

磺胺二甲基嘧啶分子印迹聚合物的吸附性能分析

傅桂瑜, 李 磊, 林郑忠, 黄志勇

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 采用沉淀聚合法, 以磺胺二甲基嘧啶(sulfadimidine, SM₂)为模板分子, 甲基丙烯酸为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 制备一种SM₂的分子印迹聚合物。对其形态进行表征, 并对其吸附性能、选择性等进行了研究。结果表明: 分子印迹聚合物微球呈不规则球形, 平均粒径为368 nm; 在一定浓度范围内, 聚合物的吸附量 Q 与吸附液质量浓度 C 有一定的线性关系, 线性方程是 $Q = 0.145\ 1\ C + 0.227\ 1$, $R^2 = 0.997\ 9$ 。可见, 聚合物对SM₂有良好的选择性和重复利用性, 可作为一种SM₂的富集材料。

[关键词] 沉淀聚合; 分子印迹; 磺胺二甲基嘧啶; 吸附

[中图分类号] TS 201.6

Adsorption Property of a Molecular Imprinted Polymer for Sulfadimidine

FU Guiyu, LI Lei, LIN Zhengzhong, HUANG Zhiyong

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A molecular imprinted polymer was prepared by precipitation polymerization with sulfadimidine as template molecule, methacrylate as monomer and ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking agent. Its morphology, adsorption and selectivity were studied. The results showed that the molecular imprinted polymer microspheres were spherical with an average particle size of 368 nm. Within a certain concentration range, the adsorption capacity of the polymer Q had a certain linear relationship with the concentration of the adsorption solution C of sulfadimidine. The linear equation was fitted as $Q = 0.145\ 1\ C + 0.227\ 1$, $R^2 = 0.997\ 9$. The polymer showed good selectivity and reusability for sulfadimidine and could be used as a kind of enrichment material for sulfadimidine.

Keywords: precipitation polymerization; molecular imprinted; sulfadimidine; adsorption

0 引言

磺胺二甲基嘧啶(sulfadimidine, SM₂)是对氨基苯磺酰胺结构类药物的一种, 该类药物与对氨基苯甲酸竞争性结合二氢叶酸合成酶, 进而影响细菌核蛋白合成而发挥抑菌作用。该类药具有抗菌谱广、价格低廉、性质稳定等优点, 因而被广泛应用于畜牧业和水产养殖业。但当其在人体内残留量达到一定水平时, 会产生“三致”作用^[1], 引起肝中毒、尿结石、肾衰竭或者过敏反应等^[2-4]。原农业部第235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》中规定, SM₂在牛奶中的最高残留量为

[收稿日期] 2019-07-09

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2018J01432, 2017J01633); 福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目(B18097-5); 大学生创新创业项目(201810390024, 201810390071); 集美大学创新团队基金项目(2010A007)

[作者简介] 傅桂瑜(1995—), 女, 硕士生, 从事食品安全检测技术方向研究。通信作者: 林郑忠(1976—), 男, 副教授, 博士, 从事食品安全检测技术方向研究。E-mail: linzz@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。统计数据表明, 牛奶中 SM_2 残留的检出率高达 20%, 高于其他各类药物残留^[5], 因此很有必要开展食品中磺胺类药物残留的日常监测。

