

荧光碳点在环境监测中的应用研究

王强 胡旭虎

(中南民族大学 药学院 武汉 430074)

摘要 为了解新型荧光碳点表面经钝化修饰后,赋予其相关的反应活性及靶向选择性,及碳点的日益多样化应用,特别是环境分析上广阔的应用前景,详细地论述了荧光碳点应用于检测环境中的重金属离子、微生物、无机阴离子及有机污染物等,并展望了碳点在环境监测中的发展方向。

关键词 荧光碳点; 环境污染; 环境监测

中图分类号 X83 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)04-0022-05

Research on the Application of Fluorescent Carbon in Environmental Monitoring

Wang Qiang, Hu Xuhu

(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract In order to learn more about the carbon dots endowed with relevant reactivity, target selectivity and diversified applications after passivation modification, especially their broad application prospects in environmental analysis, this review elaborated in detail the application of carbon dots in detecting heavy metal ions, microbes, inorganic anionic and organic pollutants in the environment. In addition, the prospects of fluorescent carbon dots used in environmental monitoring were also presented.

Keywords fluorescent carbon; environmental pollution; environmental monitoring

2004年,Xu等^[1]在使用凝胶电泳分离电弧法制备的单壁碳纳米微管时偶然得到了一种荧光碳纳米材料。Sun等^[2]有目的地制备并获得了直径小于10 nm且具有荧光性能的碳纳米粒,并将其命名为碳点(简称C-Dots)。碳点克服了传统有机荧光染料合成过程复杂、生物相容性差、在水溶液中容易自聚、荧光发射不稳定、易闪烁、荧光寿命短、难以进行多色同时标记等缺点。与传统的半导体量子点相比,在某些方面也具有独特的优势,如具有良好的抗光漂白性、荧光发射尺寸相关性及低毒性。另外它比金属荧光纳米粒子具有更加低廉的制备成本,因此被广泛应用于生物传感^[3]、生化分析^[4-6]、生物成像^[6,7]和载药治疗^[8]等领域。碳点经钝化修饰后,也赋予其一些特殊性能,如与其他有机物、无机物、高聚物及生物分子发生反应的能力,兼具更高的化学

稳定性、光稳定性和特殊的化学发光性质。因而在环境监测领域同样具有重要的应用价值,在检测环境中的重金属离子、无机阴离子、有机污染物上具有其独特的优势。此外,荧光碳点所表现出的优异的生物相容性,也可用于标记监测环境中的微生物。本文主要针对荧光碳点的特性及其在环境监测中应用进行综述,为今后的碳点研究提供参考。

1 荧光碳点的光学特性

目前,随着对碳点认识的不断深入,从原料选择到制备方法都变得日益多样化。然而制备方法不同,钝化修饰所用的试剂不同及分离纯化后粒径大小的不同,都会影响碳点的荧光性质和化学性质,也造就了碳点应用的多样性。

收稿日期 2016-01-02

作者简介 王强(1982-),男,副教授,博士,研究方向:抗肿瘤小分子活性化合物的设计与合成,E-mail: wq@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(21102185)

以碳元素为基础的纳米材料中,发射光谱常存在激发光依赖性和尺寸依赖性^[9-11],该性质为检测样品选择合适的发射光谱提供了可能。Sun等^[2]最早发现碳点存在多光子激发现象,进一步研究发现很多碳点具有上转换荧光发射的性能。随着双光子成像技术日渐广泛地应用于成像研究,基于荧光碳点的双光子或多光子成像材料将更适于生物医学领域的应用与研究。实际上,目前荧光碳点的高效荧光性能在环境检测及生物荧光标记方面已获得一定的研究和应用,并且将利于其进行检测示踪及对各种相关信号通路的研究。随后研究表明:发射量子产率随着荧光碳点的尺寸而有所改变,尺寸减小,荧光效率得以提高,说明荧光性能对粒径有一定的依赖性,这一发现将有利于研发具有更佳性能的荧光碳点。另外,溶剂pH等因素对荧光碳点的荧光性能也有重要影响,提示设计荧光碳点传感器的可能。

