



论文

食品安全检测新技术与新方法专刊

基于阴极电致化学发光法的小麦粉中过氧化苯甲酰的痕量分析检测

陈小燕^{①②}, 任凌晴^①, 张继芳^①, 孙建军^{①*}

① 食品安全分析与检测技术教育部重点实验室; 福建省食品安全分析与检测技术重点实验室; 海西食品安全检测技术与产品协同创新中心; 福州大学化学学院, 福州 350108

② 福建省计量科学研究院, 福州 350003

*通讯作者, E-mail: JJSun@fzu.edu.cn

收稿日期: 2015-10-27; 接受日期: 2015-11-14; 网络版发表日期: 2016-02-22

国家自然科学基金(编号: 20975022, 21475023, 21275030)和“十二五”国家科技支撑计划项目(编号: 2012BAD29B06)资助项目

摘要 采用热电子诱导阴极电致化学发光技术, 建立了小麦粉中过氧化苯甲酰(BPO)的高灵敏度检测方法. 以氧化处理的玻碳电极(C_xO_{1-x})为工作电极, 在电极上施加 -18 kV (vs. Ag/AgCl)阴极脉冲电位, 电子通过隧穿机制无能量损失地穿越能垒, 形成热电子, 而后经水合热活化作用, 形成水合电子, 溶液中的 BPO 在强还原性的水合电子作用下, 生成了强氧化性自由基, 生成的自由基参与了鲁米诺(Luminol)的氧化还原反应, 而激发 Luminol 发光, 从而最终实现 BPO 的痕量检测. 线性范围为: $10\sim 1000\text{ }\mu\text{g/L}$; 检出限($S/N=3$)为 $0.7\text{ }\mu\text{g/L}$. 本方法用于小麦粉中 BPO 分析, 回收率达 $97.2\%\sim 100.4\%$, 结果令人满意.

关键词 热电子诱导, 阴极电致化学发光, 过氧化苯甲酰, 痕量检测, 小麦粉

1 引言

过氧化苯甲酰(又名过氧化二苯甲酰, benzoyl peroxide, BPO)是一种强氧化剂, 易被还原为苯甲酸, 由于其同时还具有加速小麦粉成熟后抑制小麦粉的霉变、提高小麦的出粉率等作用, 是目前小麦粉中使用的主要增白剂. 然而, 由于 BPO 具有强氧化性, 其对小麦粉中 β -胡萝卜素、维生素 A、维生素 E 和维生素 B1 等均具有较强的破坏作用^[1]; 同时, 其还原产物苯甲酸摄入过多, 会导致肝功能衰弱或肝功能损伤的患者肝脏病变, 且面粉中残留的未分解的 BPO,

食加热制作过程中产生苯自由基, 进而形成有毒的在面物质——苯、苯酚、联苯, 对健康有不良的影响. 我国 GB2760-2007 规定, 小麦粉中 BPO 的最大使用量不得超过 0.06 g/kg ^[2]. 建立准确、快速、灵敏的面粉及面制品中 BPO 测量方法, 将有利于商品面粉及面制品的质量控制, 为质检部门执法检测提供技术支持. 高效液相色谱(HPLC-UV)^[3]和气相色谱(GC)^[4]作为国标方法是目前小麦粉中 BPO 的主要检测方法, 但这两种方法均需先将 BPO 转化成苯甲酸后进行测量, 故前处理较为繁琐, 且检测灵敏度较低. 其他的一些检测方法列于表 1 中^[5-13]. 其中, 化学发光法的

引用格式: 陈小燕, 任凌晴, 张继芳, 孙建军. 基于阴极电致化学发光法的小麦粉中过氧化苯甲酰的痕量分析检测. 中国科学: 化学, 2016, 46: 280-286
Chen XY, Ren LQ, Zhang JF, Sun JJ. Development of a high-quality benchmark for scoring function assessment. *Sci Sin Chem*, 2016, 46: 280-286, doi: 10.1360/N032015-00216

