现该技术可以应用于掺假橄榄油的快速筛查和鉴别。植物油掺假鉴别方法的研究还有其他色谱、质谱方法等<sup>[10,11]</sup>。而利用稳定同位素质谱技术鉴别食用植物油的掺杂掺假在我国甚至在外国都还处于起步阶段。

稳定同位素质谱(IRMS)作为有效的鉴别技术经过近四十年年的发展,已被逐渐的应用于食品掺假鉴别和产地溯源研究。如近年来IRMS技术在肉类、粮食、蔬菜、水果和饮料等食品的掺假鉴别和产地溯源中都取得了很好的研究成果<sup>[12,13]</sup>。本研究采用稳定同位素质谱技术对市售的68种花生油、玉米油、大豆油以及调和油的稳定碳和氢同位素比值进行了测定,通过对比,分析了三种植物油掺假状况,并考察了调和油与三种植物油的碳、氢同位素比值的二维分布,为植物油及调和油的掺假鉴别提供了一定的研究基础和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和样品

配置自动进样器的元素分析仪(Flash 2000 EA)、同位素质谱仪(DELTA V PLUS IRMS),EA-IRMS用于测定植物油样品的 $\delta^2\text{H}$ 值和 $\delta^{13}\text{C}$ 值,EA和IRMS均购置于美国Thermo Fisher公司。锡杯(3 mm×2 mm×5 mm,购于Element Microanalysis公司),用于 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定;银杯(3 mm×2 mm×5 mm,购于Element Microanalysis公司),用于 $\delta^2\text{H}$ 值的测定。MS 3 Digital型漩涡振荡器(德国IKA公司),用于样品同位素比值测定前的均匀性处理。

玉米油13份( $n=13$ )、大豆油20份( $n=20$ )、花生油20份( $n=20$ )及植物调和油15份( $n=15$ ),所有植物油样品均购于广州大型超市。

### 1.2 样品处理

样品在测定前均涡旋1 min,以保证样品的均匀性。对于 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定,用枪头蘸取适量涡旋后的样品于锡杯底部,密封备用。而对于 $\delta^2\text{H}$ 值的测定,则取适量样品移至银杯底部,密封备用。

### 1.3 仪器条件

EA-IRMS测定 $\delta^{13}\text{C}$ 值的条件:燃烧反应温度为950℃,柱箱温度为50℃,载气(氦气)流速为120 mL/min,每个样品平行测定3次并取平均值作为最后的结果。EA-IRMS测定 $\delta^2\text{H}$ 值的条件:氧化反应管的温度为1420℃,柱箱温度为50℃,氦气流速为120 mL/min,同 $\delta^{13}\text{C}$ 值一样,每个样品也是平行测定3次并取平均值作为最后的结果。

### 1.4 数据分析

数据均采用SPSS(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行分析,数据结果采用均值±标准差的形式表示,并用Origin软件进行图表绘制。采用Duncan's least significant test进行显著性分析, $p<0.01$ 表示显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三种市售植物油样品的稳定碳、氢同位素比值分析

应用稳定同位素质谱仪对玉米油、大豆油和花生油进行了稳定碳、氢同位素比值的测定,结果列于表1。从表1可以看出,三种植物油的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为:玉米油-18.782‰、大豆油-26.162‰和花生油-27.383‰,三者之间具有显著性差异( $p<0.01$ )。对于 $\delta^2\text{H}$ 值,玉米油、大豆油和花生油的结果分别为-267.938‰、-252.482‰和-269.707‰,大豆油和玉米油、大豆油和花生油之间具有显著性差异( $p<0.01$ )。研究表明,植物中的碳同位素组成不仅和植物的光合碳代谢途径有关,而且还受外界环境的影响,也就是说植物中的碳同位素组成是植物的光合代谢途径和外界环境共同作用的。根据植物固定 $\text{CO}_2$ 的方式可将其分为C-3、C-4和CAM植物,不同种类植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值有很大差异。C-3和C-4植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别在-34‰~-22‰和-20‰~-10‰之间,而CAM植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围较宽,处于-38‰~-13‰,介于C-3植物与C-4植物之间。对于外界环境因子,植物碳同位素组成一般有气候环境因素,如温度、降水、压力、光照、