目前, 食品中磺胺类药物的识别、检测主要还是基于高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[3-4] 和化学检测法^[6]。HPLC 法常用的前处理若采用传统的萃取方法, 效率较低, 而采用分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymer, MIP) 作为识别材料可以提高效率。分子印迹技术 (molecular imprinted technique, MIT) 又称为分子模板技术, 是将印迹分子与功能单体通过共价或非共价作用形成稳定的结合位点, 在一定条件下加入交联剂发生共聚反应使之形成稳定结构, 最后将印迹分子从网状聚合物中去除, 形成了具有对印迹分子特异性识别的三维网状结构物质^[7-8]。MIT 因其较高的选择性、亲和性, 良好的物理、化学稳定性, 较长的使用寿命, 具有可检测复杂样品和微量物质的优越性, 在生物医药、环境分析和食品安全方面都具有良好的发展前景。MIP 本身没有检测功能, 所以 MIP 通常被作为固相萃取填料, 对靶标物进行富集后再结合其他手段检测。李玲等^[9]采用本体聚合法合成了一种二甲基嘧啶的 MIP, 利用分子印迹固相萃取高效液相色谱连用技术检测磺胺类兽药残留, MIP 对模板分子的吸附量为 11.37 mg/g 。该方法具有灵敏度高、准确性好等优点, 但步骤繁琐, 且固相萃取柱对痕量 SM_2 的萃取效率低, 不利于后续的检测分析。魏晓兵^[10]制备了一种分子印迹聚合物/氧化石墨烯复合材料 MIP/GO, 并将其作为一种新型分子印迹固相萃取吸附剂, 所制备的材料对 SM_2 的吸附量是传统 MIP 吸附量的 1.5 倍, 可以实现痕量物质的有效富集, 并结合 HPLC 对 SM_2 残留进行检测。以上制备的 MIP 固相萃取填料对靶标物具有高效识别能力, 相比传统的填料, 简化了前处理流程, 提高了效率。但传统 MIP 在合成后为块状物质, 还需要人工研磨或其他措施才能使用, 费时费力。另外, 研磨过程会造成一部分识别位点失效, 且颗粒大小不均匀, 吸附量不稳定^[11]。因此, 在保留传统 MIP 高效识别能力的基础上, 寻找一种合成和使用过程简单的吸附材料用于 SM_2 的选择性富集很有必要。

本文以 SM_2 为模板分子, 采用沉淀聚合法制备了一种对 SM_2 具有特异性识别的 MIP, 制备方法简单, 成本低廉, 得到的聚合物粒径小、颗粒均匀、选择性好、吸附速度较快, 并能重复利用, 能作为一种 SM_2 的富集材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SM_2 、磺胺胍 (sulfaguanidine, SG)、磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine, SDM)、磺胺噻唑 (sulfathiazole, ST) 均购于上海麦克林生化科技有限公司; 乙腈、甲醇、乙醇、四氢呋喃 (tetrahydrofuran, HF)、乙酸、过氧化氢、浓硫酸、溴化钾均购于广东西陇科学股份有限公司; 甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯 (glycol dimethacrylate, EGDMA) 均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 偶氮二异丁腈 (azodiisobutyronitrile, AIBN) 购于天津市光复精细化工研究所。以上试剂除了溴化钾是色谱纯外, 其他都是分析纯。

1.2 实验仪器

紫外分光光度计 (Lambda 265, 上海珀金埃尔默企业管理有限公司); 傅里叶红外光谱仪 (Thermo Fisher scientific, IS50 FT-IR); 透射电镜 (日本电子株式会社, JEM-2010); 真空干燥箱 (上海新苗医疗企业制造有限公司, DZF-6030); 恒温水浴锅 (厦门亿辰科技有限公司, ZNCL-G15); 纯水机 (Sartorius, Comfort I)。

1.3 实验方法

1.3.1 SM_2 -MIP 的制备

采用沉淀聚合法制备 SM_2 -MIP。准确称取模板分子 SM_2 0.14 g, 倒入 100 mL 的具塞圆底烧瓶中, 加 50 mL 的乙腈溶解, 加入 0.17 mL 的功能单体 MAA, 超声溶解后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 12 h, 便于氢键