表 1 小麦粉中 BPO 检测的不同方法

检测方法	检出限	参考文献
气相色谱法	0.5 mg/kg	[5]
高效液相色谱法	0.3 mg/kg	[6]
碘量法	1.56×10^{-2} mg/L	[7]
碳纳米管修饰的 BPO 生物传感器的研制	2.3×10^{-6} mol/L	[8]
化学发光法	1.4×10^{-10} g/mL	[9]
生物传感器技术	5×10^{-7} mol/L	[10]
伏安法	2.5×10^{-7} mol/L	[11]
化学发光微流动注射芯片检测法	4×10^{-7} g/mL	[12]
光度法	0.025 mg/L	[13]

检出限虽然低至 1.4×10^{-7} g/L, 但该方法仪器较为复杂, 发光机理有待进一步研究.

本实验采用的阴极电致化学发光 (cathodic electrochemiluminescence, cathodic ECL or CECL) 是一项新型的具有独特性质的电致化学发光方法, 它与常规电致化学发光 (ECL) 相比, 最大的区别在于发光过程所需要的活性自由基的产生途径不同. 热电子诱导的阴极电致化学发光通常需要有被一定程度氧化的电极表面, 氧化层的厚度通常小于 $4 \sim 6$ nm^[14-16], 以形成隧穿能垒; 其次, 需要向工作电极施加高强度的阴极脉冲极化, 在此条件下, 电子通过隧穿机制无能量损失地穿越能垒, 成为具有比费米能级更高能量或者比热能级更高能级更高能量的电子——热电子(e_h)^[17], 热电子进入水的导带, 经水合热能化作用, 形成水合电子(e_{aq})^[14], 水合电子的标准还原电势为 -2.9 V (vs. SHE). 因此, 它比普通的电子更具还原性, 能还原许多在常规电极上很难还原的物质. 尤其能诱导许多具有强氧化性的物质在电极表面发光^[18,19].

本研究首次采用热电子诱导阴极电致化学发光技术分析检测小麦粉中 BPO, 并对 BPO 在氧化处理的玻碳电极(C_xO_{1-x})表面上的 CECL 发光原理, 以及于 BPO 分析样品中加入鲁米诺(Luminol)使得 C_xO_{1-x} 电极表面上的 CECL 发光显著增强的原因进行了初步探讨. 本方法的线性范围为 $10 \sim 1000$ μ g/L; 检出限 ($S/N=3$) 可达 0.7 μ g/L, 方法快速简便、易操作、灵敏度高, 检出限低于目前报道的许多种检测方法, 结果令人满意.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

多通道电化学工作站(VMP3, Princeton Applied

Research Co., Ltd., 美国)提供阴极脉冲电位; 超微弱发光分析仪(BPCL-K, 中科院生物物理研究所, 中国)采集发光信号; 三电极系统($\Phi 3$ mm C_xO_{1-x} 电极为工作电极, 3.80 mm $\times$ 13.90 mm 铂片电极为对电极, Ag/AgCl (饱和 KCl)电极为参比电极.

超声机(KQ-100DE 型, 昆山市超声仪器有限公司, 中国); 离心机(TGL-16C, 上海安亭科学仪器厂, 中国); 氮吹仪(HGC-24A 型, 天津市恒奥科技发展有限公司, 中国).

BPO 标准品(99.0%, Aladdin, 美国), BPO 溶于优级纯的甲醇中, 其他试剂均为分析纯, 使用前未进一步纯化. 200 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 7.5). 实验用水为 Milli-Q 超纯水.

2.2 实验方法

2.2.1 C/C_xO_{1-x} 电极制备方法

电极的制作方法与本课题组^[20]之前报道的 C/C_xO_{1-x} 电极的制作方法相同, 具体过程如下: 玻碳电极($\Phi 3$ mm)分别在 800 、 1500 和 2000 目的砂纸上打磨, 直至电极表面光滑如新, 以打磨好的玻碳电极为工作电极, 铂片电极为对电极, Hg/Hg₂SO₄ 为参比电极, 置于 1.0 mol/L NaOH 溶液中以 1.6 V 为恒电位连续氧化还原 4 min. 以保证电极表面形成稳定的 C_xO_{1-x} 层.

