

气质联用法测定叶菜类蔬菜中的氟虫腈及其代谢物残留量

方丽, 林晨, 王李平, 张方圆, 林泽鹏, 李雪莹, 潘云山 (广东省科学院, 广东省测试分析研究所(中国广州分析测试中心), 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东省保健食品功效成分检测与风险物质快速筛查工程技术研究中心, 广东广州 510070)

摘要 [目的]建立叶菜类蔬菜中氟虫腈及其代谢物残留量的气相色谱-质谱联用法。[方法]样品经乙腈萃取, N-丙基乙二胺键合硅胶固相萃取柱净化, 采用气相色谱-质谱仪进行确认和定量。[结果]氟虫腈及其代谢物在 0.005~0.500 μg/mL 范围内呈良好线性关系 ($R^2>0.999$), 方法检出限为 0.5 μg/kg, 定量限为 2 μg/kg; 氟虫腈及其代谢物的回收率为 81.06%~107.1%, 精密密度为 4.66%~18.90%。通过对 100 批次 5 种常见市售叶菜类蔬菜的筛查, 阳性主要为小白菜。[结论]该方法灵敏度高, 定性及定量准确, 适用于叶菜类蔬菜中氟虫腈及其代谢物残留量的测定。
关键词 氟虫腈; 氟虫腈代谢物; 叶菜类蔬菜; 气相色谱-质谱联用仪; 残留量
中图分类号 TS 207.5*3 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2020)17-0206-04
doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.17.053



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Determination of Fipronil and Its Metabolites Pesticide Residues in Leaf Vegetables by GC-MS
FANG Li, LIN Chen, WANG Li-ping et al (Guangdong Provincial Engineering Research Center for Efficacy Component Testing and Risk Substance Rapid Screening of Health Food, Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, Guangdong Institute of Analysis (China National Analytical Center Guangzhou), Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510070)
Abstract [Objective] The study established determination method of fipronil and its metabolite residues in leafy vegetables by GC-MS. [Method] The sample was extracted by acetonitrile, purified with N-propyl ethylenediamine bonded silica SPE column (PSA), confirmed and quantified by GC-MS. [Result] The fipronil and its metabolite showed good linear relationship ($R^2>0.999$) in the concentration range of 0.005-0.500 μg/mL. The method detection limit (MDL) was 0.5 μg/kg, the limit of quantification (LOQ) was 2 μg/kg; the recovery rate of fipronil and its metabolites were 81.06%-107.1%, the precision were 4.66%-18.90%. Through the detection of 100 batches leafy vegetables, the positive samples were Pakchoi. [Conclusion] The method has the advantages of high sensitivity, quantitative and qualitative accuracy, and it is suitable for the detection of fipronil and its metabolite residues in leafy vegetables.
Key words Fipronil; Fipronil metabolites; Leafy vegetables; GC-MS; Residue

氟虫腈(Fipronil)俗称锐劲特(Regent),是由法国罗纳-普朗克公司(Rhone-Poulenc)开发的一种高活性苯基吡唑类杀虫剂。其杀虫机理是阻碍昆虫γ-氨基丁酸控制的氯化物代谢,破坏昆虫的中枢神经系统,引起其神经和肌肉过度兴奋直至死亡^[1-2]。氟虫腈对蝇类、半翅目、鳞翅目和鞘翅目害虫有较高的杀虫活性,对氨基甲酸酯类、环戊二烯类及菊酯类杀虫剂已产生抗性的害虫也显示出很高的敏感性^[3-4]。氟虫腈自1994年引入我国后,已被大范围地用于防治水稻、蔬菜和果树等作物的害虫,并于2007年成为国家农业部公布的第1批替代禁用高毒农药的首推产品,但是其对环境不友好,在土壤和水中的降解缓慢,且对甲壳类水生生物、蝴蝶、蜜蜂、蜻蜓等具有高风险。2009年10月1日,氟虫腈就被列为(禁)限用农药,仅能用于卫生杀虫、玉米等部分旱田种子包衣剂和专供出口产品^[5]。氟虫腈施用后进入环境,通常会分解产生4种代谢物——光解产物氟甲腈(MB46513)、氧化产物氟虫腈砒(MB46136)、还原产物氟虫腈硫醚(MB45950)、水解产物氟虫腈酰胺(RPA200766),转化条件及物质结构式见图1。当pH>9时,氟虫腈水解缓慢,产生氟虫腈酰胺,其代谢物一般为氟甲腈、氟虫腈砒及氟虫腈硫醚。故笔者基于氟虫腈及其3种代谢物氟甲腈、氟虫腈