的充分形成。加入 1.92 mL 的交联剂 EGDMA 以及引发剂 AIBN 100 mg, 超声 10 min 后, 通 N_2 10 min, 脱除溶液中的氧气。加塞密封, 60 °C 恒温水浴条件下反应 24 h, 磁力搅拌 600 r/min。将制备得到的乳白色沉淀以 8 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 V (甲醇): V (乙酸) = 9:1 的溶液反复清洗, 直到上清液中检测不到 SM_2 为止。得到的聚合物用甲醇浸泡 12 h, 去除聚合物中的残留乙酸。在 40 °C 条件下真空干燥 6 h 得到聚合物, 将其研磨成粉末状, 得到 SM_2 分子印迹聚合物 (SM_2 -MIP), 密封保存, 便于后续实验利用。制备空白聚合物 (SM_2 -NIP) 时, 不加入 SM_2 , 其他过程与 MIP 制备的过程完全相同。

1.3.2 模板分子与功能单体相互作用

模板分子 SM_2 和功能单体 MAA 以物质的量比为 1:4 溶于乙腈中, 模板分子的初始浓度为 0.01 mmol/L, 预聚反应 12 h。采用紫外分光光度法在 200 ~ 350 nm 范围内扫描紫外吸收曲线。

1.3.3 动力学吸附实验

准确称取 SM_2 -MIP/NIP 20 mg, 加入到 5 mL 20 mg/L 的 SM_2 溶液中 (平行三组), 间隔 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 min 后, 将吸附体系离心, 取上清液 2 mL 测定其紫外吸光度值, 计算其吸附量 Q , 并作 SM_2 -MIP 的动力学吸附曲线。

1.3.4 等温吸附曲线

准确称取 SM_2 -MIP/NIP 20 mg, 分别加到 5 mL 的 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L 的 SM_2 溶液中 (平行三组), 吸附 2 h 后将吸附体系离心, 取上清液 2 mL 测定其紫外吸光度值, 计算其吸附量 Q , 并作 SM_2 -MIP 的等温吸附曲线。

1.3.5 聚合物的吸附性能测定

在优化条件下, 用制备好的 SM_2 -MIP/NIP 吸附不同质量浓度的 SM_2 标准溶液 (5 ~ 20 mg/L), 并记录其相应的吸光度值变化, 并计算其吸附量 Q (mg/g), 通过 SM_2 的浓度 C 与 Q 作标准曲线。

1.3.6 聚合物的表征

1) 红外光谱测定: 分别称取 1 mg 的 SM_2 -MIP/NIP 干燥粉末, 与 200 mg KBr 均匀混合研磨, 压片后用傅里叶红外光谱仪测定其红外光谱。

2) 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 形态测定: 取一定量的 SM_2 -MIP, 用甲醇稀释到一定浓度, 超声 30 min 后, 取一定量的稀释液滴加到硅片上, 自然晾干后喷金。用 JEM - 2010 透射电镜表征聚合物微球的表面形貌, 并用 Nano Measurer 1.2 对其进行粒径统计分析。

1.3.7 聚合物的选择性研究

本实验选择与 SM_2 结构相似的 SG、SDM、ST 为干扰项, 分别用制备好的 SM_2 -MIP/NIP 聚合物对 SM_2 、SG、SDM、ST 的标准溶液进行吸附, 观察其吸光度值的变化。

2 结果与讨论

2.1 模板分子与功能单体相互作用

功能单体与模板分子相互作用力的大小决定着 MIPs 的选择识别能力。因此, 通过分析预聚体系中二者之间的相互作用是选择功能单体最简单、快速的方法。图 1 为模板分子, MAA, 模板分子与 MAA 作用的紫外吸收谱线。由图 1 可以看出, 预聚体系的吸收值明显小于模板分子, 这说明功能单体与模板分子存在着一定的相互作用。如 MAA 的羧基和模板的胺