2.2.2 CECL 条件

每日试验后, 将 C/C_xO_{1-x} 电极浸泡于清水中, 实验前, 用清水冲洗电极表面, 后用氮气吹干, 待用.

实验时采用三电极系统, 测量时工作电极面朝下, 正对光电倍增管, 以期达到测量效果. 施加 DPA 阴极脉冲, 脉冲示意图如图 1 所示, 预脉冲电位 (E_1)为 1 mV (vs. Ag/AgCl), 预脉冲时间(t_1)为 0.2 ms; 施加 -18 V (vs. Ag/AgCl)脉冲电位(E_2), 脉冲时间(t_2)为 0.2 ms, 脉冲周期(t_3)为 10 ms, 光电倍增管

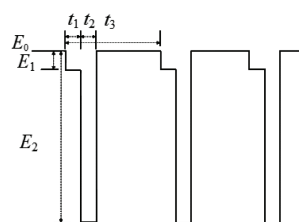


图 1 DPA 脉冲波形示意图

(PMT)上施加-900 V 电位, 采集 30 s 工作电极上的发光信号。

2.2.3 实际样品的处理

将 BPO 标准物质用甲醇配制成浓度为 1 g/L 的储备液, 4℃ 避光封口保存。

于市上采购小麦粉, 分别添加上储备液, 制得 BPO 浓度为 10、100 和 1000 $\mu\text{g/kg}$ 的系列小麦粉样品。

称取 1.0 g 小麦粉样品, 加入 50 mL 乙醇, 超声提取 30 min, 以 5000 r/min 离心 10 min, 至上层清液澄清。提净上层清液, 用氮吹仪吹干各供试样品。将吹干后的供试样品用 1 mL 纯乙醇复溶解即得待测样品液, 进行 CECL 方法检测分析。ECL 光谱通过系列滤光片测定, 并用高斯函数拟合。

3 结果与讨论

3.1 BPO 在 $\text{C/C}_x\text{O}_{1-x}$ 电极上的 CECL 行为

实验发现, 虽然 BPO 为有机强氧化剂, 但在不施加脉冲电位的情况下, BPO 在电极表面并无发光(图 2(a)); 当于电极上施加高强度的脉冲电位(-18 V)时, 浓度大于 100 mg/L 的 BPO 在 $\text{C/C}_x\text{O}_{1-x}$ 电极上有明显的发光, 且随着 BPO 的浓度增大, 发光强度显著增强(图 3)。当 BPO 的浓度达到或低于 50 mg/L 时, 此时电极的发光强度并不随着 BPO 浓度的降低而减弱, 并与电极在甲醇(即空白)中的发光强度几乎相同。同时, 我们考察了 BPO 在 $\text{C/C}_x\text{O}_{1-x}$ 电极上的发光最大波长(图 4(a)), 约为 510 nm, 这与 $\text{C/C}_x\text{O}_{1-x}$ 电极发光的最大波长相同^[20], 故我们推测了 BPO 的阴极电致化学发光原理——当于电极上施加 DPA 时, 强氧化剂 BPO 可以直接从电极氧化物层中的导带中夺取电子, 从而引起电子-空穴的复合发光, 即此种情境下观察到的光主要是 BPO 诱发的电极本身的阴极发光。

鉴于采用 CECL 法直接测量 BPO 未能达到实际检测要求, 为进一步降低检出限, 于待测液中加入 Luminol。实验发现, 当不施加 DPA 时, 低浓度的 BPO 与 Luminol 发生反应, 无明显的发光现象(图 2(b)); 而当于电极上施加脉冲电位时, Luminol 本身在电极表面出现了明显的发光(图 2(c)), 而当 BPO 存在时, 电极表面发光增强更为显著(图 2(e)), 且在