砒及氟虫腈硫醚,开展了该研究。

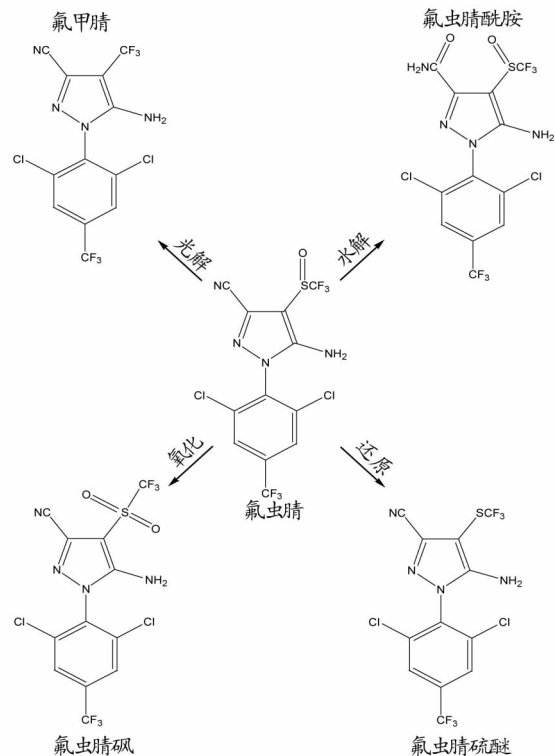


图1 氟虫腈降解及代谢主要途径

Fig.1 The main routes of degradation and metabolism of fipronil

目前,检测氟虫腈残留量的常见方法包括气相色谱-电

子捕获检测法(GC-ECD)^[6-7]液相色谱法(LC)^[8-9]、气相色谱-质谱法^[10-12]、液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)^[13-15]。《GB 2763—2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中,氟虫腈残留物是以氟虫腈、氟甲腈、氟虫腈砒、氟虫腈亚砒之和计^[16]。现行国标《GB 23200.8—2016 食品安全国家标准 水果和蔬菜中500种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法》仅包含了氟虫腈,且定量限为0.1 mg/kg,高于GB 2763中氟虫腈限量0.02 mg/kg的要求。尽管《SN/T 1982—2007 进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》氟虫腈测定低限为0.002 mg/kg能够满足限量要求,但该方法也只包含了氟虫腈,且采用负化学电离(CI),该电离源的使用远不及EI普遍。

笔者采用气质联用仪对叶菜类蔬菜中的氟虫腈及其3种代谢物残留量进行测定,优化了萃取条件、净化方式以及仪器参数,建立了气质联用法测定叶菜类蔬菜中的氟虫腈及其代谢物残留量,并对叶菜类蔬菜进行了初步筛查和相关统计。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂。乙腈(色谱纯,Honeywell);丙酮(色谱纯,Honeywell);正己烷(色谱纯,Honeywell);乙酸乙酯(色谱纯,Honeywell);氯化钠(分析纯,广试);无水硫酸钠(分析纯,广试,在650℃下灼烧4 h,贮存于干燥器中,冷却备用);固相萃取柱,规格为1 000 mg/6 mL,填料分别为氨丙基键合硅胶(NH₂)、二醇基键合硅胶(Diol)、N-丙基乙二胺键合硅胶(PSA,SHIMADZU/岛津);QuEChERS(上海安谱)。

