

## 调查研究

## 甘肃省 2022 年市售小麦粉中 4 种恩镰孢菌素污染情况调查

骆姗<sup>1</sup>, 梁琼<sup>1</sup>, 蒙元洁<sup>1</sup>, 寇明泽<sup>2</sup>

(1. 甘肃省疾控中心, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州文理学院, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:**目的 调查 2022 年甘肃省市售小麦粉中恩镰孢菌素(ENNs)污染情况。方法 采集甘肃省 15 个市(州、区)市售小麦粉样品 80 份,按照《国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》方法检测,对所得数据进行统计学分析。结果 2022 年甘肃省市售小麦粉中 4 种 ENNs 检出率由高到低依次为 ENNB(11/80, 13.75%)、ENNB1(9/80, 11.25%)、ENNA 与 ENNA1 均为(6/80, 7.50%)。甘肃省 15 个市(州、区)地区小麦粉中除武威、白银和定西的小麦粉样品中未检测出任何一种 ENNs 外,其余 12 个地区均至少检测出一种 ENNs。结论 2022 年甘肃省市售小麦粉中 4 种 ENNs 均有检出,但含量低于国内外已报道的研究,证明甘肃省市售小麦粉中 ENNs 污染程度较低。

**关键词:**小麦粉; 恩镰孢菌素; 高效液相色谱-串联质谱; 食品污染物; 真菌毒素; 调查

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)05-0577-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.05.010

## Investigation on contamination of 4 enniatins in wheat flour in Gansu Province in 2022

LUO Shan<sup>1</sup>, LIANG Qiong<sup>1</sup>, MENG Yuanjie<sup>1</sup>, KOU Mingze<sup>2</sup>

(1. Gansu Provincial Center For Disease Control and Prevention, Gansu Lanzhou 730000, China;

2. Lanzhou University of Arts and Science, Gansu Lanzhou 730000, China)

**Abstract: Objective** The concentration of enniatins (ENNs) in wheat flour from Gansu Province in 2022 was investigated. **Methods** Totally 80 wheat flour samples were collected from 15 cities in the Gansu Province. The samples were statistic with national handbook for monitoring food contamination and hazardous factors. The data were analyzed by correlation analysis. **Results** The detection rates of four toxins in wheat flour sold in Gansu Province were ENNB13.75% (11/80, 13.75%), ENNB1 (9/80, 11.25%), ENNA and ENNA1 (6/80, 7.50%). Non of ENNs was detected in the wheat flour samples from Wuwei, Baiyin and Dingxi in Gansu Province, and at least one ENNs was detected in the other 12 regions. **Conclusion** Four kinds of ENNs were detected in wheat flour in Gansu Province, but the contents were lower than that reported all of the world, which proved that the pollution degree of ENNs in wheat flour sold in Gansu Province was low.

**Key words:** Wheat flour; enniatins; HPLC-MS/MS; food contamination; mycotoxin; investigation

镰刀菌属种类繁多、污染范围广、污染毒性强,通常在极低浓度下就会引起毒性作用,往往是谷物生产中最令人担忧的菌属。近年来,随着研究的不断深入,新兴的镰刀菌毒素不断被发现,其中 4 种恩镰孢菌素(Enniatins, ENNs)A、A1、B、B1 最引人关注。ENNs 是一大类环状六肽,目前由约 26 种已知的天然类似物组成<sup>[1]</sup>。ENNs 的产生主要与燕麦镰刀菌、三线镰刀菌和梨孢镰刀菌有关。在大部分土

壤气候环境中,这些真菌会寄生在多种寄主植物上,因此会造成小麦、玉米和水稻等谷物的污染<sup>[2]</sup>。细胞毒性是 ENNs 较明显的毒性特点,不同种类 ENNs 的毒性具有差异,其中 ENNA 对 Wistar 大鼠表现出免疫毒性<sup>[3]</sup>,ENNB 体外对肝细胞毒性大于黄曲霉毒素 B1,并且对血小板祖细胞有抑制作用,可诱导体内血小板产生的减少,对凝血有不利影响<sup>[4]</sup>。国外学者曾对全球多个国家和地区的粮食进行真菌毒素筛查,发现潮湿气候地区的粮食中 ENNs 的检出率非常高。国际上对小麦粉的研究较多,芬兰、挪威、突尼斯和日本的小麦粉样品中检测出至少一种 ENNs 的概率高达 100%<sup>[5]</sup>。目前,国内外尚无 ENNs 限量标准。为了解甘肃省市售小麦粉中 ENNs 污染情况,同时也为监管部门制定政策及