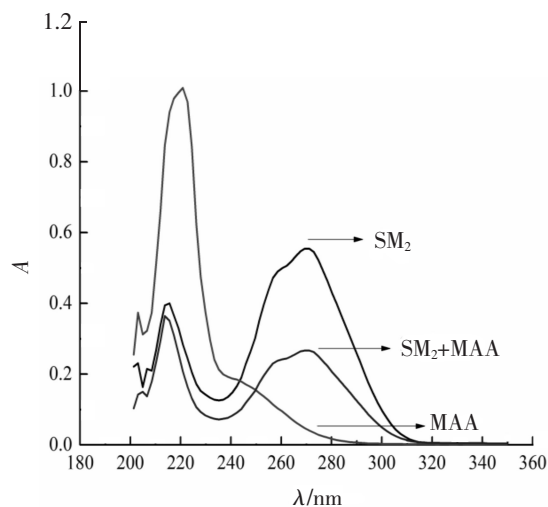


图 1 模板分子与功能单体结合的紫外吸收谱线
Fig.1 UV absorption of template molecules bound to functional monomers

基可以形成较强的氢键, 同时也能形成离子键。MIP 对模板的高选择性主要归功于这些相互作用力。

2.2 动力学吸附曲线

为了测定 SM_2 -MIP 对溶液中 SM_2 分子吸附饱和程度随时间的变化, 本实验固定 SM_2 的质量浓度为 20 mg/L, 测定不同时间下的 MIP/NIP 吸附量, 实验结果如图 2 所示。由图 2 可见, MIP 和 NIP 的动力学吸附曲线主要分为两部分, 90 min 以前, 吸附量随着时间的推移不断增加; 90 min 以后吸附量逐渐趋于平稳, 达到饱和状态。这是由于印迹位点有浅穴和深穴之分, 在 90 min 以前主要以浅穴吸附为主, 吸附速度较快; 90 min 之后以深穴吸附为主, 同时由于印迹分子向深穴传质过程中受到空间位阻的作用, 吸附变慢, 达到饱和状态。对比 MIP 和 NIP, 两者有着同样的吸附饱和时间。

2.3 等温吸附曲线

以聚合物的吸附量 Q 对吸附溶液的初始浓度 C 作图, 得到 MIP/NIP 的等温吸附曲线, 如图 3 所示。由图 3 可见, 随着吸附浓度的增大, MIP 的吸附量随之增加, 当吸附液质量浓度达到 25 mg/L 时, MIP 吸附量达到平衡。这是由于在合成聚合物的过程中, 聚合物形成了与模板分子 SM_2 结构相匹配的空间构型, 即相应功能基团排列形成的印迹位点。这种印迹空穴对模板分子具有一定的“记忆功能”, 会对模板分子进行选择吸附。同时, NIP 的吸附量随着吸附浓度的增加也随之增加, 当质量浓度达到 25 mg/L 时吸附达到平衡。这表明聚合物除了对模板分子的特异性吸附外, 还存在一定的非特异性吸附能力, 这是由于聚合物表面残留的功能基团, 会与模板分子形成氢键所致。MIP 和 NIP 的吸附量差异随着浓度的增加而增加, 这也充分表明了 MIP 的印迹空穴的存在。