1.1.2 标准品。氟虫腈(Fipronil,CAS No.:120068-37-3,100 μg/mL于甲醇溶液,农业部环境保护科研监测所);氟甲腈(Fipronil-desulfinyl,CAS No.:205650-65-3,100 μg/mL于丙酮溶液,农业部环境保护科研监测所);氟虫腈硫醚(即氟虫腈亚砒,Fipronil-sulfide,CAS No.:120067-83-6,99.5%,Dr. Ehrenstorfer);氟虫腈砒(Fipronil-sulfone,CAS No.:120068-36-2,98.5%,Dr. Ehrenstorfer)。

1.1.3 样品。叶菜类蔬菜,包括大白菜、小白菜、菠菜、芹菜、油菜。

1.2 仪器设备 气相色谱-质谱联用仪(配有电子轰击源)(Agilent 7890A-5975C,美国安捷伦科技公司)、食品料理机(E320,美国Vitamix)、氮吹仪(N-EVAP 112,美国Organomation)、移液器(Gilson,美国吉尔森)、电子天平(Sartorius,德国赛多利斯)、均质机(IKA T18,德国艾卡)、高速冷冻离心机(CF 16RXII,日本Hitachi)、离心管(50 mL,美国Labcon)、BOMEX浓缩瓶(50 mL,刻度1 mL,北京博美玻璃有限公司)、塑料滴管(3 mL,环凯微生物科技有限公司)。

1.3 样品的制备

1.3.1 预处理。蔬菜去除根,取整棵,于无色、清洁的聚乙烯塑料薄膜上,切碎,充分混匀后,放入食品料理机中捣碎成匀浆,收集在密封袋中做好标识,备用。

1.3.2 提取。称取10 g(精确至0.001 g)制备样于50 mL离

心管中,加入20 mL乙腈,用均质机在10 000 r/min下匀浆提取1 min,加入3 g氯化钠,再匀浆1 min;4℃下10 000 r/min冷冻离心5 min后,取10 mL上层清液,加入3 g无水硫酸钠,涡旋30 s后静置10 min,过滤,并用5 mL的乙腈分两次洗涤残渣,50℃水浴下氮吹至近干。

1.3.3 净化。用5 mL丙酮+正己烷(3:7,体积比)活化PSA固相萃取柱,在样液瓶中加入1 mL丙酮+正己烷(3:7,体积比),涡旋1 min后,转移至活化后的PSA固相萃取柱;再分3次,每次用3 mL丙酮+正己烷(3:7,体积比)洗涤样液瓶,并将洗涤液移入柱中,收集所有流出液于浓缩瓶中,50℃水浴下氮吹浓缩至1 mL。

1.4 标准品的制备 分别准确称取氟虫腈硫醚、氟虫腈砒0.05 g至50 mL容量瓶中,用甲醇定容至50 mL,配置成1 000 μg/mL的标准储备液;分别移取氟虫腈硫醚、氟虫腈砒的标准储备液(1 000 μg/mL)各0.10 mL,氟虫腈、氟甲腈(100 μg/mL)各1.0 mL至50 mL的容量瓶中,用甲醇定容至50 mL,配制成2 μg/mL的混标溶液;再依次分别取0.025、0.050、0.250、0.500、1.000、2.500 mL的混标溶液至10 mL容量瓶中,定容至10 mL,配制成0.005、0.010、0.050、0.100、0.200、0.500 μg/mL作为标准溶液的工作曲线。

1.5 分析条件

1.5.1 色谱条件。色谱柱:DB-5MS UI(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样体积:1 μL;进样口温度:250℃;进样模式:脉冲不分流;载气:高纯He,纯度99.999%;流速:1.2 mL/min;升温程序:80℃(保持1 min),20℃/min升温至160℃,5℃/min升温至230℃,30℃/min升温至280℃后运行2 min。

1.5.2 质谱条件。离子源:电子轰击式离子源(EI,70 eV);传输线温度:280℃;离子源温度:230℃;四极杆温度:150℃;溶剂延迟:10 min;采集模式:选择离子监测(SIM),氟甲腈(388,333,369,213),氟虫腈硫醚(351,420,255,213),氟虫腈(367,369,213,255),氟虫腈砒(383,255,213,452),其中带下划线质核比(*m/z*)为定量离子,其余3个为定性离子。