收稿日期:2023-04-11

基金项目:兰州市科技局科技计划(2022-2-65);甘肃省科技计划重点研发计划(23YFNA0028)

作者简介:骆姗 女 主管技师 研究方向为理化检验工作

E-mail:lsapple@163.com

通信作者:寇明泽 男 副主任技师 研究方向为理化检验工作

E-mail:646343850@qq.com

为国家卫生标准限值确立提供理论及数据支持,本研究选择了甘肃省有代表性的15个地市作为采样点,初步调查了2022年甘肃省市售小麦粉中4种ENN<sub>s</sub>的污染情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

根据甘肃省行政区划以及各地区的消费量与人口数量,按照一定的比例在15个市(州、区)地区(兰州、酒泉、武威、甘南、庆阳、平凉、天水、张掖、临夏、白银、金昌、陇南、嘉峪关、定西和兰州新区)所辖的超市、农贸市场(1:1)进行采样,共采集不同种类小麦粉样品80份,其中小麦产地为甘肃省本地的小麦粉28份(下文简称本地地产小麦粉),小麦产地为甘肃以外省份的小麦粉52份(下文简称外地地产小麦粉)。

### 1.2 主要仪器与试剂

HPLC-MS/MS仪(XEVO-TQ,美国Waters公司);高速离心机(3k30,德国Sigma公司);天平(PL303,上海能共实业有限公司);涡旋振荡器(TARGIN VX-III,北京踏棉科技有限公司);氮吹仪(N-EVAP112,美国Orangomation公司)。

4种真菌毒素标准品:ENNA(CAS:2503-13-1)、ENNA1(CAS:4530-21-6)、ENNB(CAS:917-13-5)、ENNB1(CAS:19914-20-6),购自美国Romer Labs公司;Prime HLB净化小柱,购自美国Waters公司;乙腈、乙酸、均为色谱纯;其余试剂均为分析纯,试验用水为GB/T 6682规定的一级水,由超纯水仪制备(Milli-Q,美国Millipore公司)。

### 1.3 ENNs检测方法

采集样品进行实验室集中检测,样品处理及检测方法参照《国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》中《食品中恩镰孢菌素和白僵菌素测定的标准操作程序—液相色谱-串联质谱法》进行,检测项目包括ENNA、ENNA1、ENNB、ENNB1。为保证检测数据准确可靠,实验室在样品进行检验之前,首先进行方法学考查,对样品提取过程、色谱分离及质谱参数进行优化,以期得到更好的回收率及分离度。在样品检测过程中进行实验室内部及实验室间质量控制,并同时平行样品检测、阳性样品复测、样品加标回收检测等实验,以确保检测结果准确可靠。

#### 1.3.1 样品前处理

准确称取5g(精确到0.01g)试样于50mL离心管中,加入40mL乙腈-乙酸-水(84:1:15,体积比)提取液,涡旋振荡提取20min,然后以8000r/min

离心5min。准确移取4mL上清液过Prime HLB净化小柱,收集净化液于玻璃管中。加入2mL乙腈淋洗净化柱,抽干柱子,合并全部淋洗液与净化液,40~50℃下氮气吹干,用1mL80%的乙腈-水溶液复溶,涡旋振荡1min,于12000r/min离心10min或0.22μm滤膜过滤,上清液供LC-MS/MS分析。

#### 1.3.2 标准溶液的配制

分别准确吸取100μg/mL ENNA、ENNA1、ENNB和ENNB1标准储备液10μL于同一10mL容量瓶中,加乙腈稀释至刻度,得到0.1μg/mL的混合标准液。此溶液密封后-20℃保存。

称取6份空白样品,按与样品相同前处理方法处理得到空白基质液,将空白基质液混匀后,准确移取适量标准工作液(0.1μg/mL)配制成含目标化合物0.5、1.0、5.0、10、20、50ng/mL的基质匹配标准系列工作液。