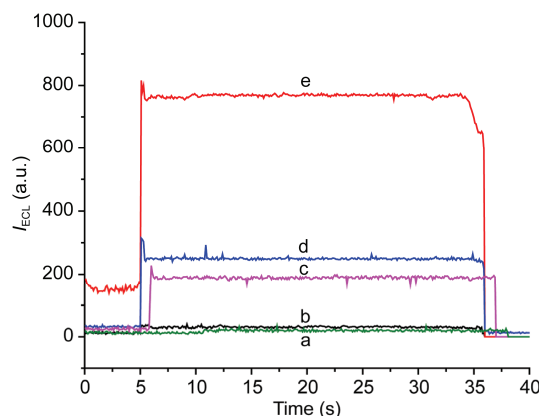


图 2 BPO 在 $\text{C/C}_x\text{O}_{1-x}$ 电极上的 ECL 行为. 缓冲溶液: 0.20 mol/L $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲液(BBS, pH 7.5); 支持电解质: 0.40 mol/L Na_2SO_4 溶液; Luminol: 1.0×10^{-4} mol/L; 施加脉冲电位方法见 2.2.2 小节所述, (a, b)均无施加脉冲电位, (c-e)均施加了-18 V 脉冲电位. (a) 400 $\mu\text{g/L}$ BPO 发光; (b) 400 $\mu\text{g/L}$ BPO 与 0.1 mmol/L Luminol 发光; (c) 0.1 mmol/L Luminol 发光; (d) 100 mg/L BPO 发光; (e) 400 $\mu\text{g/L}$ BPO 与 0.1 mmol/L Luminol 发光(网络版彩图)

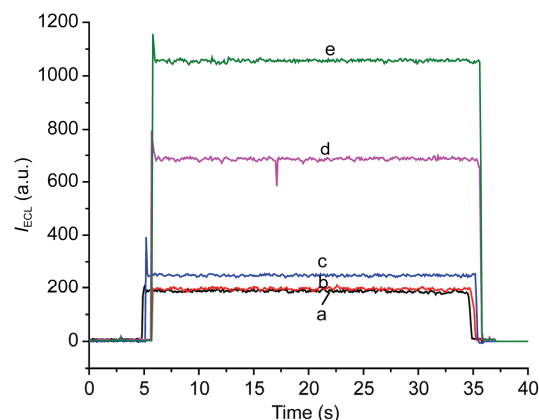


图 3 不同浓度的 BPO 在 $\text{C/C}_x\text{O}_{1-x}$ 电极上的 CECL. 缓冲溶液: 0.20 mol/L BBS 缓冲液(pH 7.5); 支持电解质: 0.40 mol/L Na_2SO_4 溶液; 施加脉冲电位方法同 2.2.2 小节所述. (a) 甲醇(空白)发光; (b) 50 mg/L BPO 发光; (c) 100 mg/L BPO 发光; (d) 500 mg/L BPO 发光; (e) 1000 mg/L BPO 发光(网络版彩图)

10~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 电极表面的发光强度随着 BPO 浓度的增大呈线性增强。

根据 Kumala 课题组^[21]的相关研究工作及其理论模型, 我们初步探讨了加入 Luminol 后 BPO 发光增强的机理。通过隧穿机制穿越能垒后的 e_h , 经过热敏化作用形成了 e_{aq} , 溶液中的 BPO 在强还原性水合电子的作用下, 生成了强氧化性自由基 $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-O}^{\cdot-}$,

