

## 【化学测定方法】

## 两类三聚氰胺分子印迹聚合物性能比较研究及应用

程健琳<sup>1</sup>, 吕昌银<sup>1\*</sup>, 严成艳<sup>1</sup>, 冯伟<sup>1</sup>, 刘运美<sup>2</sup>

(1 南华大学公共卫生学院, 湖南衡阳 421001; 2 南华大学药学与生命科学学院, 湖南衡阳 421001)

**[摘要]** 目的: 比较两类三聚氰胺分子印迹聚合物的性能及应用。方法: 以三聚氰胺为模板分子, 分别以  $\alpha$ -甲基丙烯酸和丙烯酰胺为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 60℃聚合 24 h, 制备了两种分子印迹聚合物。比较研究了它们对三聚氰胺的特异识别作用和氢键作用力大小; 同时研究了印迹聚合物固相萃取柱的应用。结果: 研究发现, 两类分子印迹聚合物对三聚氰胺都存在一类等价结合位点, 都具有特异性的识别作用; 用  $\alpha$ -甲基丙烯酸单体合成的印迹聚合物对模板分子的氢键作用力和结合能力更强; 用该分子印迹聚合物作固相萃取柱, 其液相色谱检测回收率 > 90%。对奶粉和液态奶提取液的加标回收率分别为 90.4% ~ 95.8%、91.5% ~ 92.7%。结论: 自制印迹聚合物固相萃取柱对牛奶样品预处理, 试剂用量少, 萃取回收时间短, 检测牛奶样品中三聚氰胺, 结果满意。

**[关键词]** 三聚氰胺; 分子印迹聚合物; 固相萃取; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R155.5+7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-8685(2011)01-0044-04

## Performance and application of the two types of molecularly imprinted polymers for melamine

CHENG Jian-lin<sup>1</sup>, Lü Chang-yin<sup>1\*</sup>, YAN Cheng-yan<sup>1</sup>, FENG Wei<sup>1</sup>, LIU Yun-mei<sup>2</sup>

(1. Department of Health Laboratory Technology, School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China)

(2. School of Life Science and Technology, University of South China, Hengyang 421001, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare performance and application of two types of melamine molecularly imprinted polymers. **Methods** The two molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized by polymerization for 24 h in 60°C using  $\alpha$ -methyl acrylic acid (MAA) and acrylamide (AM) as the function monomer respectively, melamine as the template molecule, ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker agent and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as the initiator. The specific identification function and the hydrogen bonding force to melamine and the application of molecularly imprinted solid phase extraction column were studied. **Results** The two polymers could specially recognize melamine. The results studied of equilibrium binding experiment showed that the interaction between the hydrogen bonds of melamine and MAA was stronger than that of melamine and AM, and the prepared polymer with MAA as functional monomer showed stronger and better binding ability to melamine. In addition, the melamine molecularly imprinted polymer with MAA as functional monomer was grinded, sieved, washed and packed into cartridges. The recovery of the solid phase extraction (SPE) pillar was more than 90% testing by HPLC. The recoveries of melamine from milk powder and milk were in the range of 90.4% ~ 95.8% and 91.5% ~ 92.7%, respectively. **Conclusion** The samples were pretreated according to the solid phase extraction column to carry out the detection of real milk. The MIPs-SPE pillar got higher recovery, less reagent and shorter time. Satisfactory result was obtained for the determination of melamine in sample.

**[Key words]** Melamine; Molecularly imprinted polymer; Solid phase extraction; HPLC

分子印迹技术 (molecular imprinting technique, MIT) 是指制备对某一特定的模板分子 (目标分子、印迹分子或烙印分子) 具有特异选择性的聚合物的过程<sup>[1]</sup>。在聚合物制备过程中, 模板分子通过离子键、氢键等作用确定了分子印迹聚合物 (molecular imprinting polymer, MIP) 基质孔穴的形状、大小, 确定了聚合物功能基团的取向, 使聚合物分子结构中形成许多

作用位点, 从而对模板分子保持特殊的“记忆”, 具有预定识别的高度选择性<sup>[1]</sup>。目前, MIT 已应用于色谱分析<sup>[2-3]</sup>、固相萃取<sup>[4-6]</sup>、传感器<sup>[7]</sup>和模拟酶<sup>[8]</sup>等研究。