### 1.4 统计学分析

采用Excel 2016对结果进行分析,低于检出限的结果按照检出限的一半进行统计,使用SPSS 26.0软件对各地区的数据进行分析,检出率的比较运用Fisher确切概率法,检验水准 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 线性范围和检出限

采用基质匹配法定量。按实验步骤进行样品的制备、提取及净化得到空白基质液,将ENNA、ENNA1、ENNB、ENNB1标准储备液稀释成6个不同的浓度,分析线性关系。3倍信噪比S/N作为仪器的检出下限(Limit of quantity, LOD),结果见表1。

表1 4种ENN<sub>s</sub>的线性方程与线性相关系数和LOD

Table 1 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients ( $R^2$ ) and LODs of 4 ENNs

毒素种类	回归方程	相关系数/ $R^2$	LOD/(μg/kg)
ENNA	$Y=2\ 757.21X-46.919\ 5$	0.999	0.1
ENNA1	$Y=6\ 810.78X+240.087$	0.999	0.1
ENNB	$Y=4\ 668.00X+2\ 126.01$	0.999	0.1
ENNB1	$Y=6\ 219.34X+1\ 402.36$	0.997	0.1

### 2.2 加标回收率

选取阴性样品进行加标回收试验,分别向两份样品中加入低、高两个浓度水平的标准工作液,使得目标浓度为10μg/kg和20μg/kg。加标实验的回收率为81.6%~112.6%,检测结果准确可靠。具体数据见表2。

#### 2.2.1 4种毒素在全省市售小麦粉中污染情况

2022年甘肃省15个地市共检测小麦粉样品

表 2 4 种恩镰孢菌素的回收率  
Table 2 Recoveries of four types of enniatins

毒素	本底浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	加标水平/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	检测浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率/%
ENNA	<0.10	10.00	8.82	88.2
	<0.10	20.00	16.2	81.6
ENNA1	<0.10	10.00	10.5	104.5
	<0.10	20.00	22.3	111.6
ENNB	<0.10	10.00	10.1	101.1
	<0.10	20.00	22.4	112.6
ENNB1	<0.10	10.00	8.78	87.8
	<0.10	20.00	18.4	91.8

80 份,其中兰州采集样品 5 份;酒泉、武威、庆阳、平凉、天水、张掖、临夏、白银以及金昌采集样品 4 份;甘南采集样品 9 份;陇南采集样品 8 份;嘉峪关以及定西、兰州新区采集样品 4 份。各地区采集样品份数见图 1,本地地产小麦粉与外地产小麦粉份数见图 2。

甘肃省 15 个地市市售小麦粉 4 种 ENNs 均有检出,样品中至少存在一种毒素的检出率为 21.25%,4 种毒素均有检出的检出率为 3.75%,检出率由高到低依次为 ENNB 13.75%(11/80)、ENNB1 11.25%(9/80)、ENNA 与 ENNA1 均为 7.50%(6/80),样品中检测出的 4 种毒素平均浓度和最大浓度均呈现 ENNB>ENNB1>ENNA1>ENNA 的趋势。在国内外研究中,4 种毒素的污染大多呈现类似趋势,即 ENNB 是小麦的主要污染物,ENNB 的含量都远高于其余 3 种毒素,ENNB1 含量也较高,ENNA 和 ENNA1

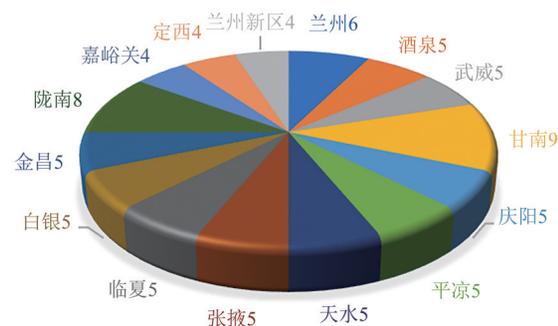


图 1 甘肃省 15 个地区各采集样品份数情况 (n=80)  
Figure 1 Information on sample collection across in Gansu Province (n=80)