荧光碳点不但具有优良的荧光性质,而且其钝化修饰的表面富含电子,在电子传递过程中可产生化学发光(简称CL)。一些经典的具有较高化学荧光强度的试剂如发光胺、光泽精、过氧草酸盐、高锰酸钾及二氢卟吩e6(简称Ce6)虽然也被广泛用于化学荧光分析法^[12,13],但这些试剂大多具有毒性较高、价格较贵、选择性差及线性范围窄的缺陷,很大程度上限制了化学荧光分析法的应用,而碳点优良电子传递性能及光学性质无疑将成为化学荧光分析法中重要的新材料。Xue等^[14]以柠檬酸为原料,用PEG1500N钝化剂制备得到荧光碳点。该碳点可与H₂O₂和NaHSO₃溶液共同组成CL系统,在该碳点的作用下H₂O₂-HSO₃⁻的化学荧光强度增大了60倍。研究表明碳点与H₂O₂及HSO₃⁻发生反应后生成的CD⁻和CD⁺发生电子转移湮没,转变成激发态的CD,并由激发态的CD释放出来强烈荧光。H₂O₂-HSO₃⁻-CDs系统为检测环境中的H₂O₂提供了新的方法。该系统制备简单、毒性低,有望取代传统的化学荧光系统。碳点具有的化学荧光性能,拓展了碳点在环境化学、微生物学、生物化学等学科的应用范围。

2 荧光碳点在环境监测中的应用

碳点表现出独特的光学性质、化学性能及良好的生物相容性,受到环境科学研究者们的重视。利用碳点优异的性能,广泛地将其运用于重金属、无机阴离子、有机污染物及微生物的检测中。

2.1 金属离子的检测

重金属在环境中的行为特性及归宿,是环境化学研究的前沿领域。重金属进入环境对生物个体、种群产生影响,进而对生态系统产生不良的生态效应。而大多经钝化修饰的碳点表面富含含氧基团,具有化学和生物多样性。大量的羧基、酚羟基等基团使荧光碳点可以通过螯合、离子交换和吸附作用结合生态环境中主要的金属离子生成各种形式的配合物。不同表面修饰的碳点对金属离子具有特异性选择。生成配合物的同时会引起碳点表面结构的变化而影响其荧光性能的强弱,达到检测金属离子的目的。近年来,越来越多的研究者将碳点用于Hg²⁺、Cr(VI)、Cu²⁺、Mn(II)、Fe³⁺等金属离子的定性定量检测,较传统的检测方法具有更高的特异性和灵敏度。

Guo等^[15]以柠檬酸钠为原料制得C-Dots,对Hg²⁺具有很好的选择性和敏感度,在其他金属离子的干扰下对Hg²⁺仍然表现出较好的选择性,Hg²⁺与碳点表面的羧基和羟基相互作用,使粒子间距离减小,粒子间通过有效的电子转移使光子通过非辐射的形式释放,降低了荧光的发射强度。研究表明:当Hg²⁺浓度在0~5 μg/L时,荧光淬灭度与Hg²⁺浓度具有很高的线性关系(R²=0.996),随着Hg²⁺浓度的增加碳纳米粒子的荧光强度逐渐减弱。与之前报道的使用荧光纳米金^[16,17]及荧光染料^[18]检测Hg²⁺的方法相比,该法更加简单、廉价和环保。

Zheng等^[19]将制得的荧光碳点用二亚乙基三胺对其表面进行修饰。该碳点在358 nm激发光下的发射波长为456 nm,而Cr(VI)在这两个波段均有很好的吸收,即Cr(VI)不仅可以阻断激发光对碳点的激发,还能将碳点释放出来的荧光吸收掉。通过利用这种荧光内滤效应影响碳点荧光强度,可用来检测土壤及水体中的Cr(VI)。该法具有较高的特异性和灵敏度,荧光强度的变化与Cr(VI)浓度具有良好的线性关系;简单、方便、快捷,对环境Cr(VI)的检测具有极大的应用价值。