三聚氰胺 (melamine), 俗称蜜胺, 是一种白色或无色晶体, 通常用于塑料制品中合成树脂的生产, 在高温和酸性条件下能引起三聚氰胺转移到食品中。不法分子在高蛋白食品中非法添加三聚氰胺, 可以提高含氮量, 从而降低成本。

目前测定食品中三聚氰胺的检测方法包括气相色谱<sup>[9]</sup>、气相色谱-质谱法 (GC-MS)<sup>[10-11]</sup>、高效液相色谱-紫外或二极管阵列和串联质谱 (HPLC-UV, DAD, MS/MS)<sup>[12-14]</sup> 等检测方法。GC-MS 需要衍生化, 过程比较繁琐。HPLC-UV 或 DAD 由于其无需衍生化是目前最为常用的检测方法。由于生

**[基金项目]** 湖南省科技计划 (2009FJ3067) 项目资助

**[作者简介]** 程健琳 (1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事卫生检验新方法新技术研究。

\* 通讯联系人, E-mail: lchy1953@163.com

物样品奶制品基质比较复杂,三聚氰胺在其中的浓度低,富集、净化等样品前处理显得尤其重要。

本研究在极性溶液中采用本体聚合法制备了三聚氰胺分子印迹聚合物,并制备成固相萃取柱。在相同实验条件下,与  $C_{18}$ 固相萃取柱进行比较,分子印迹聚合物固相萃取柱的回收率更好,所用试剂用量少,萃取回收时间短。用该方法检测奶制品中三聚氰胺,结果满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Dionex P680高效液相色谱仪(美国戴安公司,配紫外检测器); HH-4型数显电子恒温水浴锅(金坛市晶玻实验仪器厂); BF-2000氮气吹干仪(湖南八方世纪公司); PB-21型精密酸度计; KQ-250B超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); ZK-82型电热真空干燥箱(上海实验仪器有限公司); 离心机; 恒温振荡器等。

三聚氰胺 (>99%, Me1 上海晶纯试剂公司),  $\alpha$ -甲基丙烯酸(MAA, 分析纯, 北京大田丰拓化学技术有限公司); 丙烯酰胺(AM, 化学纯, 上海山浦化工有限公司); 偶氮二异丁腈(AIBN, 化学纯, 上海山浦化工有限公司); 乙二醇二(甲基丙烯酸)酯(EGDMA, 98%, 北京大田丰拓化学技术有限公司); 其它试剂均为分析纯。

### 1.2 三聚氰胺分子印迹聚合物的制备

1.2.1 以 MAA 为功能单体的印迹聚合物(MIP)和非印迹聚合物(NIP)的制备 取 1 mmol 三聚氰胺溶于一定量的乙醇-水(5:1, v/v)溶液中,加入 4 mmol MAA 和 30 mmol EGDMA 至 25 ml 安瓿瓶中,超声混匀,于恒温振荡器上 45℃ 振荡过夜,使三聚氰胺与 MAA 充分作用。加入 0.25 mmol AIBN, 超声混匀,通  $N_2$  10 min~15 min 以除去体系中的  $O_2$ , 密封。在 60℃ 水浴中反应 24 h 生成棒状聚合物。将聚合物用机械法研磨,过 400 目标准筛,得 37  $\mu$ m 颗粒,用丙酮悬浮除去悬浮粉末。用甲醇:乙酸 = 90:10 (V/V) 溶剂,索氏提取法洗脱模板分子三聚氰胺、未能聚合的功能单体 MAA 和交联剂 EGDMA,之后再用甲醇洗掉残留的乙酸。洗涤过程中,用液相色谱法检测洗脱液,直至未能检测到模板分子为止。将处理好的印迹聚合物置于 60℃ 干燥箱中干燥 24 h 制得以 MAA 为功能单体的三聚氰胺印迹聚合物。

在结合反应时,不加入三聚氰胺模板分子,其它按照以上完全相同的操作进行合成和后续处理,制备非印迹聚合物(non-imprinted polymer NIP)。

1.2.2 以 AM 为功能单体的印迹聚合物(MIP)与非印迹聚合物(NIP)的制备 用丙烯酰胺代替 MAA 作为功能单体,称取 1 mmol 丙烯酰胺,按照“1.2.1”中的方法操作,制备另一种三聚氰胺分子印迹聚合物(MIP)。不加模板分子三聚氰胺,同前操作,制得非印迹聚合物(NIP)。