大气压及大气中 CO<sub>2</sub> 的碳同位素组成等<sup>[13]</sup>。植物经压榨后形成植物油，这一过程属于物理变化过程，因此同位素组成本身并没有发生变化，因此，植物油的 δ<sup>13</sup>C 值一般是和压榨植物的 δ<sup>13</sup>C 值相近的。对于玉米油而言，其来源植物是一种 C-4 植物，因此其 δ<sup>13</sup>C 值 (-18.782‰) 是介于 -20‰~-10‰ 之间的。大豆和花生均为 C-3 植物，其 δ<sup>13</sup>C 值也基本符合 C-3 植物的范围。氢元素为水的一部分，主要有 <sup>1</sup>H、<sup>2</sup>H 和 <sup>3</sup>H 三种稳定同位素。在水循环中，水中稳定性同位素组成主要受

物理条件如雨水的凝结、蒸发等变化而引起同位素的分馏，进而在稳定性氢和氧同位素比值上产生规律性的变化。一般来说，自然界水中的氢同位素比值具有明显的纬度、陆地效应、季节甚至高程效应，如 δ<sup>2</sup>H 值是随着纬度的增加而不断减小；从海岸向内陆方向则呈现递减趋势；而随着气温的变低，重元素的含量也不断变低；对于海拔，则是呈现海拔高度增加，δ<sup>2</sup>H 值减小的规律<sup>[13]</sup>。

表 1 不同类型植物油的稳定碳、氢同位素比值分布

Table 1 Stable carbon and hydrogen isotope ratios of different kinds of vegetable oils

种类	玉米油 (n=13)	大豆油 (n=20)	花生油 (n=20)
δ <sup>13</sup> C 范围/‰	-30.475‰~-14.15‰	-30.11‰~-25.103‰	-29.775‰~-24.44‰
δ <sup>13</sup> C 均值/‰	-18.782±3.176 <sup>a</sup>	-26.162±1.151 <sup>b</sup>	-27.383±0.832 <sup>c</sup>
δ <sup>2</sup> H 范围/‰	-278.618‰~-246.332‰	-262.658‰~-232.687‰	-292.966‰~-231.233‰
δ <sup>2</sup> H 均值/‰	-267.938±5.675 <sup>a</sup>	-252.482±4.181 <sup>b</sup>	-269.707±12.670 <sup>a</sup>

注：每个样品均测定了三次并剔除特殊数据后取平均值 (n=3)。表格中的数据均以同一类型所有样品 (玉米油、大豆油和花生油分别为 13、20 和 20) 的平均值±SD 的形式表示，表格中同一行的不同小写字母表示两者之间具有显著性差异 (p<0.01)。

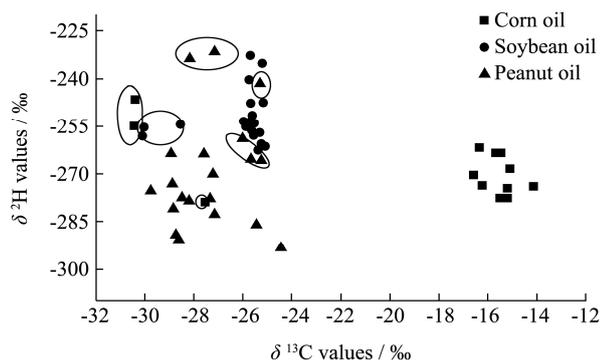


图 1 玉米油、花生油和大豆油的碳、氢同位素比值二维分布

Fig.1 Two-dimensional distribution of carbon and hydrogen isotope ratios of corn oil, soybean oil, and peanut oil

将三种植物油样品的碳、氢同位素比值绘成二维分布图 (图 1) 以观察三种植物油的关系以及掺杂情况。从图 1 中可以看出，三种植物油大体是具有区域性分布的。但是可以明显看出有个别植物油样品是有一定问题的，对于玉米油来说，大部分样品是符合规律的，但有三个样品是明显掺杂掺假的，这三个样品的 δ<sup>13</sup>C 值分别为 -30.425‰、-30.475‰和 -27.588‰，

单从 δ<sup>13</sup>C 值这一指标就可以明显判定该三种玉米油是掺杂了 C-3 植物油的掺假样品。对于大豆油和花生油，也有部分样品存在掺杂掺假嫌疑 (图 1 中圈内样品)。如大豆油，大部分样品的 δ<sup>13</sup>C 值均分布在 -25.980‰到 -25.103‰ 之间，而有三个样品其 δ<sup>13</sup>C 值分别为 -30.055‰、-28.526‰和 -30.110‰，偏离 -25.980‰~-25.103‰ 区间较远，因此存在掺假嫌疑；对于花生油，大部分的样品其 δ<sup>2</sup>H 值均在 -292.966‰~-263.346‰ 之间，因此部分 δ<sup>2</sup>H 值为 -241.268‰、-233.494‰和 -231.233‰ 的样品则可能存在掺杂掺假的嫌疑。通过以上的分析可以看出，通过测定植物油样品的稳定碳、氢同位素比值，利用不同植物油样品的碳、氢同位素比值二维分布，可以对植物油样品的掺杂掺假情况进行初步的鉴别。相比于其他色谱和质谱方法，具有快速和便捷的优点。