Wei等^[20]制得的C-Dots能选择性与Cu²⁺发生螯合反应,导致碳点的荧光发生明显的淬灭。他们将其做成Cu²⁺传感器,对Cu²⁺的检测限达1 nmol/L,比之前报道的CdS量子点对Cu²⁺的检测限更低。

Zhao等^[21]分别以离子液(ionic liquids)[BMIM][Br]和[BMIM][BF₄]为起始原料制备碳点。虽然两种离子液只是阴离子不同,但是用于金属离子检测时发现,以[BMIM][Br]为原料制备的碳点对Cu²⁺具有较高的敏感性和选择性;而以

[BMIM][BF₄]为原料制得的碳点却对 Fe³⁺ 具有较高的敏感性和选择性.对 Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 的检出限分别为 51 nmol/L 和 201 nmol/L.所得碳点在较宽 pH 范围内(pH 2 ~ 8) 显现出良好的荧光性能,且细胞毒性低,故该金属离子传感器不但可以用于环境中 Cu²⁺ 或 Fe³⁺ 的检测,也可以用于生物体内两种金属离子的检测.

Qin 等^[22] 也制得对溶液中 Mn(II) 具有高度敏感性的荧光碳点.在 pH 7.4 的缓冲溶液中该碳点的荧光强度的变化值与 Mn(II) 浓度具有良好的线性关系,可对水体中的 Mn(II) 进行定性定量分析.

2.2 无机阴离子污染物检测

无机阴离子在生化反应中扮演着关键角色,也对环境产生着巨大影响.荧光碳点不但可以用来检测环境中的重金属离子,还可利用其优良的理化性质检测无机阴离子污染物.

无机氯化物的气体或粉尘均属于高毒类污染物,是一种原浆毒物,神经细胞对它特别敏感,可经呼吸道、消化道及皮肤浸入人体,产生脑软化,胶质细胞增生,血管周围淋巴细胞浸润,心肌浊肿,间质水肿及出血等中枢神经系统及心肌毒性. Liu 等^[23] 用 Zr(H₂O)₂EDTA 与碳点表面的羧基相结合,当溶液中存在比羧基结合力更强的 F⁻ 时, Zr(H₂O)₂EDTA 将从碳点表面脱落与 F⁻ 结合,碳点荧光强度也随之改变. Liu 发现碳点荧光强度的变化与 F⁻ 浓度存在良好的线性关系,并用该法成功完成了对牙膏和水中 F⁻ 的定量检测,用该探针检测 F⁻ 不但简单快捷,还具有较高的灵敏度和特异性,说明经过适当修饰的碳点,在环境监测上具有广泛的应用范围.

随着含磷洗涤剂的大量使用,磷酸盐(Pi) 对水生环境造成了严重危害,水体中磷酸盐含量已成为水体污染的重要指标. Zhao 等^[24] 利用 Eu³⁺ 对供氧基团具有较高亲和力的特点,通过 Eu³⁺ 结合上荧光碳点表面的羧基使碳点发生团聚,导致碳点荧光强度减弱.而当溶液中存在 Pi 时,其与 Eu³⁺ 的亲合力远比羧基强,使 Eu³⁺ 从碳点表面释放,这时碳点的荧光强度随之增强.利用荧光强度的变化,可检测溶液中 Pi 的浓度,检测限达到 5.1 × 10⁻⁸ mol/L,并在一定范围内与荧光强度变化值存在较好的线性相关性.该法特异性强,对溶液中其他阴离子如 SO₄²⁻、SO₃²⁻、NO₃⁻、NO₂⁻、ClO₃⁻、ClO₂⁻、BrO₃⁻、S₂²⁻、Cl⁻、Br⁻、S₂O₃²⁻、F⁻、I⁻ 具有较好的抗干扰能力,因此 Zhao 等用该法成功检测了人造湿地复杂生态系统中 Pi 的

含量.