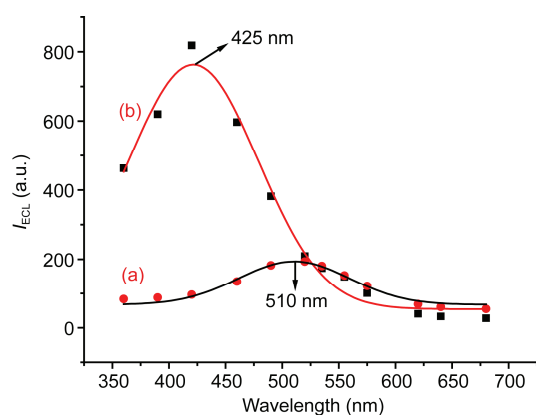


图 4 加入鲁米诺前后 BPO 在 C/C_xO_{1-x} 电极上的 CECL 光谱图. (a) 1000 mg/L BPO (溶于甲醇) 在电极上的 CECL 光谱图; (b) 于 10.0 mg/L BPO (溶于甲醇) 中加入 0.1 mmol/L Luminol 后, 电极表面的 CECL 光谱图. 其余条件同图 2

生成的 $C_6H_5-CO-O^{\bullet-}$ 此时作为共氧化剂, 参与了 Luminol 的发光反应, 如图 5 所示, BPO 的阴极脉冲并没有改变 Luminol 的发光机理^[15], 此时的发光物质为激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子 ($AP^{2-\bullet}$). 同时, 根据实验发现(图 4(b)), 于 BPO 溶液中加入 Luminol 后, C/C_xO_{1-x} 电极表面上的发光最大波长为 425 nm, 这与 Luminol 荧光的最大波长一致, 进一步佐证了我们的理论.

3.2 阴极脉冲电位的选择

考察了脉冲电位为 0~20 V 时 BPO 在 C/C_xO_{1-x} 电极上的发光行为, 结果如图 6 所示. 从图中可以看出, 当电压接近 -3 V 时才会有明显的发光现象产生, 此电压值与水的导带能级相当, 表明了该发光过程的起始步骤是由阴极脉冲作用下产生的高能热电子进入水的导带, 经水合热能化后产生的水合电子. 当

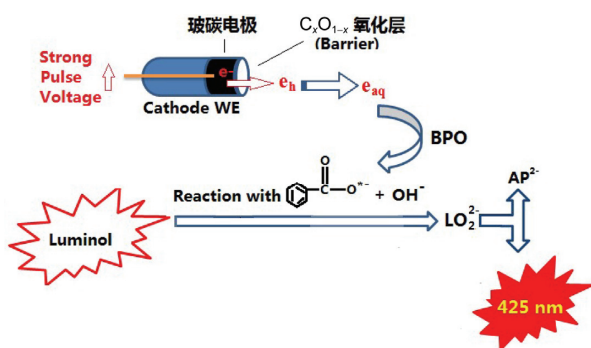


图 5 BPO 与 Luminol 反应发光的原理(网络版彩图)

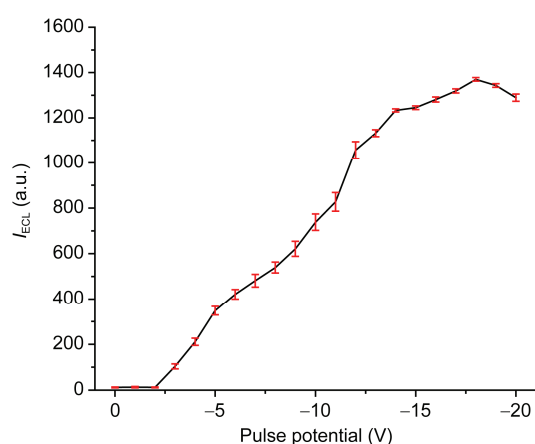


图 6 阴极脉冲电位的影响. BPO 浓度: 1000 $\mu\text{g/L}$ (溶于甲醇中); 其余条件同图 2

电压值达到 -18 V 时发光强度达到最大, 当电压值继续上升时, 发光不再进一步增强, 这可能是由于施加 -18 V 的电位后, 瞬间产生的热电子已充分满足 BPO 与 Luminol 发光反应的需要, 故最终选择 -18 V 为最佳脉冲电位.

3.3 Luminol 浓度的影响

实验表明, Luminol 浓度的增加可使 BPO 在电极表面的发光强度不断增大, 但当 Luminol 的浓度大于 1×10^{-4} mol/L 后, 发光强度没有明显增强, 且标准偏差增大(图 7). 综合考虑, 最终选择 Luminol 的浓度为 1×10^{-4} mol/L.