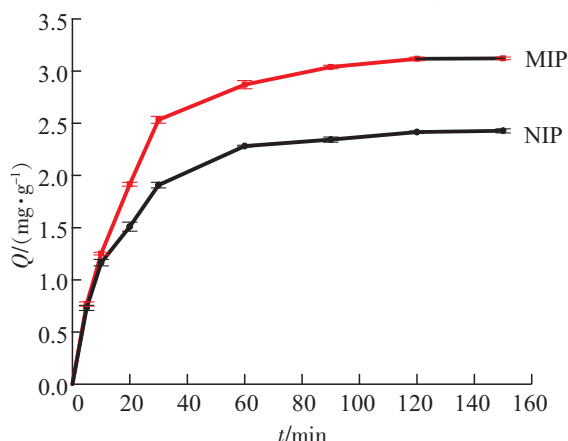


图2 SM_2 -MIP/NIP 的动力学吸附曲线

Fig.2 The adsorption kinetic curve of SM_2 -MIP/NIP

为了评价分子印迹聚合物的识别性能, 用 MIP 对 SM_2 的等温吸附数据作 Scatchard 数据分析。Scatchard 方程^[12]为 $Q/C = (Q_{\max} - Q)/K_d$, 其中: Q 是 MIP 对 SM_2 的吸附量 (mg/g); C 是 SM_2 的平衡质量浓度 (g/L); Q_{\max} 是结合位点的最大表观结合量 (mg/g); K_d 是结合位点的平衡解离常数 (g/L)。以 Q/C 对 Q 作图, 如图 4, 图 4 中分别存在 2 条线性关系较好的线, 说明合成的聚合物存在着两类结合位点。根据斜率和截距^[13]得知: 聚合物对 SM_2 的低亲和性结合位点的平衡解离常数 $K_{d1} = 8.06$ g/L, 最大结合量 $Q_{\max1} = 6.62$ mg/g; 高亲和性位点的平衡解离常数 $K_{d2} = 1.65$ g/L, 最大结合量 $Q_{\max2} = 3.86$ mg/g。

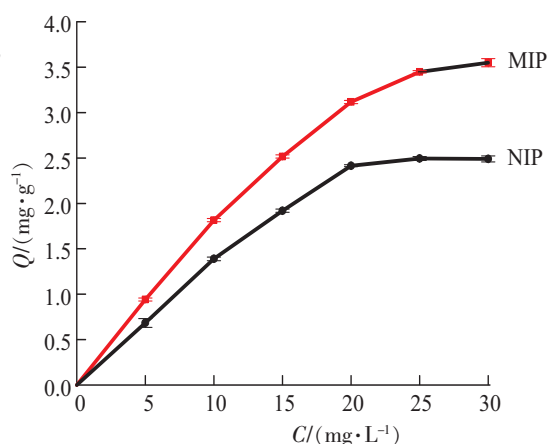


图3 SM_2 -MIP/NIP 的等温吸附曲线

Fig.3 The adsorption isotherms of SM_2 -MIP/NIP

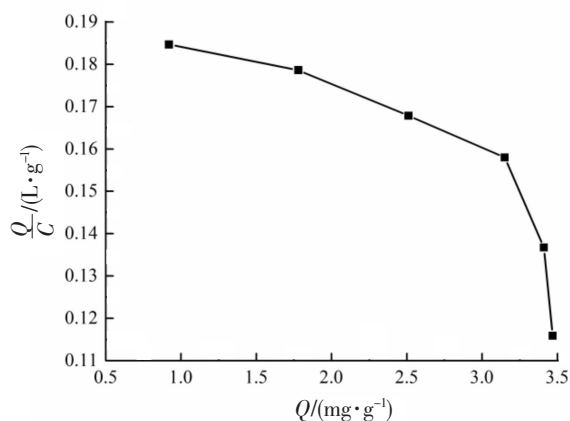


图4 MIP 的 Scatchard 曲线

Fig.4 Scatchard plots of MIP

结合位点的形成与模板、功能单体的相互作用力有关,高亲和性结合位点可能是氢键起主要作用,而低亲和性位点可能是静电力起主要作用^[14]。

2.4 聚合物的响应性

本实验通过 MIP 吸附不同浓度的 SM_2 溶液,根据吸附后的吸光度值的不同,计算得到不同的吸附量 Q 。发现在一定质量浓度范围内 ($5 \sim 20 \text{ mg/L}$),吸附量 Q 与吸附的浓度 C 有一定的线性关系,如图 5 所示。并根据其相关性得到线性方程为: $Q = 0.1451C + 0.2271$, $R^2 = 0.9979$ 。

