

# 表面等离子体共振生物芯片快速检测克伦特罗

李莹<sup>1,2</sup>, 齐攀<sup>1,3</sup>, 马晓<sup>1,4</sup>, 钟金钢<sup>1,4</sup>, 陈江韩<sup>5</sup>, 张冠文<sup>5</sup>

(1. 暨南大学光电信息与传感技术广东普通高校重点实验室, 广东广州 510632) (2. 暨南大学预科部, 广东广州 510610) (3. 广东交通职业技术学院电子工程系, 广东广州 510650) (4. 暨南大学光电工程系, 广东广州 510632) (5. 中国广州分析测试中心, 广东广州 510070)

**摘要:** 盐酸克伦特罗是一种瘦肉精, 在中国被禁止使用。根据免疫反应的规律, 研究基于表面等离子体共振技术的生物芯片无标记检测盐酸克伦特罗的方法, 提出了连续检测法和快速检测法。连续检测法是在检测时交替通入待测样品和 PBS 缓冲液, 检测完成后才通入 SDS-HCl, 实现芯片再生。该方法可以提高芯片的检测次数, 延长使用寿命, 适用于检测克伦特罗抗体、筛选抗体、研究免疫反应动力学、建立标准曲线。快速检测法是在生物芯片制备和检测免疫反应过程中动态调整扫描角度, 能有效提高检测灵敏度, 同时去除冗余的数据, 检出限为 2 mg/L。检测了猪肉中提取的克伦特罗样品, 浓度 2.75  $\mu\text{g/L}$ 。本文所采用的方法具有灵敏度高、操作简便、快速、不需要标记、成本低、设备简单、对环境无污染等优点, 有望实现大量样品的现场实时检测。

**关键词:** 盐酸克伦特罗; 表面等离子体共振; 免疫反应; 连续检测; 快速检测

文章篇号: 1673-9078(2013)11-2747-2751

## A Rapid Method of Biological Chip for Detecting Clenbuterol Based on Surface Plasmon Resonance

LI Ying<sup>1,2</sup>, QI Pan<sup>1,3</sup>, MA Xiao<sup>1,4</sup>, ZHONG Jin-gang<sup>1,4</sup>, CHEN Jiang-han<sup>5</sup>, ZHANG Guan-wen<sup>5</sup>

(1. Laboratory of Optoelectronic Information and Sensing Technologies of Guangdong Higher Education Institutes, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (2. Department of Electronics Engineering, Guangdong Communication Polytechnic, Guangzhou 510650, China) (3. Pre-university, Jinan University, Guangzhou 510610, China) (4. Department of Optoelectronic Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (5. China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** Clenbuterol Hydrochloride, categorized as brown meat essence, is prohibited in China. Clenbuterol is detected by two methods of continuous and rapid according to the law of immune response. The methods are based on surface plasmon resonance by using the biological chip. They are capable of detecting anti-Clenbuterol without labeling. The continuous method renews the chip by injecting the sample and the PBS buffer solution alternatively and injecting SDS-HCl after detection. The method can increase the detection times and extend the life cycle of the biological chip, which is suitable for detecting anti-Clenbuterol, screening anti-Clenbuterol, studying immunoreaction kinetics and establishing standard curves. In addition, the rapid method can adjust the scan angle dynamically in the process of biological chip preparation and immune response detection, which can effectively improve the sensitivity of the detection, remove the redundant data simultaneously, and achieve the detection limit as high as 2 mg/L. Clenbuterol sample (2.75  $\mu\text{g/L}$ ) extracted from pork was detected. The proposed methods showed high sensitivity, user-friendly control, rapid detection, label-free analysis, low cost, simple construction, and environmentally friendly equipment. Both methods could achieve the real-time detection of substantial samples.