3.4 缓冲液类型的选择及缓冲溶液酸度的影响

BPO 在 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (磷酸盐, PBS)、 $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-}$

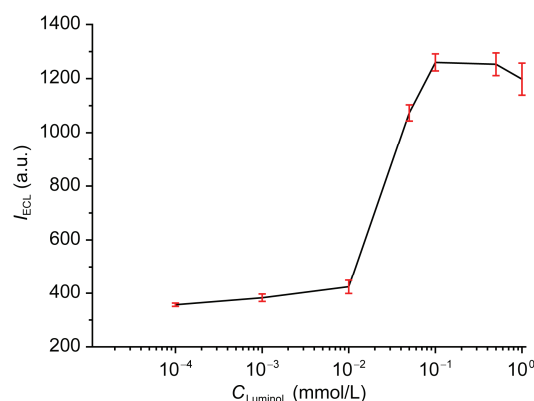


图 7 Luminol 浓度的影响. BPO 浓度: 1000 $\mu\text{g/L}$ (溶于甲醇中); 其余条件同图 2

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (硼酸盐, BBS)、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (柠檬酸盐, CPBS)缓冲液中, pH 变化对其在电极表面发光强度的影响如图 8 所示. 实验表明, BPO 在 BBS 中的发光效果优于其余两种缓冲溶液, 因此最终选择 BBS 作为本实验的缓冲溶液.

同时, 实验发现缓冲溶液的 pH 对发光强度有显著影响. 当 BPO 处于弱酸性至弱碱性(pH 6.0~7.5)缓冲溶液范围内, 发光强度较大; pH<6.0 或 pH>7.5 时, 发光强度均明显减弱, 如图 8 所示. BPO 在 BBS 缓冲液中, pH 7.5 时, 在电极表面的相应最为灵敏.

3.5 支持电解质浓度的选择

溶液中盐的浓度将会影响电极的极化, 对电流会造成一定的影响. 以 Na_2SO_4 为支持电解质, 考察了支持电解质浓度对 BPO 发光效果的影响, 如图 9

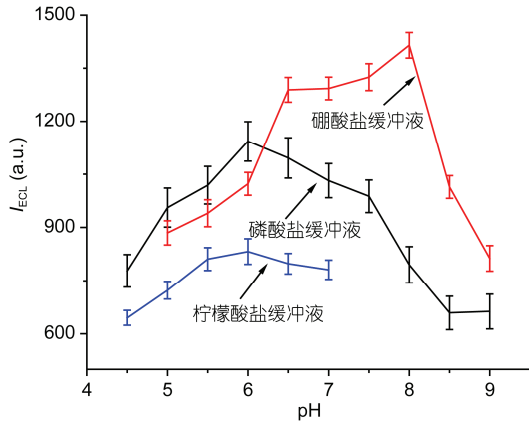


图 8 缓冲液类型及缓冲液 pH 的影响. BPO 浓度: $1000\text{ }\mu\text{g/L}$ (溶于甲醇中); Luminol: $1.0\times 10^{-4}\text{ mol/L}$ (溶于水中); 其余条件同图 2

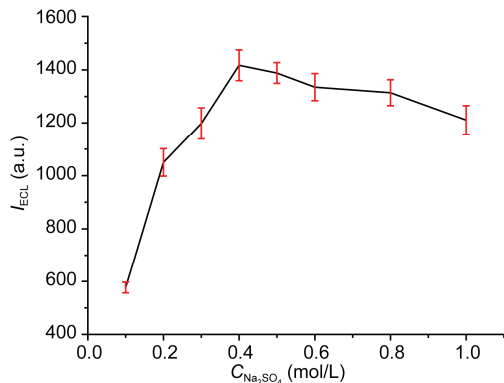


图 9 硫酸钠浓度的影响. BPO 浓度: $1000\text{ }\mu\text{g/L}$ (溶于甲醇中); Luminol: $1.0\times 10^{-4}\text{ mol/L}$ (溶于水中); 其余条件同图 2

所示. 当 Na_2SO_4 浓度为 0.4 mol/L 时, 发光强度达到最大; 之后, 随着支持电解质浓度的增加, 发光强度有减弱之势. 因此决定缓冲溶液中 Na_2SO_4 浓度为 0.40 mol/L .

