

## 分析测试

# 离心场场流分离联用静态光散射测量 聚合物分子质量的方法

田芙蓉<sup>1</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 高慧芳<sup>2</sup>, 任玲玲<sup>2\*</sup>

(1. 陕西科技大学, 陕西省轻化工助剂重点实验室, 陕西 西安 710021;  
2. 中国计量科学研究院, 北京 100013)

**摘要:**以 NaCl 溶液为流动相, 采用离心场场流分离仪对样品进行分级, 结合静态光散射仪、示差折光检测器测定亲水性弱聚电解质聚丙烯酸的数均分子质量及重均分子质量。通过考察流动相流速、离心场的离心转速等影响离心分离的因素, 确定仪器可准确测量的条件。结果表明, 当流动相流速为 0.7 mL/min、离心场转速为 3 500 r/min 时, 该装置可准确测定聚丙烯酸的平均分子质量。

**关键词:**离心场场流分离; 流速; 离心转速; 聚丙烯酸

中图分类号: TB234

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)02-0227-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2019.02.051

## A method to measure molecular weight of polymer by combining static light scattering with centrifugal field flow separation

TIAN Fu-rong<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, GAO Hui-fang<sup>2</sup>, REN Ling-ling<sup>2\*</sup>

(1. Shaanxi Key Laboratory of Additives for Light Chemical Industry, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China; 2. National Institute of Metrology, Beijing 100013, China)

**Abstract:** NaCl solution is used as the mobile phase and the sample is classified by a centrifugal field flow separator. Through combining with static light scattering instrument and refractive index detector, the number-average molecular weight and weight-average molecular weight of hydrophilic weak polyelectrolyte polyacrylic acid are determined. The conditions that can allow instrument to measure accurately are determined by studying the factors that affect the centrifugal separation, such as flow rate of the mobile phase and the centrifugal speed of the centrifugal field. The results show that this device can determine accurately the average molecular weight of polyacrylic acid when the mobile phase flow rate is 0.7 mL·min<sup>-1</sup> and the centrifugal field speed is 3 500 r·min<sup>-1</sup>.

**Key words:** centrifugal field flow separation; flow rate; centrifugal rotational speed; polyacrylic acid

常用来测量聚合物分子质量的方法如端基滴定法<sup>[1]</sup>、气相渗透压法<sup>[2]</sup>、质谱法<sup>[3-4]</sup>、黏度法<sup>[5]</sup>等方法, 一般只能一次测得一种分子质量。如需同时测定数均与重均分子质量, 常采用凝胶色谱法或者凝胶色谱仪联用光散射仪进行测量。两者相同之处在于都采用凝胶色谱柱作为分离场对所测聚合物进行分离排序, 不同之处在于: 前者采用分子质量已知的一系列窄分布分子质量标准样品通过色谱柱, 绘制标准曲线进而测定未知聚合物的 2 种平均分子质量; 后者采用光散射仪联用浓度检测器测定经色谱柱分离的聚合物, 通过不同计算方式得出多种分子质量。其缺陷在于试样经色谱柱分离过程中, 聚合物与柱中填充的固定相充分接触, 由于溶质与固定相的充分接触, 从而使该方法测量分子质量的准确度常受所测样品本身性质的影响<sup>[6]</sup>。尤其当被测

样品是亲水性弱聚电解质时, 该类物质由于本身极性较强<sup>[7]</sup>、黏度较大等原因<sup>[8]</sup>, 可能与固定相相互作用, 使测量准确性受到影响。

为了避免上述 GPC 法存在的缺陷, 笔者采用场流分离法与光散射法联用测定亲水性弱聚电解质的平均分子质量。场流分离法是一种新的分离技术<sup>[9]</sup>, 其利用重力、离心力等物理场使溶液在流经一个空的柱槽时, 溶质因质量、体积、扩散系数、电荷等物理性质的差异而分离, 其分离过程中不存在固定相, 避免了溶质与固定相之间的作用, 且可与多种检测器联用, 进一步扩大其检测范围。其中已商品化的仪器, 离心场场流仪(CFFF)通过离心场提供的离心力与淋洗液共同作用对样品完成分级, 淋洗液以层流状态流过离心场时, 离心力场垂直作用于淋洗液, 使被测样品分子在离心力作用下向通道外壁