### 1.3 分子印迹聚合物结合能力研究

称取 20.0 mg MIP 于安瓿瓶中,分别加入 5 ml 不同浓度(0.08 mmol/L~0.80 mmol/L)的三聚氰胺-甲醇水溶液,放入恒温振荡器中室温下振荡 12 h 离心,取上清液,经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,用 HPLC 测定所得溶液中三聚氰胺的含量,根据吸附前后溶液浓度的变化计算聚合物对三聚氰胺的吸附量  $Q_t$ ; 根据  $Q_t$  值绘制三聚氰胺与分子印迹聚合物的结合等温线和 Scatchard 图,计算出最大吸附量  $Q_{max}$  及平衡解离常数  $K_d$ , 评价印

迹聚合物的结合性能。

### 1.4 分子印迹聚合物萃取柱的制备和性能研究

称取三聚氰胺印迹聚合物粉末 200 mg 干法装柱,装入容量为 3 ml 固相萃取空柱中,两端分别用滤膜垫片堵住,装填均匀后依次用 3 ml 甲醇、3 ml 去离子水、2 ml 50  $\mu$ g/ml 三聚氰胺的甲醇水溶液、3 ml 水、5 ml 甲醇、5 ml 含 5% 乙酸的甲醇溶液或含 5% 氨水的甲醇溶液过柱,收集洗脱液,用  $N_2$  吹干,滤渣用流动相溶解并定容至 1 ml 用 HPLC 检测。

### 1.5 MIPs 柱与 $C_{18}$ 柱对奶制品中三聚氰胺提取的比较研究

取 1.4 中制得的 MIPs 柱,先用 3 ml 甲醇和 3 ml 去离子水活化柱子,再将 2 ml 50  $\mu$ g/ml 三聚氰胺甲醇水溶液以 0.2 ml/min 的流速过柱,然后用 3 ml 去离子水和 3 ml 甲醇以同样的速度淋洗,三聚氰胺用 3 ml 含 5% 乙酸的甲醇溶液洗脱。洗脱液用  $N_2$  吹干,用流动相重新溶解,并定容至 1 ml 再用 HPLC 检测,平行测定 3 次。

市售的  $C_{18}$  固相萃取柱(Ampelclean, SBAA-1102003),处理方法参考国标法<sup>[15]</sup>,样品平行测定 3 次。

### 1.6 三聚氰胺检测方法

色谱柱: Kromasil  $C_{18}$  柱, 5  $\mu$ m, 150  $\times$  4.6 mm; 流动相: 10 mmol/L 辛酸磺酸钠 + 10 mmol/L 柠檬酸(调 pH 3.0) - 甲醇 = 75:25 (V/V); 流速: 1.0 ml/min 进样量 20  $\mu$ l 检测波长 235 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模板分子与功能单体的作用机理

应用 UV-Vis 光谱分析方法,比较研究了 MAA、AM 两种不同功能单体与模板分子三聚氰胺之间作用力的大小,结果见图 1a、1b。结果显示,随着体系中单体比例的增大,体系吸收光谱最大吸收峰向长波移动,即发生红移,吸光度值逐渐减小。说明单体与模板之间发生了非共价作用,影响了三聚氰胺的紫外光谱图。结合三聚氰胺、MAA 及 AM 的分子结构特点推测,三聚氰胺是通过非共价作用力(氢键、静电作用等)与 MAA 间形成具有可逆特性的三聚氰胺 MIPs。如图 2 所示,一个三聚氰胺分子中的三对氨基和杂环 N,可同时与三个 MAA 分子羧基形成六个氢键,组成三个新的八元环,并与一个 p- $\pi$  共轭的六元环处于同一平面,构成由 24 个原子形成的大平面,从而形成分子结构印迹,经过交联形成三聚氰胺 MIPs。同理,三聚氰胺分子与 AM 分子也可形成氢键,进而形成类似分子印迹聚合物(图 3)。