亚硝酸盐是一种在工业、建筑业和肉类食品液中都被广泛应用的无机化合物.由于亚硝酸盐易溶于水,中毒潜伏期短,一旦摄入超过一定剂量,对人体毒害巨大.因此,对环境中亚硝酸盐的监控十分必要. Lin 等^[25] 利用过氧亚硝酸在溶液中能诱导碳点产生化学荧光的性质,用荧光碳点来检测溶液中的亚硝酸盐.将亚硝酸盐与过氧化氢溶液混合后生成过氧亚硝酸盐,通过荧光光度分析方法检测 C-Dots 相对荧光强度,对溶液中亚硝酸盐的量进行定量检测.该法对亚硝酸盐的检测限可达 5.8 × 10⁻⁸ mol/L,并利用该法成功检测出池水、河水和纯牛奶中亚硝酸盐的量.

2.3 有机污染物的检测

有机污染物作为一种典型的环境污染物,具有高毒性(可致畸、致癌、致突变)、长期残留性、半挥发性和高脂溶性的特征,易于在食物链中富集传递,并且能够通过多种传输途径在全球迁移分配,对人体健康和生态环境产生严重的危害,因此对环境中有机污染物的监测意义重大.常用的检测方法存在着成本高、操作复杂、检测时间长、不方便现场检测等缺点,而荧光碳点以其独特的光学性质和多样的反应活性,能对多种有机污染物实现快速、实时、准确的测定,对保护环境具有非常重要的意义.

碳点可通过疏水作用、配位交换和氢键作用吸附多环芳烃、多氯联苯、农药等有机污染物,导致碳点发生聚集而使原有荧光强度减弱.利用荧光强度的变化,可对有机污染物进行定量分析.碳点多样化的表面修饰,可对不同有机污染物进行选择性的结合,达到检测不同污染物的目的. Cayuela 等^[26] 将制得的碳点分别用于检测 DNP(2,4-二硝基苯酚)和 4,8-DiMeIQx.质子化的 DNP 能与表面富含羟基的碳点通过氢键相互作用,引起碳点的荧光淬灭.在 pH 3.5 的缓冲溶液中, DNP 的最低检测浓度可达 0.4 mg/L,并具有良好的抗干扰性.检测液加入高浓度的对氯苯酚,也不会影响碳点与 DNP 作用时的荧光淬灭.而该碳点在 pH 7.0 的缓冲溶液中,对检测 4,8-DiMeIQx 具有较强特异性,能很好的抗其他含氮基化合物(如组胺、苯丙氨酸、色氨酸、乙胺、三甲胺)的干扰.对 4,8-DiMeIQx 的检测限可达 1.28 mg/L,故该碳点可制成环境敏感性纳米传感器,用于废水中有机污染物的快速检测.

2.4 对微生物的标记检测

微生物作为分解者在地球生态系统物质循环过

程中起着“天然环境卫士”的作用. 在污染物的转化降解、资源的再生利用、无公害产品的生产开发及生态保护等方面微生物都能发挥重要作用, 微生物也是环境检测中很重要的指标. 现常运用核酸探针、聚合酶链式反应技术(PCR技术)、生物传感器等生物技术进行环境中微生物的检测. 核酸探针和PCR技术虽然灵敏度高、特异性强, 但是需要借助较昂贵的检测仪器, 不方便进行现场检测; 生物传感器虽然能适应宽范围的pH和温度, 利于在线应急监测, 但也存在选择性差的缺点. 而利用荧光碳点检测微生物可弥补上述两种方法的不足, 受到越来越多研究者的关注^[27]. 利用碳点对微生物进行标记及检测的报道也在逐年增多. Mehta等^[28]将制备的具有激发光依赖性的荧光碳点作为荧光探针用于大肠杆菌(*E. coli*)和酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的细胞标记, 发现碳点主要分散于大肠杆菌的细胞膜和细胞质, 未出现在核内. 而在酵母菌中, 碳点分散于整个细胞中, 包括细胞核, 说明碳点对大肠杆菌和酵母菌显影效果良好并具有很好的生物相容性, 可将这种多色荧光碳点广泛用于细菌的标记和监测.