收稿日期: 2018-10-12; 修回日期: 2018-12-18

基金项目: 国家重点研发计划“国家质量基础的共性技术研究与应用”专项(2016YFF0204301)

作者简介: 田芙蓉(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能高分子材料, 13992806714@163.com; 任玲玲(1970-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为材料计量, 通讯联系人, renll@nim.ac.cn。

运动,大分子受离心力比小分子大,所以更靠近通道外壁。由于淋洗液在通道中处于层流状态,所以处于通道中不同位置的样品具有不同的流速。越靠近通道外壁分子所具有的流速越小,因而小分子比大分子具有更快的流速、更短的流出时间,这使得溶质分子按照由小到大的顺序流出,进入多角度静态光散射仪(MASLS)及示差检测器而得到各种分子平均分子质量。分离场对试样的分离度直接影响测量结果的准确性<sup>[10-13]</sup>,而分离度与分离时间的大小成正比<sup>[14-15]</sup>,笔者通过研究影响分离场分离度的因素,确定使仪器达到准确测量效果的最佳分离条件。

## 1 实验部分

### 1.1 实验试剂与仪器

黏均分子质量标称值为 45 万道尔顿的聚丙烯酸(PAA),上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产;重均分子质量为 63 900 道尔顿(Da)的聚苯乙烯磺酸钠(PSS)标准品,编号为 Z-POS-PSS67k,德国 Postnova 公司生产;氯化钠、氢氧化钠,分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产。

CF2000 型离心场场流仪、PN3621 型多角度静态光散射仪,德国 Postnova 公司生产;5450 型示差折光检测器,日本 HITACHI 公司生产;KQ-300DE 型超声波清洗器,广州沪瑞明仪器有限公司生产;XP205 型电子天平,S210 Seven Compact pH 计,美国 METTLER TOLEDO 公司生产;Milli-Q 超纯水机,德国 MERCK MILLIPORE 公司生产。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液配制

称取一定量的 NaCl 溶入去离子水中,分别配制成质量分数为 0.9%、1.2% 的溶液作流动相,静置 24 h 待用;称取一定量 NaOH 溶于去离子水中,配制成浓度为 0.1、0.5、1 mol/L 的溶液作为 pH 调节剂,待用;称取一定量的 PSS 溶于质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中,配制成 PSS 质量浓度为 10 mg/mL 的溶液;称取一定量的 PAA 溶于去离子水中,配制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液。利用上述 NaOH 调节剂调节溶液 pH 至 9,后加入一定量的 NaCl 使溶液中 NaCl 的质量分数为 1.2%,最后将溶液置于超声波振荡器中在功率为 150 W 的条件下超声 10 min,作为待测样品备用。

#### 1.2.2 仪器校准

固定流动相流速为 0.5 mL/min,在离心场转速分别为 0、3 500 r/min 的转速下分别进样,每次将

10 mg/mL 的 PSS 溶液进样 20.36  $\mu$ L。利用 0 r/min 时的数据校准示差折光检测器,利用 3 500 r/min 时的数据校准光散射仪,保存校准数据。

#### 1.2.3 流速对分子质量测定的影响

固定场流仪的离心场转速为 3 300 r/min,5 mg/mL 的 PAA 溶液进样量为 20.36  $\mu$ L,在流动相流速分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL/min 时,测定 PAA 的分子质量及其分布。

#### 1.2.4 离心分离场转速对分子质量测定的影响

固定流动相流速为 0.7  $\mu$ L/min,每次 5 mg/mL PAA 溶液的进样量为 20.36  $\mu$ L,在场流仪的离心场转速分别为 1 000、2 000、2 500、3 000、3 500、4 000 r/min 时,测定 PAA 的分子质量及其分布。

## 2 结果与讨论

为了研究准确测量分子质量的分离条件,首先需要校准 MASLS 和示差检测器,以保证测量的分子质量准确、可比;其次需要保持分离场的分离度最大,而分离场的分离度与保留时间成正比。离心场场流仪保留时间  $t_r$  的计算式为:

$$t_r = \pi \Delta \rho w G d^3 V^0 / 36 k T v \quad (1)$$

式中: $V^0$  为通道体积; $G$  为离心重力加速度; $w$  为分离通道厚度; $d$  为溶质颗粒尺寸; $\Delta \rho$  为溶质与流动相的密度差; $v$  为通道流速。