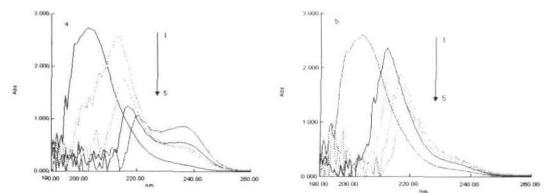


图 1 预聚合溶液中三聚氰胺的紫外吸收图谱

### 2.2 分子印迹聚合物对底物吸附性能研究

按照表 1 分别制备了 6 组 MIP 和 NIP,用“1.3”方法测定了作用后聚合物的饱和吸附量,应用平衡结合实验,评价了它们对模板分子的识别能力。对比表 1 结果可知,①MIP 对模板分子 Me1 的吸附量明显大于 NIP 的吸附量, MIP 对模板分子 Me1 表现出良好的选择性。②用 MAA 单体制备的 MIP(NIP)对模板分子的吸附量大,用 AM 单体制备的 MIP(NIP)吸附量

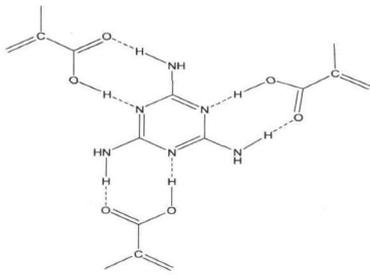


图2 三聚氰胺与MAA相互作用示意图

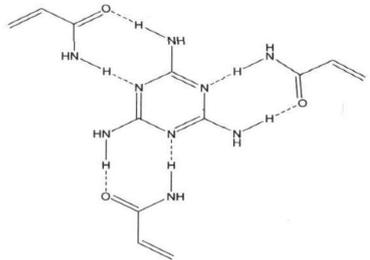


图3 三聚氰胺与AM相互作用示意图

小。这可能是因为O原子的电负性较N原子的大,以致-OH中的H比-NH中的H与六元环上N原子的氢键键合力更强。③模板分子含量一定时,单体含量比例不同,对应MIP、NIP对MeI的吸附量也不同。但分析MIP11、MIP12和MIP13发现,虽然MAA含量成倍改变,但对MeI的吸附量为91.27~93.62,仅仅改变2.5%。这表明MIP1对模板分子MeI吸附能力强,当MAA含量适量时,MeI与MAA可迅速形成图2所示的1:3结构,达到饱和结构。④从表中可知,以MAA为单体制备的印迹聚合物MIP13的特异性吸附量最大。这可能是因为MAA含量最高,模板分子三聚氰胺反应最完全,形成的三聚氰胺分子印迹聚合物就最多。

表1 三聚氰胺分子印迹聚合物的组成及印迹效果评价

聚合物	三聚氰胺 (mmol)	MAA (mmol)	AM (mmol)	EGDMA (mmol)	吸附量 Q ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$\Delta Q$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )
MIP11	0.5	2.0	-	15	93.62	-
NIP11	-	2.0	-	15	53.06	40.56
MIP12	0.5	4.0	-	15	91.27	-
NIP12	-	4.0	-	15	60.82	30.45
MIP13	0.5	6.0	-	15	92.42	-
NIP13	-	6.0	-	15	20.37	72.05
MIP21	0.5	-	2.0	15	77.04	-
NIP21	-	-	2.0	15	12.94	64.09
MIP22	0.5	-	4.0	15	63.66	-
NIP22	-	-	4.0	15	30.10	33.56
MIP23	0.5	-	6.0	15	54.79	-
NIP23	-	-	6.0	15	2.82	51.97

### 2.3 分子印迹聚合物结合特性分析

2.3.1 结合动力学分析 分别称取20 mg MIP13和NIP13聚合物于安瓿瓶中,然后加入10 mL 0.64 mmol L<sup>-1</sup>的三聚氰胺标准溶液,于25℃恒温振荡器中作用,每隔一段时间,取出1 mL溶液测定聚合物的饱和情况,记录三聚氰胺吸附量与吸附时间之间的变化曲线。由图4可知,在前10个小时内,MIP13

的三聚氰胺吸附量迅速增加,之后其吸附量逐渐增大,最终接近饱和。其原因可能在于分子印迹聚合物表面和内部都有基质孔穴,之初,主要是表面孔穴发生吸附作用,空间阻碍小,与模板分子结合快;随着表面孔穴的饱和,由于空间位阻的原因,模板分子进入内部孔穴结合的速度变慢,导致吸附速度增加缓慢,吸附量变化较小。