2.5 聚合物的表征

傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) 常用于物质内部的原子振动分析,可提供聚合物内部的组成结构分析。比较 MIP 与 NIP 的红外光谱图 (见图 6) 可以看出, MIP 和 NIP 的红外光谱大致相同,那是因为经过洗脱后 MIP 和 NIP 的组成物质相同,都是由 MAA 和 EGDMA 交联组成。但是仔细分析图 6 可以看出, MIP 和 NIP 的部分吸收峰的位置和宽度有所不同。MIP 和 NIP 中共同的官能团 $C=O$ 的吸收振动峰分别的位置在 1723.08 , 1732.24 cm^{-1} , $O-H$ 的吸收振动峰的位置分别在 3560.91 , 3574.41 cm^{-1} 。 $C=O$ 基团在形成氢键时作为质子受体, $O-H$ 基团在形成氢键时作为质子供体。NIP、MIP 的 $C=O$ 和 $O-H$ 的吸收振动峰的位置分别向低频方向发生移动,那是由于在形成聚合物过程中, MIP 中的模板分子 SM_2 中的 $C=O$ 基团、 $O-H$ 基团与 MAA 的 $O-H$ 、 $C=O$ 形成氢键所致^[15]。从红外光谱可以看出, MIP 在聚合过程中,功能单体与模板分子间确实存在氢键形成。

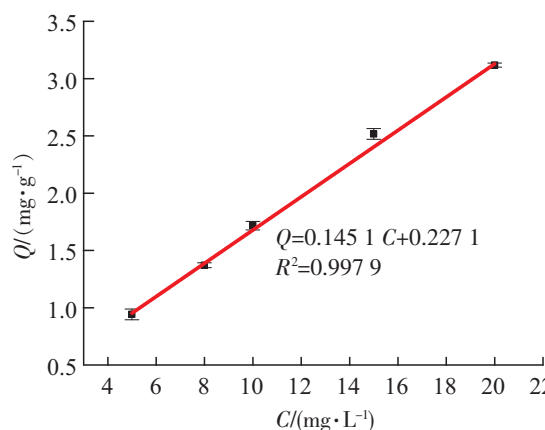


图 5 SM_2 -MIP 吸附量与吸附浓度的线性方程

Fig.5 The linear equation of Q and C of SM_2 -MIP

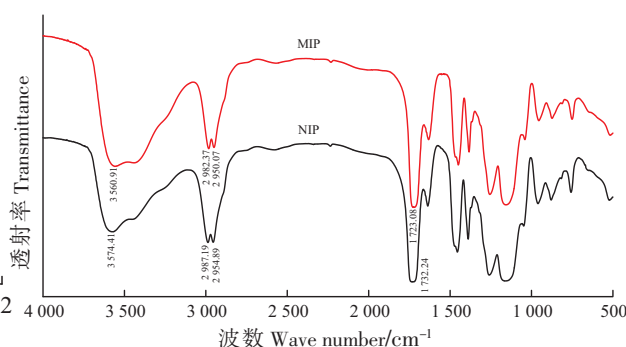


图 6 SM_2 -MIP 和 NIP 的红外光谱图

Fig.6 FTIR spectrogram of SM_2 -MIP and NIP

通过 TEM 表征,由图 7 可以看出, MIP 聚合物微球成不规则球形, MIP 平均粒径在 368 nm , NIP 的平均粒径在 355 nm 。由于笔者改进了聚合方法,提高了微球的规整性和尺寸的均匀性,这有利于提高 MIP 的吸附稳定性。