从式(1)中可以看出,当仪器( $V^0$ 、 $w$ )与所定样品及淋洗液( $d$ 、 $\Delta \rho$ )一定时, $t_r$  只与通道流速( $v$ )与离心分离场转速( $G$ )有关,且与  $G$  值成正比,与  $v$  值成反比,所以在保持仪器正常运转的情况下,使  $G$  保持最大值, $v$  保持最小值即可得到最大的  $t_r$ ,即最好的分离度。因此,研究了不同淋洗液流速及离心场转速对聚丙烯酸分子质量及分布测定的影响,以确定最佳分离场转速与流动相流速。

### 2.1 仪器校准

利用分子质量已知的标准物质 PSS 校准示差折光检测器、静态光散射仪等。示差折光检测器为浓度检测器,其捕捉样品进样的实际量值与总进样量值由于仪器内部存在流动死角而产生偏差,而该偏差会随着时间增长而累积,校准过程可以获得最新的仪器参数,从而保证测量结果的准确性。而光散射仪的校准,一方面是为了获得每个角最新的散射系数;另一方面通过光散射信号峰与示差折光检测器信号峰之间的最大重叠,确定 2 台仪器由于物理位置差异引起的频移值(shift 值),以保证同一时间测得的浓度信号与光散射信号准确对应。为确保

测试的准确性,首先采用重均分子质量( $M_w$ )为63 900 Da、PDI<1.20的有证标准物质聚苯乙烯磺酸钠(PSS)分别校准示差折光检测器与多角度静态光散射仪。PSS溶液质量浓度为10 mg/mL,流速为0.5 mL/min。采用CFFF-MALS法测得其重均分子质量为64 120 Da,相对误差为0.35%,说明仪器测量准确度较高。

## 2.2 流速对分子质量测定的影响

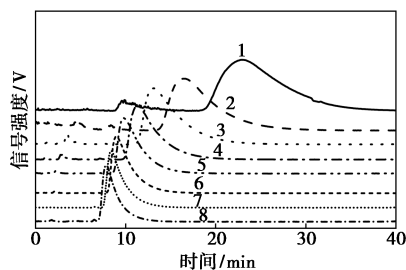
由式(1)可知,流动相流速直接影响离心分离场的保留时间。图1是不同流动相流速下光散射及示差折光2种检测器的对应信号峰图,横坐标为时间,信号峰从出现到完全消失所用的时间为保留时间 $t_r$ 。从图1中可以看出, $t_r$ 受流动相流速的影响较大,表现为光散射与示差的信号峰宽度均随流动相流速的增大而明显减小。根据式(1),越小的流动相流速,保留时间越长,越有利于获得最佳分离度,因此,理论上应选择最小的流动相流速。但是实际操作中由于分离场与检测器间存在一定物理距离,若流速过慢会导致经过离心场分离排序的样品在进入检测器前由于分子的自由扩散而回归无序状态,使数均分子质量( $M_n$ )与重均分子质量的测量结果偏离准确值;但若是流速过快,一方面,分离场来不及对试样进行充分分级,使样品分离度较低;另一方面,流速超过一定值后流动相会由层流状态突

为湍流状态,从而破坏样品在离心分离场下的排序。因此,为得到分子质量准确的测量结果,研究了流动相流速对聚丙烯酸分子质量测量的影响。

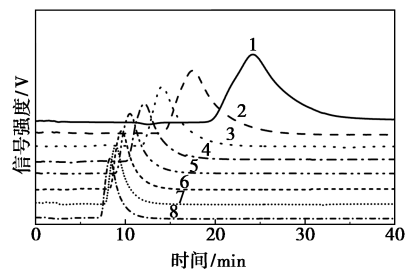
在固定离心场转速下,流动相流速分别从0.2 mL/min到0.9 mL/min时测量的重均分子质量标称值为45万道尔顿PAA的分子质量及分布,结果如表1所示。由表1可以看出,随着流动相流速的增大,所测样品的 $M_n$ 与 $M_w$ 均呈上升趋势,当流速增大至0.7 mL/min时, $M_w$ 与 $M_n$ 的变化逐渐趋于稳定并达到平台。而当流速超过0.8 mL/min时, $M_w$ 与 $M_n$ 均开始增大,且 $M_n$ 的增大幅度大于 $M_w$ ,这是由于流动相由层流状态突变为湍流状态,从而破坏样品在离心分离场下的排序,导致由于统计方式存在差异的 $M_w$ 与 $M_n$ 表现出不同的变化,其中 $M_n$ 较 $M_w$ 受其影响较大,因此可用来判断流动相的流动状态。综上所述,流动相的最佳流速为0.7 mL/min,该流速下不仅可使样品在分离通道内存在足够的时间以满足离心场随样品的完全分级,且可最大限度地保证样品在发生扩散破坏分级结构之前进入检测器。