Weng等^[29]以柠檬酸胺和甘露糖为原料制备得到对大肠杆菌具有选择性吸附的荧光碳点, 该碳点能与大肠杆菌菌毛上的黏附蛋白FimH特异性结合. 吸附碳点的大肠杆菌在激发光照射下发射出明亮荧光, 可运用该原理对大肠杆菌进行定性定量检测. 该法对大肠杆菌的检测限达450 CFU/mL, 且浓度在 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/mL时, 吸附碳点荧光强度与浓度具有较好的线性关系, 可对大肠杆菌进行定量检测. Weng等还利用该法成功对自来水、果酱及人尿液中大肠杆菌进行实时检测, 该法具有成本低、操作简单快捷的优势, 在快速筛选大肠杆菌上具有很高的潜在应用价值. 由于碳点修饰的多样性, 这也为针对不同菌种开发出特异的荧光碳点探针进行定性定量检测提供了可能.

3 总结与展望

碳点优良的光学性质、低毒性及良好的生物相容性对其研究环境中污染物的迁移和相互作用具有重要意义, 能有效运用于重金属、无机阴离子及有机污染物的检测中. 随着人们对具有特殊性质荧光基团需求的增加, 碳点的合成方法及其功能相关性质的研究也在不断增加. 为制备具有多色荧光和高量子产率的碳点并拓宽其应用范围, 还须加大对其发

光机理的研究, 对荧光碳点长期毒性的研究内容和深度也亟待加强和扩展. 研究碳点与钝化试剂的相互作用和碳点修饰后的表面特征对于开发新型环境和生物传感体系及构建高性能化学传感器具有重要意义. 荧光碳点用于环境监测的研究刚起步, 仍须进一步开发其应用潜能, 如提高碳点与检测分子的稳定性和反应效率; 通过对碳点固定化材料的修饰以及多体系的制备使得碳点可以在多成分或者实际样品中同时并且有选择性地对一些污染物进行监测. 由于目前对于荧光碳点的研究大多数仍处于实验室研究开发阶段, 离大规模的实际生产应用还有很长一段距离, 因此, 如何将这种荧光传感器系统转化为可市场化的设备, 以大范围的应用于环境污染监测中也是面临的主要难题. 随着研究的深入和问题的迎刃而解, 荧光碳点将会在环境保护领域上发挥更大的作用.

参 考 文 献

- [1] Xu X Y, Ray R, Gu Y L, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragment [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(40): 12736-12737.
- [2] Sun Y P, Zhou B, Lin Y, et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(24): 7756-7757.
- [3] Lin F, He W N, Guo X Q. Fluorescent carbon dots (CDs) as a pH sensor [J]. *Adv Mater Res*, 2012, 415/417: 1319-1322.
- [4] Shi W, Wang Q, Long Y, et al. Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(23): 6695-6697.
- [5] Dai H, Yang C P, Tong Y J, et al. Label-free electrochemiluminescent immunosensor for α -fetoprotein: performance of Nafion-carbon nanodots nanocomposite films as antibody carriers [J]. *Chem Commun*, 2012, 48(25): 3055-3057.
- [6] Bai W J, Zheng H Z, Long Y J, et al. A carbon dots-based fluorescence turn-on method for DNA determination [J]. *Anal Sci*, 2011, 27(3): 243-246.
- [7] Jiang K, Sun S, Zhang L, et al. Red, green, and blue luminescence by carbon dots: full-color emission tuning and multicolorcellular imaging [J]. *Angew Chem*, 2015, 127(18), 5450-5453.
- [8] Wang Q L, Huang X X, Long Y J, et al. Hollow luminescent carbon dots for drug delivery [J]. *Carbon*, 2013, 59(4): 192-199.
- [9] Bao L, Zhang Z L, Tian Z Q, et al. Electrochemical