**Key words:** clenbuterol hydrochloride; surface plasma resonance; immunoreaction; continuous detection; rapid detection

收稿日期: 2013-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41206081); 海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室资助项目 (MATHAB20120208); 粤港关键领域重点突破招标资助项目 (2005A20501001)

作者简介: 李莹 (1976-), 女, 博士, 副教授, 主要从事生物医学信息技术研究

通讯作者: 钟金钢 (1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事生物医学信息技术研究

盐酸克伦特罗 (Clenbuterol hydrochloride, CLB) 又称“瘦肉精”, 属于  $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂 ( $\beta_2$ -adrenoceptor agonists)。克伦特罗引起的食物中毒事件近年来在国内外时有发生, 1983 年西班牙首次发生克伦特罗食物中毒事件, 1998 年和 2006 年分别在香港和上海发生克伦特罗食物中毒事件。1997 年, 中华人民共和国农业部下达文件, 严禁  $\beta$ -肾上腺素类激素在饲料和畜牧生产中使用, 在禁用激素类列表中,

盐酸克伦特罗高居榜首。克伦特罗既不是兽药,也不是饲料添加剂,但是可明显促进动物生长,并增加瘦肉率,抑制脂肪的合成,因此一些饲养者或者饲料厂仍在非法使用克伦特罗,提高肉用动物的瘦肉率,残留在动物性食品中的克伦特罗严重危害人类健康。与其它 $\beta$ -兴奋剂相比,克伦特罗的生物利用度高,更易出现中毒反应。食用含有盐酸克伦特罗的食品可能会出现血糖升高、心律失常、腹痛、腹泻、过敏等不良反应,其毒性高于具有相同功能的莱克多巴胺,所以,必须对克伦特罗在动物养殖过程中的非法使用进行监控和检测。2002年9月10日农业部、卫生部、国家药品监督管理局发布了《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》,盐酸克伦特罗和莱克多巴胺等7种“瘦肉精”被列为禁用药品。目前,检测盐酸克伦特罗的主要方法是气相色谱-质谱法(Gas Chromatograph-Mass Spectrometer-computer, GC-MS)<sup>[1]</sup>、高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[2-3]</sup>、酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[4]</sup>、液相色谱-质谱/质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[5]</sup>。这些方法的缺点是样品处理时间长,检测过程烦琐、难于操作,污染环境,仪器价格昂贵,在实际应用中受到限制<sup>[6]</sup>。表面等离子体共振生物芯片不需要标记就可对分子间的相互作用进行实时监测,已被广泛用于药物分析、食品分析、环境监测等许多领域<sup>[7-14]</sup>。

本研究利用自行研制的便携式表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)生物传感器,根据免疫反应的特异性,研究克伦特罗抗原、抗体的相互作用,分析动力学反应过程,建立标准曲线,并提出克伦特罗的连续检测法和快速检测法。连续检测法是连续检测多个样品后再对生物芯片表面通入再生液,实现芯片再生,从而简化了检测过程,提高了芯片的使用寿命。快速检测法是通过动态设置检测参数,在免疫反应阶段提高单次检测速度,获取更多数据,提高灵敏度;在芯片制备阶段延长单次检测时间,去除冗余数据。与传统生化分析方法相比,本研究利用便携式仪器,提出的方法操作简便,无需标记,非破坏性,成本低,可进行现场大量样品的实时连续检测和快速筛选,适用于超市、集市、工厂等需要实时检测的场所,进行质量监控。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

自行研制了便携型SPR检测仪,由光路系统、机

械扫描系统、样品输送系统、生物传感芯片、控制及分析软件组成,用电学方法控制入射光角度的改变,由光电池检测反射光光强的变化,灵敏度高,方法简便易行。

盐酸克伦特罗标准品(Clenbuterol Hydrochloride, 100  $\mu\text{g/mL}$ 的乙醇溶液)由农业部环境保护科研监测所提供,分子量为313.7;克伦特罗-牛血清白蛋白(CLB-BSA)耦联物、克伦特罗抗体(anti-CLB)购于广州弗赛生物科技有限公司;猪肉中提取的克伦特罗样品由中国广州分析测试中心提供;巯基十一酸( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ )、巯基己酸( $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ )、N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)、碳二亚胺(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochlorid, EDC)、乙醇胺(Eth)、十二烷基硫酸钠(SDS)购于美国Sigma公司;其它试剂购于北京化学试剂公司。免疫反应的缓冲液是PBS缓冲液(2 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mmol/L NaCl, pH 7.4),盐酸克伦特罗标准品(CLB)、克伦特罗衍生物(CLB-BSA)、克伦特罗抗体用PBS缓冲液稀释成相应浓度的溶液。