表1 流动相流速对平均分子质量测定的影响

流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	0.2	0.3	0.4	0.5
$M_n/10^5$ Da	1.16	1.415	1.704	1.927
$M_w/10^5$ Da	3.219	3.698	4.367	4.564
流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	0.6	0.7	0.8	0.9
$M_n/10^5$ Da	2.017	2.207	2.242	3.735
$M_w/10^5$ Da	4.838	5.051	5.106	5.368



(a) 静态光散射仪信号



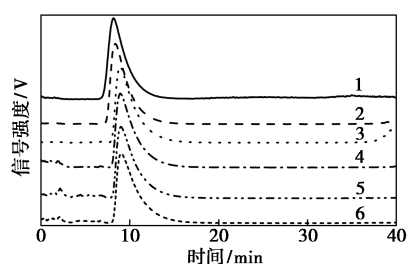
(b) 示差折光检测器信号

1—0.2 mL/min; 2—0.3 mL/min; 3—0.4 mL/min; 4—0.5 mL/min;  
5—0.6 mL/min; 6—0.7 mL/min; 7—0.8 mL/min; 8—0.9 mL/min

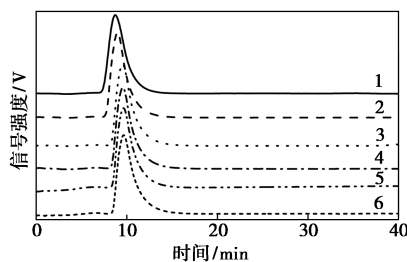
图1 不同流动相流速的光散信号图与示差信号图

## 2.3 离心分离场转速对分子质量测定的影响

作为离心分离场的分离驱动源,离心场转速直接影响其分离效果。离心场转速对保留时间、分子质量及其分布的影响分别如图2及表2所示。从图2中可以看出,光散射信号峰与示差信号峰的峰宽并不随转速发生明显变化,说明相较于流动相流速的变化,离心场转速对于保留时间的影响较小。流动相流速为0.7 mL/min时,最适于分子质量的测量,所以固定流动相流速为0.7 mL/min,在不同离心场转速下对PAA的分子质量的测定结果如表2所示。由表2可以看出,随着离心场转速的增大,所测 $M_n$ 与 $M_w$ 均呈下降趋势,当转速达到3 000 r/min左右时, $M_n$ 与 $M_w$ 的变化均开始趋于平稳;当转速达到3 500 r/min时, $M_n$ 与 $M_w$ 均达到稳定值,说明此时样品已得到充分分离。测得 $M_w$ 为 $5.107 \times 10^5$  Da, $M_n$ 为 $2.185 \times 10^5$  Da即为PAA的分子质量准确值。



(a) 静态光散射仪信号



(b) 示差折光检测器信号

1—1 000 r/min; 2—2 000 r/min; 3—2 500 r/min;  
4—3 000 r/min; 5—3 500 r/min; 6—4 000 r/min

图 2 不同离心场转速的光散信号图与示差信号图

表 2 离心场转速对平均分子质量测定的影响

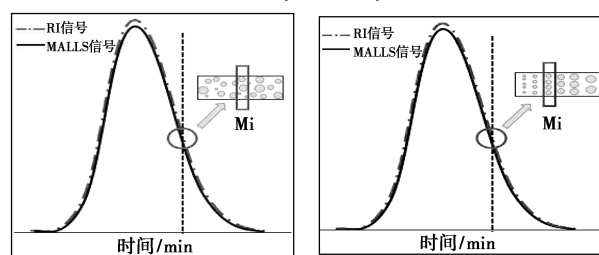
转速/(r·min <sup>-1</sup> )	1000	2000	2500	3000	3500	4000
$M_n/10^5$ Da	4.284	3.132	2.523	2.234	2.201	2.185
$M_w/10^5$ Da	5.642	5.286	5.183	5.144	5.107	5.102