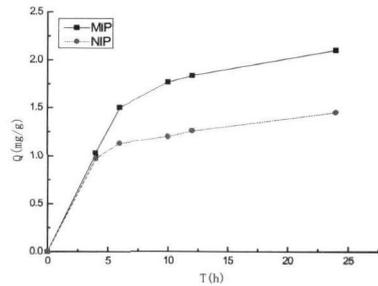


图4 三聚氰胺分子印迹聚合物的结合动力学曲线

2.3.2 结合热力学分析 为了比较MAA和AM制备的印迹聚合物的结合特性,在相同实验条件下,用平衡结合实验的方法测定了分别以MAA和AM为功能单体制备的印迹聚合物的结合量Q对不同三聚氰胺吸附液的初始浓度的变化曲线,如图5、图6所示。由图可知,在实验的各个浓度范围内,MIP比NIP可以结合更多的三聚氰胺,并且随着起始浓度的增加,MIP结合三聚氰胺的量增加的速度比NIP快很多。

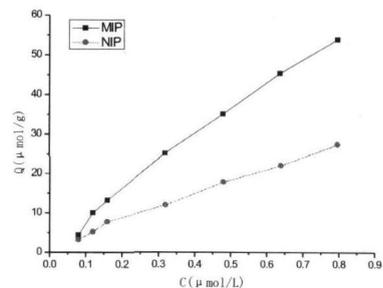


图5 MIP13及NIP13的吸附等温曲线

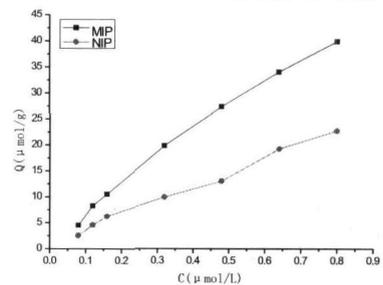


图6 MIP21及NIP21的吸附等温曲线

Scatchard方程分析常被用来评价聚合物的结合特性<sup>[16]</sup>,本实验将MIP13和MIP21的结合等温线数据按照Scatchard方程进行整理并作图,考察聚合物对三聚氰胺的结合情况。Scatchard方程:

$$Q/C = (Q_{\max} - Q)/K_d$$

式中,Q是键合容量, $\mu\text{mol g}^{-1}$ ;C是模板分子的平衡浓度, $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $Q_{\max}$ 是结合位点的最大表现结合量, $\mu\text{mol g}^{-1}$ ;  $K_d$ 是结合位点的平衡解离常数, $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。Q/C-Q图见图7和图8。

由图7可知,Q/C-Q呈现良好的线性关系,反映MIP-

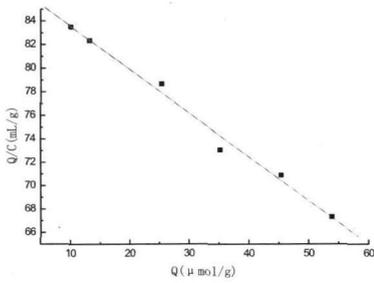


图7 聚合物 MIP13 的 Scatchard 曲线

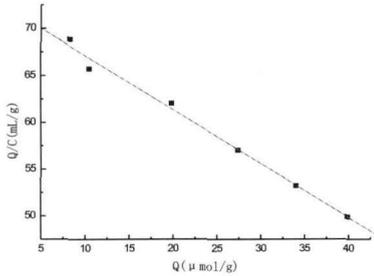


图8 聚合物 MIP21 的 Scatchard 曲线

MeI对 MeI的结合位点是等价的,表明 MIP 中存在一类等价的结合位点,对三聚氰胺呈现均匀的亲和力,这是分子印迹聚合物模板效应的体现,属于选择性吸附。对图 7 中数据进行拟合,得拟合线性方程:  $Q/C = -0.37Q + 87.25 (r = 0.9900)$ 。由线性方程的斜率和截距可以计算出:  $K_d = 2.70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $Q_{\text{max}} = 235.58 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

同理,由图 8 可知,  $Q/C - Q$  对图中数据进行拟合,得拟合线性方程:  $Q/C = -0.58Q + 72.88 (r = 0.9921)$ 。由线性方程的斜率和截距可以计算出:  $K_d = 1.72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $Q_{\text{max}} = 125.35 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

通过分析图 7、图 8 可知, MIP13 比 MIP21 对三聚氰胺具有更好的吸附性能, Scatchard 方程分析也表明, MAA 是一种更好的功能单体,这与前面的吸附实验结果一致。