2 结果与分析

2.1 色谱柱选择及条件优化 DB-5MS UI作为超高惰性非极性固定相色谱柱,由于固定相甲基硅氧烷骨架上接枝有5%的苯基,使其极性比以100%甲基聚硅氧烷作为固定相的SE-30稍高,该色谱柱具有良好的柱惰性、极低的柱流失和分离效率较高等优点。

由于氟虫腈及其代谢物性质较为接近,在色谱柱上的流出时间间隔较近,尤其是氟虫腈硫醚和氟虫腈,为了获得完全分离的色谱峰,使分离度 $R>1.5$,故在程序升温中部采取5℃/min慢速升温,待最后出峰的氟虫腈砒流出后,快速升温,赶出与固定相吸附较强的物质,防止柱污染,延长毛细管柱使用寿命。氟虫腈及其代谢物的总离子流图如图2所示。

2.2 萃取条件的选择与优化 由于氟虫腈在太阳光照下会缓慢降解,且在水溶液中经光照会快速分解,因此在整个试验过程中,采用避光操作。氟虫腈及其代谢物在溶剂中的溶

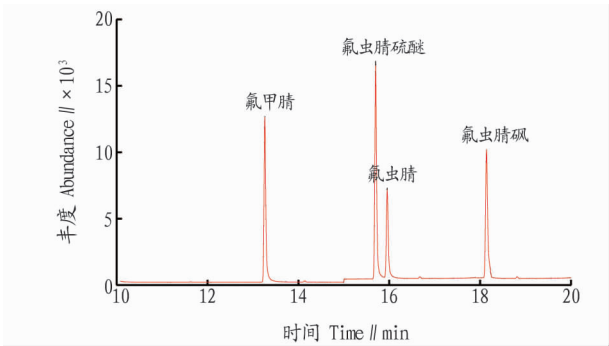


图2 氟虫腈及其代谢物总离子流图

Fig.2 TIC of fipronil and its metabolites

解性会随溶剂的极性降低而逐渐降低,该试验的测试对象为叶菜类蔬菜,含水量大,用极性大的溶剂进行萃取,需要进行盐析,而极性大的甲醇、乙醇在加入氯化钠后,不易于水相分层。因此,笔者采取在空白样品加入氟虫腈及其代谢物混合物标准溶液的方式,分别考察了乙腈、丙酮和乙酸乙酯3种萃取试剂的萃取效果,回收率如图3所示。

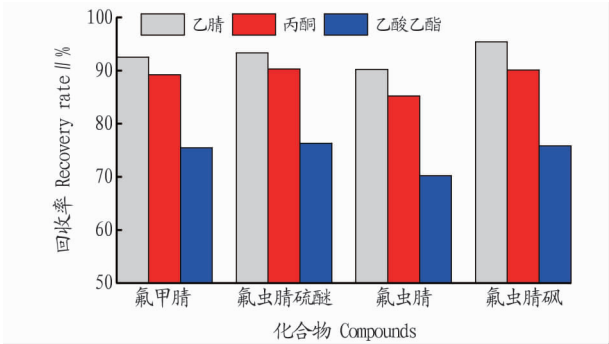


图3 不同萃取溶剂萃取效率比较

Fig.3 Comparison of extraction efficiency by different solvents

由图3可知,不同溶剂的萃取效率大小依次为乙腈>丙酮>乙酸乙酯,氟虫腈及其代谢物在乙酸乙酯中的溶解度相对较低,故其回收率小;采用乙腈和丙酮作为溶剂时,回收率差别不明显,但是采用丙酮作为溶剂时,样品的基线较高,影响目标物峰形,进而影响定量结果的准确性。因此,采用乙腈作为萃取溶剂对叶菜类蔬菜中的氟虫腈及其代谢物进行萃取。