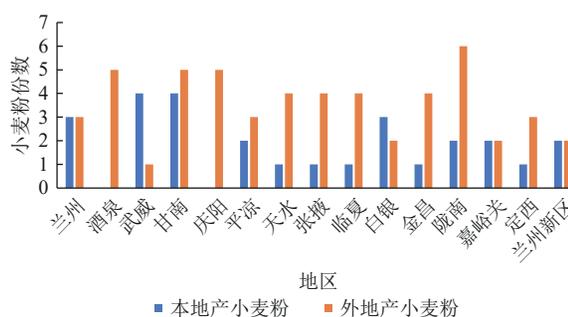


图 2 甘肃省 15 个地区本地地产小麦粉与外地产小麦粉样品份数  
Figure 2 Quantity of landed wheat flour and non-landed wheat flour by region

含量较低甚至在很多样品中没有检出。4 种 ENNs 具体检测结果见表 3。

表 3 甘肃省市售小麦粉中 4 种 ENNs 检测情况 (n=80)  
Table 3 Natural occurrence of ENNs in wheat flour from Gansu Province (n=80)

产品	毒素	检出样品个数	检出率/%	平均浓度/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	最大浓度/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	范围/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
小麦粉	ENNA	6	7.50	0.163	5.89	0.51~5.89
	ENNA1	6	7.50	0.224	10.0	0.45~10.04
	ENNB	11	13.75	2.11	108	0.54~108.15
	ENNB1	9	11.25	0.672	37.4	0.46~37.45

### 2.2.2 甘肃省小麦粉中 ENNs 污染情况区域分布

甘肃省 15 个市(州、区)小麦粉中,武威、白银和定西的小麦粉样品中未检测 ENNs,其余 12 个地区均至少检测出一种 ENNs。检出率较高的地区为临夏、庆阳、金昌、兰州。ENNs 检出率在各地区间的差异无统计学意义 ( $P=0.665$ )。结果见表 4。ENNB 在兰州新区、嘉峪关、天水 3 个地区的小麦粉中也被检出且含量较高。其污染种类趋势以及污染浓度基本符合文献报道的国内外污染状况。

图 3 横坐标中的温度为四地 2022 年的平均温度,柱状图显示为各地小麦粉中毒素含量的检出样品平均值,折线代表 2022 年的平均降水量。从降水量和温度来看,甘南、临夏地区年降水量较高,并且平均温度显著低于未检出阳性样品的两地,因此,温湿度对 ENNs 的检出以及含量水平具有一定

的影响。从图 3 可以看出临夏、甘南地区检出率以及毒素含量水平高于其他地区,这是由于镰刀菌的生长与温湿度密切相关。

### 2.2.3 产地对于污染水平的影响

2022 年甘肃省 15 个地市 80 份小麦粉样品中,本地地产小麦粉 28 份、非本地地产小麦粉 52 份。本地地产小麦 ENNs 总检出率为 17.86%(5/28),非本地地产小麦 ENNs 总检出率为 25.00%(13/52)。结果见表 5。4 种毒素在本地地产小麦粉和非本地地产小麦粉中单一毒素的检出率也呈现相似的趋势。

## 3 讨论

对本文所用的检测方法 HPLC-MS/MS 进行方法学评价,结果表明 4 种毒素的线性关系良好,ENNA、ENNA1、ENNB 的相关系数  $R^2=0.999$ ,ENNB1 的相

表4 甘肃省不同地区小麦粉中恩镰孢菌素检测情况( $n=80$ )Table 4 Geographic distribution difference on natural occurrence of ENNs in wheat flour from Gansu Province( $n=80$ )

地区	样品量	检出率 <sup>a</sup> /%	ENNs污染最大值/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
			ENNA	ENNA1	ENNB	ENNB1
兰州	6	33.33(2/6)	0.517	0.727	7.776	ND
酒泉	5	20.00(1/5)	ND	ND	0.547	0.526
武威	5	0(0/5)	ND	ND	ND	ND
甘南	9	11.11(1/9)	0.886	1.330	4.047	3.141
庆阳	5	40.00(2/5)	0.584	ND	ND	1.735
平凉	5	20.00(1/5)	1.480	1.760	9.966	5.013
天水	5	20.00(1/5)	ND	ND	1.097	ND
张掖	5	20.00(1/5)	ND	ND	ND	1.179
临夏	5	60.00(3/5)	5.891	10.003	108.506	37.380
白银	5	0(0/5)	ND	ND	ND	ND
金昌	5	40.00(2/5)	ND	0.459	ND	0.458
陇南	8	12.50(1/8)	ND	ND	4.001	ND
嘉峪关	4	25.00(1/4)	ND	ND	11.149	ND
定西	4	0(0/4)	ND	ND	ND	ND
兰州新区	4	25.00(1/4)	ND	ND	18.659	4.221
合计	80	21.25(17/80)	5.891	10.003	108.506	37.380
P值		0.665				