### 1.2 生物芯片制备

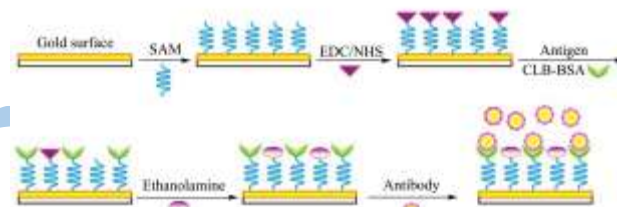


图1 克伦特罗免疫检测示意图

Fig.1 Scheme of Clenbuterol (CLB) immune detection

在直径20 mm厚度1 mm的圆形玻璃片上沉积50 nm的金。将镀有金膜的传感芯片固定到仪器上,安装好流通系统,通入PBS缓冲液,基线稳定几分钟后进行生物芯片的自组装,流通池中通入1 mM的 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ (巯基十一酸)和 $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ (巯基己酸)的乙醇溶液,质量比(M/M)是1:9,对金膜表面进行化学修饰2 h,然后通入PBS缓冲液清洗。基线稳定后加入0.1 mol/L的NHS和0.1 mol/L的EDC混合液(1:1, V/V),活化芯片表面15 min,之后用PBS冲洗2 min,这时的基线比活化前略有升高。然后进行生物探针的固定。连续检测法和快速检测法,均在生物芯片表面固定克伦特罗衍生物(CLB-BSA),作为生物探针,固定时克伦特罗衍生物浓度为83 mg/L,此时SPR响应值明显升高,30 min后通入PBS冲洗2 min,响应值只有小幅下降,说明探针固定效果较好。

加入 1 mol/L 的乙醇胺(pH 8.5)封闭灭活剩余的酯键, 5~7 min, PBS 冲洗后, 生物芯片制备完成, 可用于下一步的免疫检测。如图 1 所示, 克伦特罗免疫反应的示意图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 连续检测

克伦特罗免疫反应完成后, 通入 SDS-HCl 可实现抗原-抗体结合物从芯片表面解离, 但是对芯片表面有很强的破坏性, 影响芯片的检测次数和使用寿命, 并且会改变基线的位置, 影响检测结果的准确性。因此要尽量减少使用酸或碱洗脱、再生芯片的次数。

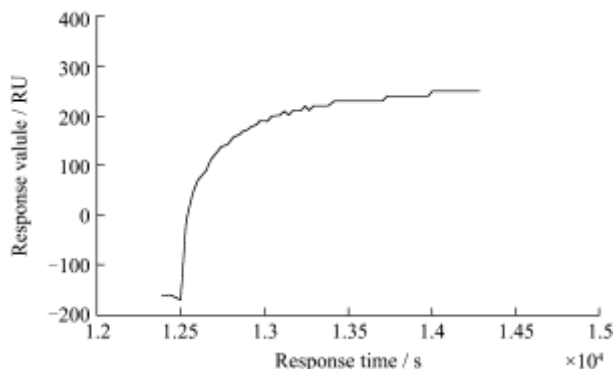


图 2 表面等离子体共振生物芯片检测克伦特罗的免疫曲线  
Fig.2 Sensorgram showing the immune response curve of the SPR for Clenbuterol on the biosensor

SPR 检测克伦特罗免疫反应得到的曲线为对数增长的曲线, 先快后慢, 逐渐趋于平缓, 最后免疫反应达到饱和。如图 2 所示, 克伦特罗免疫反应速度较慢, 在起始阶段(8 min 内)待测物与芯片表面探针结合的相对响应值与时间近似呈线性关系, 通常 8 min 以后反应速度才趋于平缓, 15 min 后才会达到平衡, 并且当生物芯片表面固定的生物探针较多, 待测样品的浓度不高时, 起始阶段探针与待测物的结合数量少, 只占芯片表面探针的小部分, 对后面加入的样品中待测物与芯片探针的结合影响很小。解离速度与抗体本身的性质、温度以及缓冲液成分有关。克伦特罗免疫反应完成后, 通入 PBS 缓冲液使抗原-抗体结合物解离, 解离速度很慢。