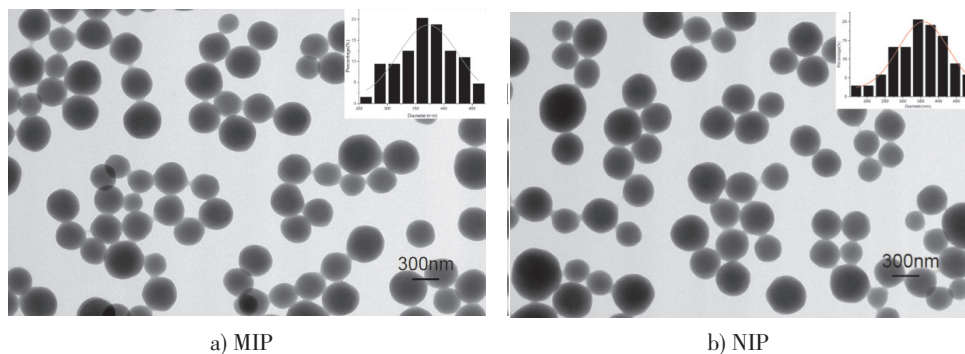


图 7 SM_2 -MIP 和 NIP 的 TEM 图谱

Fig.7 The TEM of SM_2 -MIP and NIP

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

2.6 聚合物的选择性

为了表明 SM_2 -MIP 对 SM_2 的选择性吸附性能, 本实验选择了 4 种与模板分子 SM_2 结构相似的磺胺为底物, 分别用制备好的 SM_2 -MIP/NIP 聚合物对 SM_2 、SG、SDM、ST 的 25 mg/L 的标准溶液进行吸附实验, 测定其吸光度值, 结果如图 8 所示。由图 8 可见, 从吸附量 Q 来看, SM_2 -MIP 对 SM_2 的吸附量最大, 对 SDM、ST、SG 的吸附量逐渐降低。这是由于 SDM 与 SM_2 的空间构型最相似, 与 MIP 的印迹空穴能够形成良好的互补作用^[16]。ST、SG 与 SM_2 的空间构型相似度不如 SDM, 与印迹空穴的互补程度较差, 所以吸附量较低。比较 4 组吸附体系, MIP 与 NIP 均存在一定的吸附差异, 表明 MIP 与 NIP 在空间结构上确实存在差异。

2.7 重复利用性

将吸附达到饱和后的 MIP/NIP 用 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸})=9:1$ 进行洗脱, 直至洗脱后上清液用紫外分光光度计检测不出 SM_2 为止。真空干燥后再次吸附 25 mg/L 的 SM_2 溶液, 多次重复利用后, 测定其吸附能力的变化, 结果如图 9 所示。由图 9 可见, SM_2 -MIP 经过 4 次洗脱后, 依然有良好的选择性吸附能力, 但是随着洗脱次数的增加, MIP 的吸附能力有所下降, 可能是由于 MIP 的印迹空穴在洗脱过程中被破坏, 导致其选择性吸附减弱。NIP 在 4 次洗脱后, 其吸附能力基本不变, 这是由于其不存在印迹空穴, 洗脱对其吸附能力基本没有影响。