离心场转速对保留时间的影响较小,但离心场转速决定了离心力的大小,即离心分辨率的高低直接影响各分子质量测量的准确性。其原因可归于场流仪-光散射仪-示差检测器对分子质量的测量计算原理。结合同一时刻光散射仪测定的分子质量  $M_i$  与示差所测得的溶质浓度  $c_i$ ,通过式(2)与式(3)2种不同积分方式对整个有效时间内检测器的测量值进行计算,可得所测试样的  $M_n$  与  $M_w$ 。其中,式(2)、式(3)中的  $M_i$  理论上为所测溶液中每个单独样品分子的分子质量,但实际测量中,检测器的灵敏度还不能达到短时间内对每个样品分子的分子质量进行测量统计,所以  $M_i$  值为各个时刻下通过检测器的少量样品分子的分子质量均值。离心场分离排序原理如图 3 所示。由图 3(a)可以看出,未分级时,  $M_i$  为该时刻下所测溶液中随机混合的溶质的平均分子质量,其数值不能准确反应所测分子的分子质量水平,以致影响最终计算得到的各类平均分子质量。由图 3(b)可以看出,在适宜的离心场场流分离条件下,所测样品分子被成功分级,在流动相溶剂

的带动下,按分子质量由小到大的顺序依次通过检测器,此时测得  $M_i$  为各时刻下大小相近的样品分子混合体的分子质量平均值,其更准确地反应了该时刻下所测少量样品的分子质量水平,最大程度地减小了采用式(2)、式(3)计算各平均分子质量时引入的偏差。所以,结合表 2 可知,离心场转速达到 3 500 r/min 时,样品被高度分级,所测分子质量值准确可靠。

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i c_i/M_i} \quad (2)$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} \quad (3)$$



(a) 无离心场分离

(b) 离心场分离

图 3 离心场分离排序原理

### 3 结论

采用场流分离仪联用静态光散射仪等测定聚丙烯酸分子质量时,其准确度受到流动相流速及离心场转速等影响。流动相流速对保留时间及聚丙烯酸的分子质量测定值具有明显影响,当其流速达到 0.7 mL/min 时最适宜分子质量的测定;离心场转速虽不直接作用于保留时间,但其作为分离驱动因素对分子质量的测量具有至关重要的作用,其值为 3 500 r/min 时测量结果准确稳定。且最优条件下测得分子质量标称值为 45 万 Da 的聚丙烯酸,  $M_w$  与  $M_n$  的准确值分别为  $5.107 \times 10^5$  Da、 $2.201 \times 10^5$  Da。

### 参考文献

- [1] 田媛媛, 韦莎. 低分子量聚丙烯酸钠研究进展[J]. 广州化工, 2012, 40(15): 19-21.
- [2] 潘雨生. 关于气相渗透法仪器常数对分子量依赖性的讨论[J]. 高分子学报, 1981, 1(2): 158-160.
- [3] Lozano D C P, Orrego-Ruiz J A, Barrow M P, et al. Analysis of the molecular weight distribution of vacuum residues and their molecular distillation fractions by laser desorption ionization mass spectrometry[J]. Fuel, 2016, 171: 247-252.
- [4] Wang Z, Chi L. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins[J]. Chinese Chemical Letters, 2018, 29(1): 11-18.
- [5] 刘洪兵, 刘红颖. 超高分子量聚合物特性粘数测定方法探讨[J]. 大庆石油地质与开发, 2001, 20(2): 104-105.

(下转第 232 页)

注射给药(猪为肌肉注射给药,牛为颈部皮下注射给药),这种给药方式既可以减轻操作压力,又可以提供最好的治疗效果<sup>[1-2]</sup>。通过注射给药泰地罗新具有吸收迅速、达峰时间短、消除半衰期长、生物利用度高的特点,而且泰地罗新对支气管和肺具有较高的亲和力,实验证明,在各组织中,肺组织的药物浓度最高且作用持久<sup>[1-2]</sup>。与替米考星和泰拉霉素 2 种大环内酯类抗生素相比,泰地罗新对呼吸系统疾病具有更好的疗效<sup>[3]</sup>。