2.3 净化条件的选择与优化 由于氟虫腈及其代谢物属于极性物质,考虑采用含有极性填料的固相萃取柱,以达到净化的目的。笔者分别考察了同种规格(1 000 mg,6 mL)、不同填料的固相萃取柱(Solid Phase extraction Cartridges, SPE),包括氨丙基键合硅胶(NH_2)、二醇基键合硅胶(Diol)、N-丙基乙二胺键合硅胶(PSA),同时考察了农产品检测的快速方法——QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)。采用向制备好的蔬菜样品中添加氟虫腈及其代谢物混标的方式,观察并比较4种不同的固相萃取柱净化效果及萃取效率,结果如图4所示。

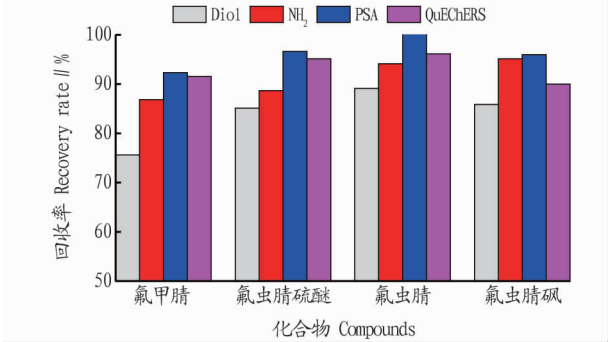


图4 不同SPE萃取效率比较

Fig.4 Comparison of extraction efficiency by different SPE

由图4可知,回收率大小依次为 $\text{PSA} > \text{QuEChERS} > \text{NH}_2 > \text{Diol}$ 。通过观察样品色谱峰的杂峰数目、大小及基线响应值,在净化效果上, $\text{PSA} > \text{NH}_2 > \text{Diol} > \text{QuEChERS}$ 。QuEChERS具有高回收率、分析范围广、使用溶剂少、操作简便、前处理速度快等优点,但是由于QuEChERS去除样品中杂质的能力弱,而GC-MS法往往需要对净化溶液进行浓缩,以实现较低的检出限,而使用GC-MS分析QuEChERS处理的样品,存在杂峰较多、基线较高等问题。因此,后续试验选择PSA固相萃取柱进行净化。

2.4 方法的检出限、准确度及精密度评估 氟虫腈及其代谢物在0.005~0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内均具有良好的线性关系($R^2 > 0.999$),以3倍信噪比(S/N)计算方法检出限,10倍信噪比(S/N)计算方法定量限,线性方程、相关系数及检出限见表1。

表1 氟虫腈及其代谢物线性方程及检出限

Table 1 Linear equation and detection limit of fipronil and its metabolite

化合物 Compounds	保留时间 Retention time//min	线性方程 Linear equation	相关系数(R^2) Correlation coefficient	检出限 MDL// $\mu\text{g}/\text{kg}$	定量限 LOQ// $\mu\text{g}/\text{kg}$
氟甲腈 Fipronil-desulfinyl	13.575	$Y=392.31 X+3\ 364.21$	0.999 3	0.5	2
氟虫腈硫醚 Fipronil-sulfide	16.046	$Y=641.22 X+4\ 511.36$	0.999 4	0.5	2
氟虫腈 Fipronil	16.290	$Y=260.94 X+1\ 954.96$	0.999 5	0.5	2
氟虫腈砒 Fipronil-sulfone	18.450	$Y=362.03 X+1\ 610.56$	0.999 7	0.5	2

分别在制备好的蔬菜样品中加入一定量的氟虫腈及其代谢物混合标准溶液,添加水平分别为2、10、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按照试验方法进行萃取、净化、浓缩及GC-MS分析,重复试验6次,获得平均回收率及相对标准偏差,结果如表2所示。由表2可见,氟虫腈及其代谢物回收率为81.06%~107.1%,精

密度为4.66%~18.9%,能够满足定量要求。

2.5 叶菜类蔬菜氟虫腈及其代谢物含量 考察了100批次的大白菜、小白菜、菠菜、芹菜、油麦菜共5种常见的市售叶菜类蔬菜,结果发现除小白菜外,其余叶菜类蔬菜均未检出氟虫腈及其代谢物。在检出氟虫腈的6个小白菜样品中,除