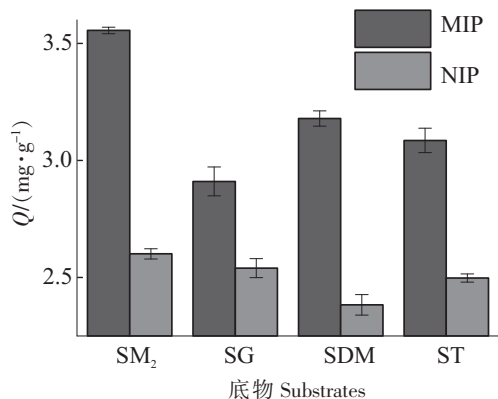


图 8 不同底物下的聚合物吸附量

Fig.8 The adsorption of different substrates on polymer

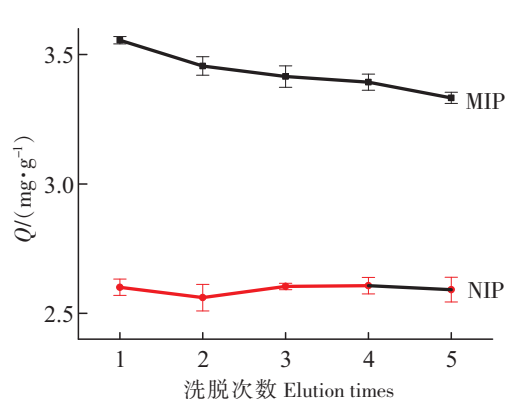


图 9 聚合物的重复利用性

Fig.9 Reusability of polymers

3 结论

本文采用沉淀聚合法, 以 SM_2 为模板分子, MAA 为功能单体, EGDMA 为交联剂, 制备了 SM_2 分子印迹聚合物, 并对其吸附性能进行了研究。结果表明, 在一定浓度范围内, 聚合物的吸附量 Q 与吸附液质量浓度 C 有一定的线性关系, 线性方程为: $Q = 0.1451C + 0.2271$, $R^2 = 0.9979$ 。并且制备的聚合物对 SM_2 有着良好的选择吸附性和重复利用性, 洗脱 5 次依然具有良好的选择性。

[参考文献]

- [1] 李芳, 康怀彬, 张瑞华, 等. 食品中农兽药残留生物传感检测技术的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2017(4): 354-358.
- [2] XU W J, SU S F, JIANG P, et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(46): 7198-7207. DOI:10.1016/j.chroma.2010.09.035.
- [3] 黄镭, 刘森, 熊州翼, 等. 鸡蛋中磺胺类药物的分子印迹聚合物的制备及性能研究 [J]. 肉类研究, 2010(10): 49-53.

- [4] 刘慧君, 项伟中, 徐伟箭, 等. 磺胺二甲嘧啶分子印迹聚合物的合成及其识别性能 [J]. 应用化学, 2005, 22(1): 83-86.
- [5] BLASCO C, YOLANDA P, TORRES C M. Progress in analysis of residual antibacterials in food [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(9): 895-913. DOI:10.1016/j.trac.2007.08.001.
- [6] PEÑA A M D L, DIEZ N M, GARCIA M C, et al. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in honey samples [J]. Talanta, 2007, 73(2): 304-313.
- [7] 韩霜. 分子印迹技术及其研究进展 [D]. 大庆: 东北石油大学, 2014.
- [8] CHEN L X, WANG X Y, LU W H, et al. Molecular imprinting: perspectives and applications [J]. Chemical Society Reviews, 2016, 45(8): 2137-2211. DOI:10.1039/C6CS00061D.
- [9] 李玲, 赵晓磊, 王璇, 等. 分子印迹固相萃取高效液相色谱联用检测猪肉中的磺胺类兽药残留 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 249-255.
- [10] 魏晓兵. 新型分子印迹复合材料的制备及对磺胺类药物残留检测研究 [D]. 天津: 天津大学, 2017.
- [11] 彭爱红, 王茜雅, 林郑忠, 等. 鱼肉中 LMG 的分子印迹仿生 ELISA 检测方法 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2019, 24(1): 19-24.
- [12] ZHOU J, HE X W. Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymer selective for 2-aminopyridine [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 381(1): 85-91. DOI:10.1016/S0003-2670(98)00716-8.
- [13] 苏立强, 邹雪莹, 滕跃. 可逆加成-断裂链转移沉淀法制备对羟基苯甲酸丁酯分子印迹聚合物及其应用 [J]. 分析科学学报, 2018, 34(6): 757-761.
- [14] 赵琪. 分子印迹复合材料的制备及用于食品和环境样品中污染物快速检测的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [15] WEI X B, ZHANG Z R, ZHANG L F, et al. Synthesis of molecularly imprinted polymers/ NiCo_2O_4 nanoneedle arrays on 3D graphene electrode for determination of sulfadimidine residue in food [J]. Journal of Materials Science, 2019, 54(3): 2066-2078. DOI:10.1007/s10853-018-2975-z.
- [16] SPIELMEYER A, STAHL F, PETRI M S, et al. Transformation of sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation of liquid manure [J]. Journal of Environmental Quality, 2016, 46(1): 160-168. DOI:10.2134/jeq2016.04.0152.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)