目前,泰地罗新的检测方法主要采用 HPLC-MS/MS 法<sup>[10-11]</sup>。也有文献报道用 C18 色谱柱进行泰地罗新检测<sup>[12]</sup>。亲水作用色谱是近年发展起来的新技术<sup>[13]</sup>,该技术可以实现对极性化合物的强保留,与反相液相色谱具有良好的互补性<sup>[14-15]</sup>。笔者建立了一种利用亲水作用色谱检测泰地罗新的新方法。该方法能够快速、准确地检测泰地罗新含量,且成本低廉,对药物生产中泰地罗新的质量控制具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

液相色谱为 Agilent 1260, 配备二元梯度泵、真空在线脱气机和自动进样器。仪器控制、数据采集软件及数据分析软件采用 Agilent 公司的 ChemStation 系统。

泰地罗新工作对照品,中牧实业股份有限公司自制(已通过核磁及质谱确认其结构,化学纯度为 98.0%);泰地罗新注射剂 Zuprevo(质量浓度为 180 mg/mL)规格分别为 50、100 mL 和 250 mL,默沙东动物保健品公司生产;甲酸,色谱纯,Fisher 公司生

产;乙酸,分析纯,北京化工厂生产;甲酸铵,色谱纯,Fisher 公司生产;乙酸铵,色谱纯,Fisher 公司生产;氨水,分析纯,北京化工厂生产;乙腈,色谱纯,Fisher 公司生产;所有用水均为去离子水。

### 1.2 溶液配制

泰地罗新样品溶液:取适量泰地罗新注射液,利用甲醇溶解并定容至适当的浓度;泰地罗新对照品溶液:取适量泰地罗新工作对照品,利用甲醇溶解并定容至适当的浓度。

### 1.3 色谱条件

色谱柱为 XBridge-BEH Amide 氨基柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),柱温为 30℃,紫外吸收波长为 280 nm。流动相:A 相为乙腈(含 10 mmol/L 甲酸铵、0.125%甲酸和 5%水);B 相为 0.125%甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵);流速为 1 mL/min;进样体积为 10 μL。

梯度洗脱程序:0.00→5.00 min,90%→30% A 相流动相;5.00→5.10 min,30%→90% A 相流动相;5.10→8.00 min,90%→90% A 相流动相。

## 2 结果与分析

### 2.1 泰地罗新紫外检测波长的确定

以甲醇为参比,用甲醇配置泰地罗新标准溶液(质量浓度为 10 μg/mL),在 200~600 nm 区间内进行紫外扫描,结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,其最大吸收波长为 287 nm。泰地罗新在主体结构上与泰乐菌素类似,其结构发光基团没有发生改变,中国兽药典(2010 版)规定:高效液相色谱法检测泰乐菌素的紫外检测波长为 280 nm。综合以上两方面的数据,选择 280 nm 作为泰地罗新的紫外检测波长。

(上接第 230 页)

- [6] 丁勇,吴红枚,王孟,等.聚间苯二甲酰对苯二胺(PPIA)数均分子量的测定[J].山东化工,2016,45(11):74-77.
- [7] 王明君,姚善涇.小角激光光散射法测定纤维素硫酸钠的分子量[J].过程工程学报,2009,9(6):1159-1163.
- [8] 冯茹森,郭拥军,张新民,等.疏水缔合聚合物分子量分布曲线的测定[J].高分子学报,2016(5):621-627.
- [9] Kim R Williams, Karin D Caldwell. Field-flow fractionation[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 1577-1578.
- [10] Greyling G, Pasch H. Fractionation of poly(methacrylic acid) and poly(vinyl pyridine) in aqueous and organic mobile phases by multidetector thermal field-flow fractionation[J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1512: 115-123.
- [11] Roessner D, Kulicke W M. On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering[J]. Journal of Chromatography A, 1994, 687(2): 249-258.
- [12] Wagner M, Pietsch C, Tauhardt L, et al. Characterization of cationic polymers by asymmetric flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering-A comparison with traditional techniques [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1325(2): 195-203.
- [13] Ugo Till, Mireille Gaucher-Delmas, et al. Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi-elastic light scattering for characterization of polymersomes: Comparison with classical techniques [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 7841-7853.
- [14] 赵希贤,尤立华,杨秉呼,等.土茯苓含量测定分离度和理论板数的调整[J].首都医药,2013,20(24):69-70.
- [15] 叶祥喜,宋燕西,陈旭涛,等.高效液相色谱手性流动相添加剂拆分佐匹克隆对映体[J].分析测试学报,2014,33(4):471-474. ■