2.4 MIP13 柱与 C<sub>18</sub> 柱的萃取效果比较

比较了 MIP13 柱与 C<sub>18</sub> 柱的萃取效果,前者所用洗脱剂用量明显少于后者,且取得了满意的回收率(见表 2)。

MIP13 柱的填充物是以目标分子为模板合成的聚合物,经洗脱后留下对目标分子具有特异性结合的空穴,因此对目标分子有特异性吸附,而且是以较弱的化学键相互作用的。C<sub>18</sub> 柱则是基于简单的物理吸附,因此 MIP13 柱吸附目标分子更有选择性<sup>[17]</sup>。

表 2 MIP13 柱与 C<sub>18</sub> 柱的萃取效果比较

萃取柱	流出液中三聚氰胺含量 (μg)	洗脱剂用量 (ml)	回收率 (%)
MIP13 column	ND	3	90.5
C <sub>18</sub> column	ND	5	87.2

注: ND: Not detected

2.5 应用

采用此方法对奶制品的样品加标液进行固相萃取,高效液相色谱法检测,平行测定 3 次。过柱后流出液中均未检出三聚氰胺,洗脱液中检出三聚氰胺的加标回收率结果满意(见表 3)。

表 3 不同样品过 MIP13 柱及 NIP13 柱后洗脱液的回收率和 RSD (n = 3)

样品	平均回收率 (%) / RSD%			
	加标量 40 μg		加标量 100 μg	
	MIP	NP	MIP	NP
样品 1(奶粉)	95.8/7.1	8.5/9.3	90.4/6.4	7.9/15
样品 2(液态奶)	91.5/4.9	10.2/20	92.7/5.8	10.3/10

[参考文献]

[1] 姜忠义, 吴洪. 分子印迹技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 1.

[2] Huang XD, Zou HF, Chen XM, et al. Molecularly imprinted monolithic stationary phases for liquid chromatographic separation of enantiomers and diastereomers [J]. J Chromatogr A, 2003, 984(2): 273-282.

[3] Djazan D, Ebrahim iB. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecularly imprinted polymer. Application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion [J]. Anal Chim Acta, 2008, 616(2): 152-159.

[4] 蔡亚歧, 牟世芬. 分子印迹固相萃取及其应用 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 116-121.

[5] Mohell IA, Weiss R, Miziloff B. Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(7): 1804-1808.

[6] Tamayo FG, Martin-Esteban A. Selective high performance liquid chromatography in printed-stationary phase for the screening of phenylurea herbicides in vegetable samples [J]. J Chromatography A, 2005, 1098(1-2): 116-122.

[7] Pesavento M, D'Agostino G, Biazzi R, et al. Molecularly imprinted polymer-based sensors for amperometric determination of nonelectroactive substances [J]. Electroanalysis, 2009, 21(3-5): 604-611.

[8] Amalric L, Moutet C, Pichon V, et al. Molecularly imprinted polymer applied to the determination of the residual mass of atrazine and metabolites within an agricultural catchment [J]. J Chromatography A, 2008, 1206(2): 95-104.

[9] 吴惠勤, 黄芳, 林晓珊, 等. 气相色谱质谱法测定奶粉及奶制品中的三聚氰胺 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(10): 1044-1048.

[10] 朱馨乐, 刘琪, 李丹, 等. 气相色谱-质谱法测定鸡肉中残留的环丙胺嗪及其代谢物三聚氰胺 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 401-405.

[11] Xi Xia, Shuangyang Ding, Xiaowei Li, et al. Validation of a confirmatory method for the determination of melamine in egg by gas chromatography-mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytica chimica Acta, 2009, 651: 196-200.

[12] 何乔桑, 刘敏芳, 黄丽英, 等. 高效液相色谱法测定奶粉和液态奶中的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26(6): 752-754.

[13] WU Qingqing, FAN KeXin, SHA Wei, et al. Highly sensitive detection of melamine based on reversed phase liquid chromatography mass spectrometry [J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(5): 732-737.

[14] 丁涛, 徐锦忠, 李健忠, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法及高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26(1): 6-9.

[15] GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-12.

[16] JMatsuji Y, Miyoshi O, Dohhoff-Dier, et al. A molecularly imprinted synthetic polymer receptor selective for atrazine [J]. Anal Chem, 1995, 67(23): 4404-4408.

[17] 王颜红, 霍佳平, 张红, 等. 阿特拉津分子印迹固相萃取柱的制备及应用 [J]. 分析化学, 2010, 38(5): 678-682.

(收稿日期: 2010-10-21)