## 2.2 剔除可能掺伪样品后的稳定碳、氢同位素比值分析

表 2 剔除可能掺假样品后不同类型植物油的稳定碳、氢同位素比值

Table 2 Stable carbon and hydrogen isotope ratios of different kinds of vegetable oils exclusive of possible adulterated samples

种类	玉米油 (n=10)	大豆油 (n=17)	花生油 (n=17)
δ <sup>13</sup> C 范围/‰	-16.606‰~-14.15‰	-25.98‰~-25.103‰	-29.775‰~-26.032‰
δ <sup>13</sup> C 均值/‰	-15.568±0.626 <sup>a</sup>	-25.562±0.264 <sup>b</sup>	-27.469±0.573 <sup>c</sup>
δ <sup>2</sup> H 范围/‰	-277.431‰~-261.493‰	-262.658‰~-232.687‰	-290.164‰~-231.233‰
δ <sup>2</sup> H 均值/‰	-267.938±3.911 <sup>a</sup>	-252.482±3.282 <sup>b</sup>	-269.707±7.322 <sup>c</sup>

注：每个样品均测定了三次并剔除特殊数据后取平均值 (n=3)。表格中的数据均以同一类型所有样品 (玉米油、大豆油和花生

油分别为 10、17 和 17) 的平均值 $\pm$ SD 的形式表示, 表格中同一行的不同小写字母表示两者之间具有显著性差异 ( $p<0.01$ )。

通过 2.1 的分析后, 将其中可能掺杂掺伪植物油样品剔除后对所有样品进行了重新统计分析, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 对于  $\delta^{13}\text{C}$  值和  $\delta^2\text{H}$  值, 三种植物油之间均具有显著性差异 ( $p<0.01$ )。其中玉米油、大豆油和花生油的  $\delta^{13}\text{C}$  值分别在  $-16.606\text{‰}$ ~ $14.150\text{‰}$ 、 $-25.980\text{‰}$ ~ $-25.103\text{‰}$ 和 $-29.775\text{‰}$ ~ $26.032\text{‰}$ 之间, 三者平均值分别为 $-15.568\text{‰}$ 、 $-25.562\text{‰}$ 和 $-27.469\text{‰}$ 。而三者的  $\delta^2\text{H}$  值则分别为 $-267.938\text{‰}$ 、 $-252.482\text{‰}$ 和 $-269.707\text{‰}$ 。从优化后的样品数据可以明显的区分三种植物油样品, 因此对于三者之间的掺杂掺假现象能够快速准确鉴别。此外, 对于掺杂其他种类植物油的样品, 则可以通过植物油的碳、氢同位素比值二位分布进行区分鉴别。

### 2.3 植物调和油与其他三种植物油碳、氢同位素比值二维分布对比

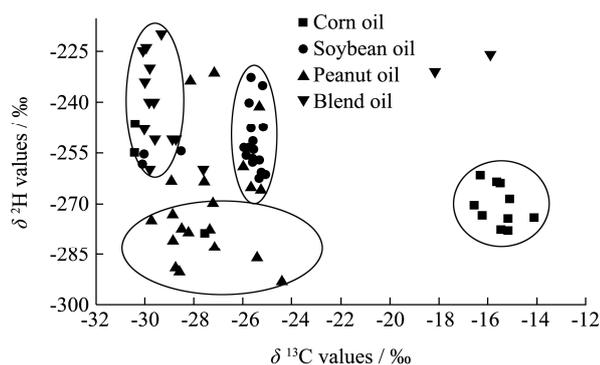


图2 调和油与花生油、玉米油及大豆油的碳、氢同位素比值二维分布对比

**Fig.2 Comparison of the two dimensional distribution of carbon and hydrogen isotope ratios of blend oil with those of corn oil, soybean oil and peanut oil**