氟虫腈外,其3种代谢物氟甲腈、氟虫腈硫醚、氟虫腈砒均有检出,结果如图5所示。

表2 氟虫腈及其代谢物精密度及回收率

化合物 Compounds	添加量 Additive amount mg/kg	平均回收率 Average recovery %	精密度 Precision %
氟甲腈	0.002	105.60	16.20
Fipronil-desulfinyl	0.010	84.87	11.90
	0.050	92.88	7.43
	0.002	104.70	18.90
Fipronil-sulfide	0.010	89.14	10.60
	0.050	97.24	7.43
氟虫腈 Fipronil	0.002	97.40	16.80
	0.010	81.06	12.00
	0.050	94.37	8.31
氟虫腈砒	0.002	107.10	18.00
	0.010	88.09	12.10
	0.050	99.04	4.66

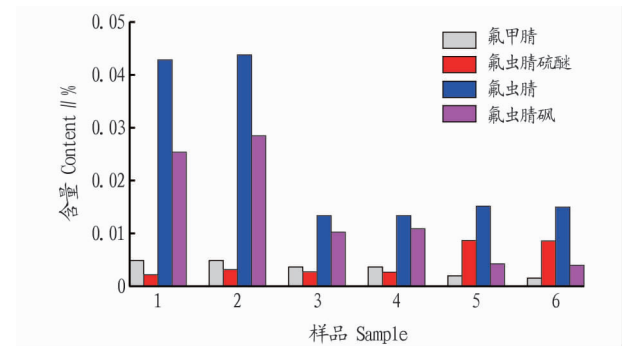


图5 小白菜中氟虫腈及其代谢物的检出量

Fig. 5 Result of fipronil and its metabolites in pakchoi

3 结论

该研究采用乙腈萃取、PSA 固相萃取柱净化、气相色谱分离、串联质谱法检测,建立了同步测定叶菜类蔬菜中氟虫腈及其3种代谢物的方法。与国标方法相比较,该方法涵盖了 GB 2763—2016 及欧盟限量规定中氟虫腈的全部残留物,弥补了相关标准的不足;检出限更低,能够满足限量指标的

要求;通过色谱条件的优化和萃取、净化条件的筛选,降低了基质干扰;经过方法学验证,该方法线性、检出限、回收率及精密度等均满足残留检测方法确认要求,适用于叶菜类蔬菜中氟虫腈及其代谢物的测定;通过对 100 批次的大白菜、小白菜、菠菜、芹菜、油麦菜 5 种常见的市售叶菜类蔬菜的筛查,发现其中有 6 个小白菜为阳性。综上所述,该方法灵敏度高,定性及定量准确,适用于叶菜类蔬菜中氟虫腈及其代谢物残留量的测定。

参考文献

[1] 周彤,肖洪喜,周志俊. 氟虫腈安全性评价资料概述[J]. 环境与职业医学,2017,34(8):745-748.

[2] 朱荣. 氟虫腈对 GABA_A 受体单通道电流的调节作用[J]. 世界农药,2005,27(1):24-26.

[3] 赵海云,张华,王静,等. 氟虫腈合成工艺的研究[J]. 现代农药,2008(4):17-21.

[4] 陆阳,李春仁,徐国华,等. 新型高效杀虫剂氟虫腈制备新工艺[J]. 应用化工,2006,35(7):561-563.

[5] 中华人民共和国农业部 中华人民共和国工业和信息化部 中华人民共和国环境保护部公告第 1157 号[J]. 农药科学与管理,2009,30(3):52.

[6] 叶倩,邓义才,路大海,等. 气相色谱法测定蔬菜水果中氟虫腈等 6 种农药残留[J]. 农药,2016,55(1):51-54.

[7] 赵丽,洪雪花,荣国琼,等. 气相色谱法测定水果中氟虫腈农药残留[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(10):3921-3924.

[8] 白宝清,李美萍,张生万. QuEChERS-DLLME-高效液相色谱法测定蔬菜中溴虫腈和氟虫腈残留[J]. 食品科学,2014,35(24):254-258.