基于以上分析, 本文提出连续检测克伦特罗的方法。检测时交替通入待测样品和 PBS 缓冲液, 可得到克伦特罗连续检测曲线, 一组样品检测完成后才通入 SDS-HCl 使抗原-抗体结合物解离, 实现芯片再生。该方法减少了用酸或碱洗脱的次数, 简化了实验步骤, 节省反应时间, 延长芯片的使用寿命和使用次数, 大大降低了成本。

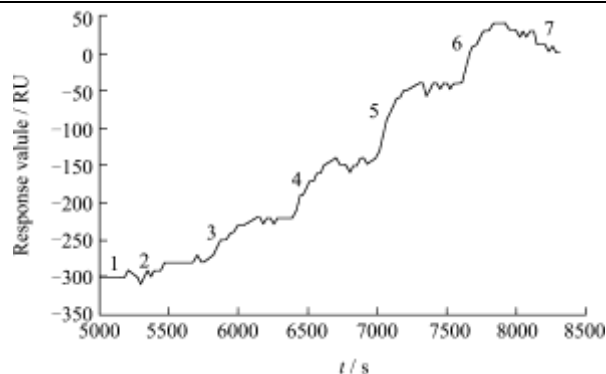


图 3 利用表面等离子体共振生物芯片连续检测克伦特罗的动力学曲线

Fig.3 Sensorgram of continuous detection method for Clenbuterol with surface plasmon resonance (SPR) biosensor

注: 1.PBS; 2. 2 mg/L 的 anti-CLB; 3. 4 mg/L 的 anti-CLB; 4. 8 mg/L 的 anti-CLB; 5. 16 mg/L 的 anti-CLB; 6. 32 mg/L 的 anti-CLB; 7. SDS-HCl。

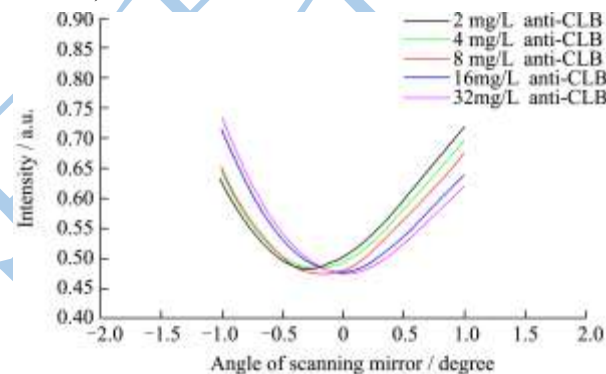


图 4 连续法检测不同浓度克伦特罗的 SPR 曲线对比

Fig.4 Responses of Clenbuterol with different concentrations by continuous detection method

生物芯片表面固定克伦特罗衍生物 CLB-BSA, 交替通入含有不同浓度 CLB 抗体的待测溶液和 PBS 缓冲液, 动态检测曲线如图 3 所示。其中包括五个连续检测的过程, 平台 1 是反应前 PBS 缓冲液形成的基线, 2~6 五个上升部分分别对应 CLB 抗体浓度为 2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、16 mg/L 和 32 mg/L。每个上升阶段后的平台或略有下降的部分是通入 PBS 缓冲液时 CLB 抗体从芯片表面解离的过程, 解离速度较慢。2~5 过程, 随着样品中抗体浓度增大, 反应速度逐渐增快。图中 6 对应的样品浓度虽然比 5 高, 但是 SPR 响应值上升的速度比 5 略慢, 原因是芯片表面的抗原 (CLB-BSA) 一部分与样品中的抗体结合了, 芯片表面剩余的抗原数量减少, 虽然样品中有更多抗体, 但是抗原-抗体结合速度下降, 检测曲线上上升趋势放缓。现场实际检测中, 如果减少单个样品的检测时间, 可以对更多组别的样品进行连续检测。该方法省略酸或碱洗脱的步骤, 减少了实验步骤, 简化了芯片再生过