本研究还对 15 份植物调和油样品进行了碳、氢同位素比值的测定, 将植物调和油的碳氢同位素比值的二维分布与其他三种植物油进行比较, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 15 份调和植物油样品中, 有两份的  $\delta^{13}\text{C}$  值分别为 $-15.940\text{‰}$ 和 $-18.164\text{‰}$ , 介于 $-20\text{‰}$ ~ $10\text{‰}$ 之间, 因此可以断定这两份调和植物油样品以 C-4 植物油为主。其他样品的  $\delta^{13}\text{C}$  值都在  $34\text{‰}$ ~ $22\text{‰}$ 之间, 因此以 C-3 植物油为主。从图 2 中还可以发现一个规律, 植物调和油的  $\delta^2\text{H}$  值分布较广, 在 $-260.033\text{‰}$ ~ $-220.234\text{‰}$ 之间, 跨度为近 40‰, 而这与大豆油的  $\delta^2\text{H}$  值规律较吻合, 大豆植物油的  $\delta^2\text{H}$  值分布也很广, 在 $-262.658\text{‰}$ ~ $-232.687\text{‰}$ 之间, 跨度为近 30‰。这可能是由于大豆油相比于其他几种植物油较

为便宜, 因此市售的植物调和油可能大多以大豆油为主要混合油, 再辅以较小比例的其他种类植物油。通过植物调和油与三种植物油的碳、氢同位素比值的二维分布对比, 可以更为全面的评价和鉴别市售植物油的掺杂掺假情况, 为市售植物油的掺假鉴别提供了一定的研究基础和技术支持。

### 3 结论

本文建立了元素分析-同位素比率质谱联用技术分析商品植物油样品的碳、氢同位素比值的方法并应用于植物油的掺假掺杂鉴别。通过研究结果可以发现, 利用稳定碳和氢同位素比值的差异性可以很好的鉴别掺杂掺假植物油样品, 而建立花生油、玉米油、大豆油以及调和油的碳、氢同位素比值的二维分布后, 可以更为全面的评价和鉴别四种植物油的掺杂掺假情况以及调和油的组成情况, 为市售植物油的掺假鉴别提供了一定的技术支持。受限于样本量、产地和环境等因素, 本研究的结果仅能作为参考。但可以肯定的是通过大批量不同产地、不同品种植物油样品的同位素比值分析对于植物油真实性数据库的构建是非常有必要的。

### 参考文献

- [1] ZHAO Xin, MA Fei, LI Pei-wu, et al. Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2015, 176: 465-471
- [2] 郭莲仙,梁福睿,梁一,等.基于稳定碳同位素示踪技术的商品植物油掺杂鉴别研究[J].现代食品科技,2014,30(5): 292-296  
GUO Lian-xian, LIANG Fu-rui, LIANG Yi. Discrimination of the adulteration of commercial vegetable oils by stable carbon isotope analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 292-296
- [3] Raluca Popescu, Diana Costinel, Oana Romina Dinca, et al. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics [J]. Food Control, 2015, 48: 84-90
- [4] Zhang Qing, Liu Cheng, Sun Zhijian, et al. Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by fourier transform infrared spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1607-1613
- [5] 王江蓉,周建平,刘荣,等.毛细管气相色谱法测定植物油脂肪酸组成初探[J].现代食品科技,2007,23(9):84-87  
WANG Jiang-rong, ZHOU Jian-ping, LIU Rong, et al.

- Preliminary research on the measurement of fatty acid composition of the vegetable oil by capillary column chromatography [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(9): 84-87
- [6] 许洪勇,成莲,王东峰,等.傅立叶变换红外光谱法鉴别地沟油的研究[J].*现代食品科技*,2012,28(6):707-708  
XU Hong-yong, CHENG Lian, WANG Dong-feng, et al. Identification of recycled cooking oil by FT-IR [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(6): 707-708
- [7] Gozde Gurdeniz, Banu Ozen. Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(2): 519-525
- [8] Stewart Francis Graham, Simon Anthony Haughey, Robert Marc Ervin, et al. The application of near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy to detect adulteration of oil used in animal feed production [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(3): 1614-1619
- [9] Gema Flores, Maria Luisa Ruiz del Castillo, Gracia Patricia Blanch, et al. Detection of the adulteration of olive oils by solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2006, 97(2): 336-342
- [10] Giovana A Bataglion, Felipe M A da Silva, Jandyson M. Santos, et al. Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques [J]. *Food Research International*, 2014, 64: 472-481
- [11] Lukas Vaclavik, Beverly Belkova, Zuzana Reblova, et al. Rapid monitoring of heat-accelerated reactions in vegetable oils using direct analysis in real time ionization coupled with high resolution mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(4): 2312-2320
- [12] Zhao Yan, Zhang Bin, Chen Gang, et al. Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(7): 300-305
- [13] 郭波莉,魏益民,潘家荣.同位素指纹分析技术在食品产地溯源中的应用进展[J].*农业工程学报*,2007,23(3):284-289  
GUO Bo-li, WEI Yi-min, PAN Jia-rong. Progress in the application of isotopic fingerprint analysis to food origin traceability [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007, 23(3): 284-289