[9] 王玉玲,史常春,李自华,等. 氟虫腈高效液相色谱分析方法优化[J]. 农药,2014,53(8):577-578.

[10] 周昱,徐敦明,陈达捷,等. 固相微萃取-气相色谱法和气相色谱-质谱法测定茶叶中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 色谱,2011,29(7):656-661.

[11] 罗彤,付文雯,黄坤,等. 气相色谱-负化学源质谱法测定牛奶中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 中国乳品工业,2019,47(7):39-41.

[12] 闫思月,李兴海,赵尔成,等. 分散固相萃取-分散液液微萃取-气相色谱质谱法测定玉米和大米中氟虫腈及其代谢物的残留[J]. 分析试验室,2016,35(4):386-389.

[13] 王永芳,王利强,温华蔚. LC-MS/MS 测定鸡蛋、鸡肉和蛋糕中氟虫腈及代谢物残留量[J]. 食品研究与开发,2019,40(10):163-169.

[14] 刘善菁,刘雨昕,陆桂萍,等. 液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱测定鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留的研究[J]. 中国兽药杂志,2017,51(10):29-38.

[15] 韩继新,李占军,曹天泽,等. 液/质-质质谱法测定蔬菜中氟虫腈残留含量[J]. 食品研究与开发,2017,38(19):148-151.

[16] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,中华人民共和国农业农村部,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量:GB 2763—2019[S]. 北京:中国农业出版社,2019.

(上接第 159 页)

[4] 尚秀华,谢耀坚,彭彦. 育苗基质用的有机废弃物腐熟堆沤技术研究进展[J]. 桉树科技,2009,26(1):64-70.

[5] 刘景岳. 国外的树皮利用[J]. 林业科技开发,1991,5(3):49.

[6] 郑志方. 树皮化学与利用[M]. 北京:中国林业出版社,1988:249-256.

[7] 张沛健,彭彦,谢耀坚,等. 基于桉树皮的有机基质腐熟处理研究[J]. 热带作物学报,2011,32(3):412-416.

[8] 武亚敬,毕君,高红真. 松树皮的田间堆制腐熟技术[J]. 林业科技开发,2015,29(4):61-63.

[9] 柴艳芳,汤久杨,王四清. 松树皮基质发酵方案的初步探究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(2):81-86.

[10] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000:19-65.

[11] 高俊山,蔡永萍. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业大学出版社,2018:138-139.

[12] TIQUIA S M, TAM N F Y. Co-composting of spent pig litter and sludge with forced-aeration[J]. Biores Technol,2000,72(1):1-7.

[13] EKLIND Y, KIRCHMANN H. Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. II: Nitrogen runtover and los-

ses[J]. Biores Technol,2000,74(2):125-133.

[14] 黄国锋,钟流举,张振细,等. 有机固体废物堆肥的物质变化及腐熟度评价[J]. 应用生态学报,2003,14(5):813-818.

[15] 吴阳,梅娟,徐乐中. 园林废弃物堆肥的腐熟度评价[J]. 农业科技通讯,2014(7):203-205.

[16] 尚秀华,谢耀坚,彭彦,等. 木屑基质化腐熟技术研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(19):8969-8973.

[17] 贺海升,马纯燕,卜军,等. 针叶树皮土有机肥料发酵及理化性质检验[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),2010,28(3):425-429.

[18] 郭世荣. 固体栽培基质研究、开发现状及发展趋势[J]. 农业工程学报,2005,21(S2):1-4.

[19] 顾剑,张宇. 樟子松树皮有效成分的初步研究[J]. 黑龙江医药科学,2009,32(3):4.

[20] 刘卫星,顾金刚,姜瑞波,等. 有机固体废物堆肥的腐熟度评价指标[J]. 土壤肥料,2005(3):3-7.

[21] MATHUR S P, DINEL H, OWEN G, et al. Determination of compost bi-maturity. II. Optical density of water extracts of composts as a reflection of their maturity[J]. Biological agriculture and horticulture, 1993, 10: 87-108.