注:a:表示样品中至少检出一种ENNs的概率;ND:样品中ENNs含量 $<0.100\mu\text{g}/\text{kg}$ ,未被检出

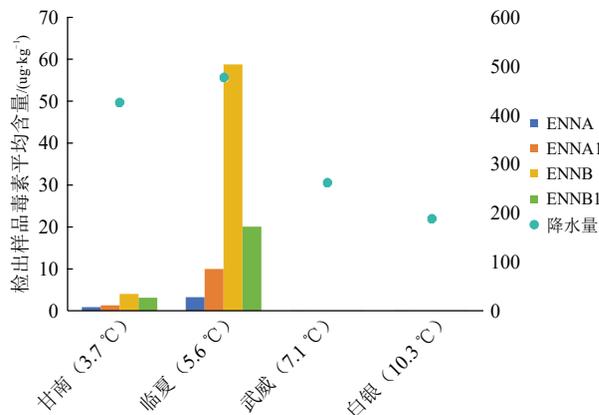


图3 气候条件与恩镰孢菌素检测值的关系

Figure 3 Relationship between climatic conditions and ENNs content level

表5 本地地产小麦粉与外地地产小麦粉恩镰孢菌素检出率

Table 5 Detection rates of real estate wheat flour and non-real estate wheat flour

检出率/%	本地地产小麦粉		非本地地产小麦粉	
	检出个数	检出率/%	检出个数	检出率/%
ENNA	2	7.14(2/28)	4	7.68(4/52)
	2	7.14(2/28)	4	7.69(4/52)
ENNA1	2	7.14(2/28)	4	7.69(4/52)
	4	14.28(4/28)	7	13.46(7/52)
ENNB	3	10.71(3/28)	6	11.54(6/52)
	3	10.71(3/28)	6	11.54(6/52)
ENNB1	3	10.71(3/28)	6	11.54(6/52)
	3	10.71(3/28)	6	11.54(6/52)

关系数  $R^2=0.998$ 。4种毒素回收率 81.6%~112.6%。实验方法可以满足日常监测需要。

国内仅有江苏地区对小麦粉和大米中ENNs污染现状进行了研究,小麦粉中ENNB( $0.030\text{mg}/\text{kg}$ )、ENNB1( $0.005\text{mg}/\text{kg}$ ),检出率为100%(51/51),其余两种未检出。与本研究相比,检出率较高,但是

检测浓度与本研究相比较低。与日本100%(97/97)<sup>[6]</sup>、捷克47.14%(33/70)<sup>[7]</sup>、罗马尼亚48.45%(47/97)<sup>[8]</sup>和法国61.28%(288/470)<sup>[9]</sup>等研究报道的检出率相比,甘肃省小麦粉中ENNs污染程度较低。日本是目前已报道的研究中ENNs检出浓度最低的国家,ENNA、ENNA1、ENNB、ENNB1的平均浓度为0.100、2.200、52.500、8.800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,最大浓度为4.000、27.400、633.000、96.400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,与其相比,甘肃省小麦粉中除ENNA的平均浓度略高于日本地区外,其余3种毒素的平均值以及所有毒素的最大值均低于日本。

本文检测了甘肃省市售80份小麦粉样品中4种ENNs,4种毒素均有检出。有研究表明,4种毒素的污染大多呈现的趋势为ENNB>ENNB1>ENNA1>ENNA<sup>[6-8]</sup>,甘肃省市售小麦粉中ENNs污染情况符合此趋势,但是与国内外相关研究<sup>[6-8]</sup>比较,甘肃小麦粉检出率较高的同时浓度也比较高,其中ENNB最大浓度高达108.506  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。临夏、甘南地区检出率以及毒素含量水平高于其他地区,这是由于镰孢菌的生长与温湿度密切相关,较高的湿度以及较低的平均温度使得产生ENNs的真菌达到了较为适宜产毒的环境,因此其生长繁殖能力和产毒能力都会增强<sup>[10]</sup>。因条件所限,本次所采集样品份数少,结果可能不具有代表性。有研究表明,除了气候条件外,如粮谷品种或加工过程等因素的影响应该也很重要。若在同一地区的样品中检出多种ENNs,毒素的含量或许会与粮食加工处理过程有关,不合格的加工过程会导致毒素在粮食表面残留<sup>[11]</sup>。本研究数据显示不同产地检出率有一定的差别,但是差距相当小。同时也有文献指出,ENNs