程,降低测量成本,有利于推广到大量样品的现场检测。

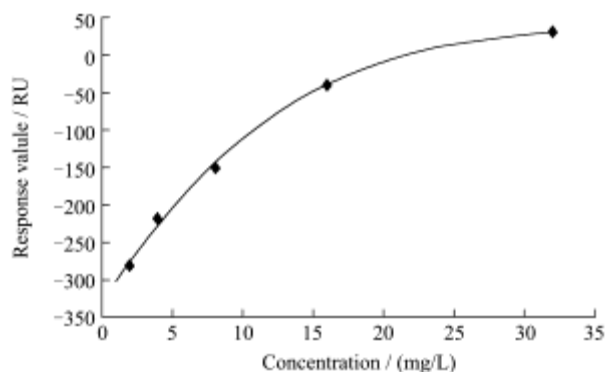


图5 连续检测 CLB 抗体的标准曲线

Fig.5 Calibration curves of anti-Clenbuterol with the continuous detection method

注:CLB 抗体浓度是 2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、16 mg/L 和 32 mg/L。

图4是这一组样品SPR检测的共振曲线(扫描范围为 $2^\circ$ ),随样品浓度的增大,生物芯片表面抗原-抗体结合物的质量增加,共振角增大,SPR响应值增大。图5是连续检测anti-CLB的标准曲线,室温 $20\pm 1^\circ\text{C}$ ,以通入样品免疫反应5 min时的相对响应值为纵坐标,样品中CLB抗体的浓度为横坐标,可见 $0\sim 15\text{ mg/L}$ 浓度的样品SPR响应值与浓度基本呈线性关系。实际样品的检测,可依据标准曲线得出样品中待测物的浓度。

## 2.2 快速检测

本研究采用角度扫描方式的生物传感器,为提高检测的精度、降低样品的检测限并缩短测量时间,提出了一种快速检测法,减小扫描步长,动态调整角度扫描范围。免疫反应主要研究抗原与抗体的结合过程,为提高检测灵敏度、更好的研究免疫反应的动力学,则需要在相同反应时间内获得尽可能多的测量点。例如克伦特罗样品检测阶段(免疫反应),将扫描范围设置为 $2^\circ$ ,完成一次扫描耗时约12 s。若调整角度扫描范围为 $1^\circ$ ,这时扫描一次的时间约6 s,当保持扫描步长不变,在相同的反应检测时间内可获得的测量点数将增加近1倍。图6是两种角度范围检测免疫反应的响应图,固定了CLB衍生物的生物芯片检测 $10\text{ mg/L}$  anti-CLB的检测过程。阶段1是PBS形成的基线;阶段2是用 $2^\circ$ 的扫描范围检测免疫反应曲线;15 min后通入SDS-HCl洗脱,对应过程3;然后通PBS缓冲液,此时响应值先升高,后下降,回到基线,对应过程4;阶段5是小角度范围扫描,扫描范围是 $1^\circ$ 。可见分别用 $2^\circ$ 和 $1^\circ$ 的扫描范围,不影响检测结果,

但由于点数增加后者曲线更加平滑。

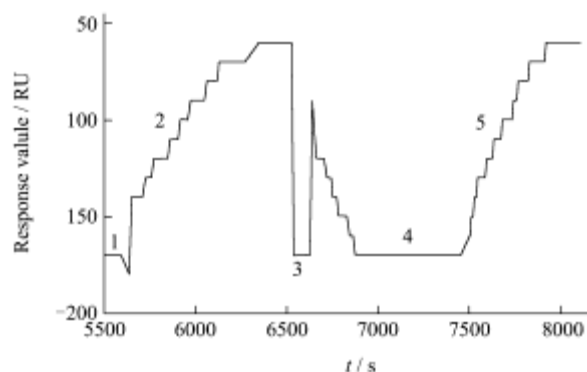


图6 两种角度扫描范围的免疫反应响应曲线

Fig.6 Responses of the detection for Clenbuterol with different angle scanning ranges

注:1.PBS; 2. $2^\circ$ 角度扫描范围检测的免疫反应曲线; 3.SDS-HCl; 4.PBS; 5. $1^\circ$ 角度扫描范围检测的免疫反应曲线。