- tuning of luminescent carbon nanodots: from preparation to luminescence mechanism [J]. *Adv Mater*, 2011, 23 (48) : 5801-5806.
- [10] Wang X, Cao L, Yang S T, et al. Bandgap-like strong fluorescence in functionalized carbon nanoparticles [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49 (31) : 5310-5314.
- [11] Jeong J, Cho M, Lim Y T, et al. Synthesis and characterization of a photoluminescent nanoparticle based on fullerene-silica hybridization [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48 (29) : 5296-5299.
- [12] Wang L, Yue Q L, Li H B, et al. Facet-dependent electrochemiluminescence spectrum of nanostructured ZnO [J]. *Sci China Chem*, 2012, 56 (1) : 86-92.
- [13] Xiong B T, Wang C R, Luo J Y, et al. Highly-ordered dye-sensitized TiO₂ nanotube arrays film used for improving photoelectrochemical electrodes [J]. *Sci China Chem*, 2012, 56 (1) : 101-105.
- [14] Xue W, Lin Z, Chen H, et al. Enhancement of ultraweak chemiluminescence from reaction of hydrogen peroxide and bisulfite by water-soluble carbon nanodots [J]. *J Physical Chem C* 2011, 115(44) : 21707-21714.
- [15] Guo Y M, Wang Z, Shao H W, et al. Hydrothermal synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from sodium citrate and their use for the detection of mercury ions [J]. *Carbon*, 2013, 52(2) : 583-589.
- [16] He S, Li D, Zhu C, et al. Design of a gold nanoprobe for rapid and portable mercury detection with the naked eye [J]. *Chem Commun*, 2008, 40(40) : 4885-4887.
- [17] Guo Y, Wang Z, Qu W, et al. Colorimetric detection of mercury, lead and copper ions simultaneously using protein-functionalized gold nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26 (10) : 4064-4069.
- [18] Yang Y L, Wang Y W, Peng Y S. A bifunctional, colorimetric and fluorescent probe for recognition of Cu²⁺ and Hg²⁺ and its application in molecular logic gate [J]. *Sci China Chem*, 2013, 57 (2) : 289-295.
- [19] Zheng M, Xie Z G, Qu D, et al. On-off-on fluorescent carbon dot nanosensor for recognition of chromium(VI) and ascorbic acid based on the inner filter effect [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5 (24) : 13242-13247.
- [20] Wei J M, Zhang X, Sheng Y Z, et al. Dual functional carbon dots derived from cornflour via a simple one-pot hydrothermal route [J]. *Mater Lett*, 2014, 123(10) : 107-111.
- [21] Zhao A, Zhao C, Li M, et al. Ionic liquids as precursors for highly luminescent, surface-different nitrogen-doped carbon dots used for label-free detection of Cu²⁺/Fe³⁺ and cell imaging [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 809: 128-133.
- [22] Qin W, Sheng R Z. Size separation of carbon nanoparticles from diesel soot for Mn(II) sensing [J]. *J Lumin*, 2014, 146(146) : 37-41.
- [23] Liu J M, Lin L P, Wang X X, et al. Zr(H₂O)₂EDTA modulated luminescent carbon dots as fluorescent probes for fluoride detection [J]. *Analyst*, 2013, 138 (1) : 278-283.
- [24] Zhao H X, Liu L Q, Liu Z D, et al. Highly selective detection of phosphate in very complicated matrixes with an off-on fluorescent probe of europium-adjusted carbon dots [J]. *Chem Commun*, 2011, 47 (9) : 2604-2606.
- [25] Lin Z, Xue W, Chen H, et al. Peroxynitrous-acid-induced chemiluminescence of fluorescent carbon dots for nitrite sensing [J]. *Anal Chem*, 2011, 83 (21) : 8245-8251.
- [26] Cayuela A, Soriano M L, Valcárcel M. Strong luminescence of carbon dots induced by acetone passivation: efficient sensor for a rapid analysis of two different pollutants [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 804: 246-251.
- [27] 赵丹, 李娇甜, 杨天鸣, 等. L-半胱氨酸修饰的水溶性掺杂型 CdZnTe 量子点的水热法制备和表征 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)* 2013, 32(3) : 50-53.
- [28] Mehta V N, Jha S, Kailasa S K. One-pot green synthesis of carbon dots by using *Saccharum officinarum* juice for fluorescent imaging of bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells [J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, 38(9) : 20-27.
- [29] Weng C I, Chang H T, Lin C H, et al. One-step synthesis of biofunctional carbon quantum dots for bacterial labeling [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 1-6.