在小麦粉中的产毒分布情况会随产地、环境因素(如气候、温湿度)变化而不同,但因小麦产地对其检出率以及含量水平未产生显著影响,因此小麦粉制品在加工、运输和储藏过程中的环境条件是否会对其产毒率和产毒含量造成影响,还需进一步试验研究<sup>[12]</sup>。

由于本实验数据有限,并且对于限量值以及人群暴露量方面数据缺失,因此增加了风险评估难度。因此,根据本研究表明,未来有必要进一步了解甘肃省居民通过小麦粉及其膳食制品对ENN的暴露水平,为这类毒素的系统评估工作提供依据。

### 参考文献

- [1] 韩小敏,李凤琴,徐文静,等.重要产毒镰刀菌合成白僵菌素和恩镰孢菌素研究进展[J].中国食品卫生杂志,2019,31(1):89-93.  
HAN X M, LI F Q, XU W J, et al. Progress on biosynthesis of beauvericin and enniatins for important toxin-producing *Fusarium* species[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 89-93.
- [2] GAUTIER C, PINSON-GADAIS L, Richard-Forget F. *Fusarium* mycotoxins enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(17): 4788-4798.
- [3] JUAN C, MANYES L, FONT G, et al. Evaluation of immunologic effect of Enniatin A and quantitative determination in feces, urine and serum on treated Wistar rats [J]. Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology, 2014, 87(1): 45-53.
- [4] 黄晓静,王少敏,毛丹,等.镰刀菌属真菌毒素的毒性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3117-3128.  
HUANG X J, WANG S M, MAO D, et al. Research progress on toxicity of *Fusarium* mycotoxins [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(8): 3117-3128.
- [5] 刘柏林,倪曼,单晓梅,等.冷诱导液液萃取-分散固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中白僵菌素和4种恩镰孢菌素残留[J].色谱,2021,39(12):1331-1339.  
LIU B L, NI M, SHAN X M, et al. Simultaneous determination of beauvericin and four enniatins in eggs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with cold-induced liquid-liquid extraction and dispersive solid phase extraction [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(12): 1331-1339.
- [6] YOSHINARI T, SUZUKI Y, SUGITA-KONISHI Y, et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market, and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins [J]. Food Additives And Contaminants Part A-chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2016, 33(10): 1620-1626.
- [7] SUMÍKOVÁ T, CHRPOVÁ J, DŽUMAN Z, et al. Mycotoxins content and its association with changing patterns of *Fusarium* pathogens in wheat in the Czech Republic [J]. World Mycotoxin Journal, 2017, 10(2): 143-151.
- [8] STANCIU O, JUAN C, MIERE D, et al. Climatic conditions influence emerging mycotoxin presence in wheat grown in Romania-A 2-year survey [J]. Crop Protection, 2017, 100: 124-133.
- [9] ORLANDO B, GRIGNON G, VITRY C, et al. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France [J]. Mycotoxin Research, 2019, 35(4): 369-380.
- [10] 韩小敏,李凤琴,徐文静.食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的污染情况及分析方法研究进展[J].中国食品卫生杂志,2017,29(4):508-513.  
HAN X M, LI F Q, XU W J. Research progress on the contamination of beauvericin and enniatins and the development of analytical method in food [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2017, 29(4): 508-513.
- [11] SANTINI A, MECA G, UHLIG S, et al. Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food-a review [J]. World Mycotoxin Journal, 2012, 5(1): 71-81.
- [12] 申慧婧,张弛,周爽,等.食品中新兴真菌毒素检测技术及其污染现状研究进展[J].食品安全质量检测学报,2023,14(12):203-213.  
SHEN H J, ZHANG C, ZHOU S, et al. Research progress of emerging mycotoxin detection technology and its contamination status in food [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(12): 203-213.