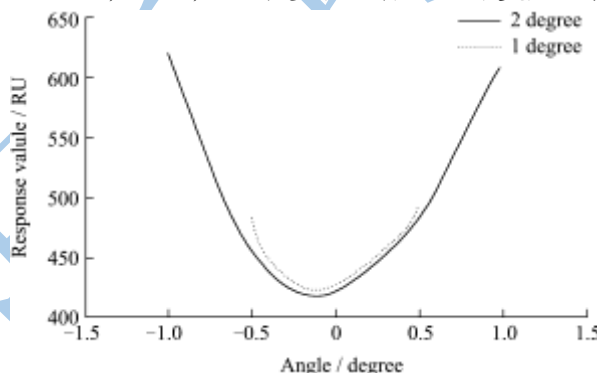


图7 两种角度扫描范围的共振曲线对比

Fig.7 The resonance curve of Clenbuterol immunoreaction with different angle scanning ranges

如图7所示,分别对两种角度范围扫描时SPR曲线对比,结果证明,共振角不变,改变角度扫描范围不影响检测结果。因此在检测过程中动态调整角度扫描范围,生物芯片制备(芯片修饰、活化、探针固定和封闭)时,耗时较长,将扫描角度范围加大,记录的数据主要是共振角,相同时间内记录的数据减少,去除了冗余的数据。免疫反应时可动态调整扫描范围和扫描步长,更好地研究免疫反应的动力学,提高检测灵敏度,降低检出限。生物芯片表面固定克伦特罗衍生物CLB-BSA,直接检测克伦特罗抗体,检出限可达到 $1\text{ mg/L}$ 。在猪肉中提取克伦特罗,样品浓度为 $2.75\text{ }\mu\text{g/L}$ ,工作抗体浓度 $250\text{ }\mu\text{g/L}$ ,检测结果如图8所示。阶段1、3是PBS基线,2是芯片活化,4是生物芯片表面固定CLB-BSA,5是固定后PBS清洗,6是乙醇胺封闭灭活,7、9、11是PBS清洗,8为检测猪肉中提取克伦特罗样品,10为空白对照。可见,含有克伦特罗的样品与对照组SPR响应值有明显区别,能够在实际检测中应用。

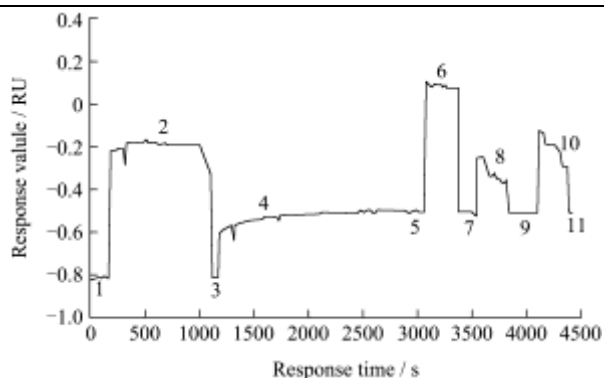


图8 检测猪肉中提取的克伦特罗样品

Fig.8 Detected clenbuterol sample extracted from pork

### 3 结论

3.1 与传统生化分析方法相比,SPR生物芯片检测克伦特罗具有免标记、只需单一抗体、所需样品量少、可迅速给出定量结果、研究反应动力学等一系列优点。本文提出了两种改进的SPR生物芯片检测克伦特罗的方法,连续检测法适用于对样品中抗体的检测、大量抗体的筛选、反应动力学研究等。快速检测法检测克伦特罗,能去除冗余数据,缩短检测时间,不仅适用于基础研究,还适用于抗体的筛选、大量样品现场检测等。基于表面等离子体共振的生物芯片检测一个克伦特罗样品大约需要3~7 min,一组样品总体约耗时50 min。课题组开发了便携式的SPR生物芯片检测系统,将连续检测法与快速检测法结合,不需荧光染色剂等化学物质,对环境无污染,检测时间短,尤其适用于食品质量监控的各个领域,对猪肉中提取的样品进行了检测,有望实现大量样品的现场实时检测。

3.2 免疫反应检测时间应根据抗原-抗体响应值的大小,结合实际检测要求进行设定。免疫反应时间越长,反应越充分,可有效降低样品的检出限。通常克伦特罗抗原-抗体的反应在360 s内没有达到饱和状态,如果延长反应时间,能降低检出限。

### 参考文献

[1] Chunmei Song, Aimin Zhi, Qingang Liu, et al. Rapid and sensitive detection of  $\beta$ -agonists using a portable fluorescence biosensor based on fluorescent nanosilica and a lateral flow test strip [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 50: 62-65

[2] Fengxia Qiao, Jingjing Du. Rapid screening of clenbuterol hydrochloride in chicken samples by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography B*, 2013, 923-924: 136-140

[3] 张群,刘焯.固相萃取-反相高效液相色谱法测定鲜肉中盐

酸克伦特罗残留量的条件优化[J].*现代食品科技*, 2009, 25(3): 337-340

ZHANG Qun, LIU Ye. Optimization of Detection of Clenbuterol Residue in Fresh Meat by Solid Phase Extraction-HPLC Method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(3): 337-340

[4] Jian P Wang, Jian Z Shen. Immunoaffinity chromatography for purification of Salbutamol and Clenbuterol followed screening and confirmation by ELISA and GC-MS [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2007, 18(2): 107-115

[5] 蒋万枫,赵珊.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查动物组织中7种 $\beta$ -受体激动剂残留[J].*分析测试学报*, 2013, 32(6): 675-680

JIANG Wan-feng, ZHAO Shan. Rapid Screening of  $\beta$ -Agonists Residues in Animal Tissue by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2013, 32(6): 675-680

[6] 汤轶伟,王硕,励建荣,等. $\beta$ -兴奋剂盐酸克伦特罗残留检测方法最新研究进展[J].*中国食品学报*, 2013, 13(5): 154-160

TANG Yi-wei, WANG Shuo, LI Jian-rong, et al. Recent Developments of Detecting Clenbuterol Hydrochloride Residues in Different Samples [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(5): 154-160

[7] Roland Gamsjaeger, Ruvini Kariawasam, Line H Bang, et al. Semiquantitative and quantitative analysis of protein-DNA interaction using steady-state measurements in surface plasmon resonance competition experiments [J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 440: 178-185

[8] on Ashley, Sam F Y Li. An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of bovine catalase in milk [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 48: 126-131

[9] Soujanya Ratna Edupuganti, Om Prakash Edupuganti, Richard O'Kennedy. Generation of anti-zearalenone scFv and its incorporation into surface plasmon resonance-based assay for the detection of zearalenone in sorghum [J]. *Food Control*, 2013, 34: 668-674

[10] 李莹,顾大勇,钟金钢,等.基于表面等离子体共振的基因芯片制备与检测[J].*生物医学工程学杂志*, 2009, 26(3): 653-656

Li Ying, Gu Da-yong, ZHONG Jin-gang, et al. The Preparation and Testing Analysis Basis of Gene Chip Checking System with Surface Plasmon Resonance Imaging [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2009, 26(3): 653-656

[11] 李辉,蔡浩原,陈兴,等.表面等离子体共振生物传感器连续

- 检测莱克多巴胺[J].分析化学研究简报,2010,38(3):381-384
- LI Hui, CAI Hao-yuan, CHEN Xing, et al. Continuous Detection Method for Ractopamine with Surface Plasmon Resonance Biosensor [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(3): 381-384
- [12] Shiping Li, Jingang Zhong. Simultaneous amplitude-contrast and phase-contrast surface plasmon resonance imaging by use of digital holography [J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(12): 3190-3202
- [13] Pan Qi, Ying Li, Jingang Zhong. Optimized angle scanning method for array sample detection in surface plasmon resonance biosensor [J]. Applied Optics, 2012, 51(9): 1245-1250
- [14] 齐攀,李莹,冯明创,等.用于阵列样品检测的扫描式表面等离子体共振生物传感器[J].光学精密工程,2012,20(11): 2363-2372
- Qi Pan, Li Ying, Feng Mingchuang, et al. Scanning Surface Plasmon Resonance Biosensor for Array Samples Detection [J]. Optical and Precision Engineering, 2012, 20(11): 2363-2372