3.6 方法的分析特性

如图 10 所示, 在最优化的条件下, C_xO_{1-x} 电极测量 BPO 的日内重现性(RSD)为 3.8% ($n=9$). 其线性回归方程为 $Y=0.9575X+394.0$ (Y : 发光强度, a.u.; X : 分析浓度, $\mu\text{g/L}$), 相关系数为 $R^2=0.9976$, 线性范围为 $10\text{--}1000\text{ }\mu\text{g/L}$ 、检出限($S/N=3$)为 $0.7\text{ }\mu\text{g/L}$.

3.7 实际样品分析

在最佳条件下, 对小麦粉样品中的 BPO (10 、 100 、 $1000\text{ }\mu\text{g/kg}$)进行回收率实验, 结果满意(表 2). 本方法前处理简单、样品提取试剂用量极微、选择性和灵敏度高, 有望用于面粉厂及执法部门对面粉、小麦粉的质量控制.

4 结论

热电子诱导阴极电致化学发光是一项新型的电

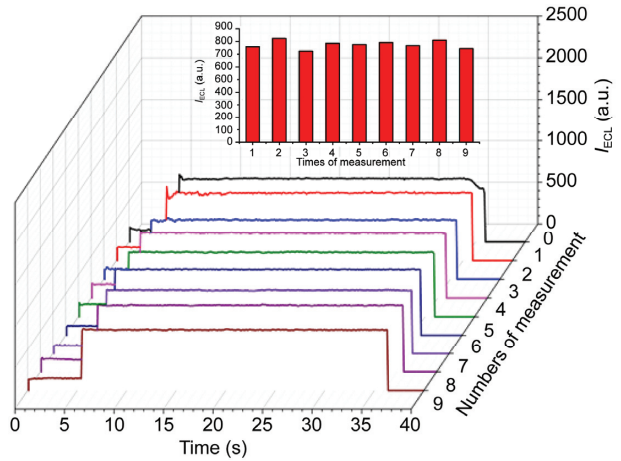


图 10 C_xO_{1-x} 电极测量 BPO 的重复性. BPO 浓度: $400\text{ }\mu\text{g/L}$ (溶于甲醇中); 其余条件同图 2 (网络版彩图)

表 2 小麦粉中 BPO 的检测实验

加入量($\mu\text{g/kg}$)	测定值($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)	RSD (%) ($n=7$)
0.0	100.8	—	2.2
10.0	110.5	97.2	5.6
100.0	199.2	98.4	4.7
1000.0	1104.8	100.4	3.3

致化学发光方法, 它能诱导许多具有强氧化性的物质在电极表面发光. 本研究首次采用该技术分析检测小麦粉中的过氧化苯甲酰 BPO, 线性范围为

10~1000 $\mu\text{g/L}$, 检出限($S/N=3$)可达 0.7 $\mu\text{g/L}$. 方法快速简便、易操作、稳定性良好、灵敏度高, 结果令人满意.

参考文献

- 1 李凤林、黄聪亮、余蕾. 食品添加剂. 北京: 化学工业出版社, 2008
- 2 卫生部食品卫生监督检验所, 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂使用卫生标准. GB 2760-2007. 北京: 中国标准出版社, 2007-08-22
- 3 国家粮食局. 小麦粉中过氧化苯甲酰的测定 高效液相色谱法. GB 22325-2008. 北京: 中国标准出版社, 2008-08-22
- 4 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 小麦粉中过氧化苯甲酰的测定方法. GB 18415-2001. 北京: 中国标准出版社, 2001-08-29
- 5 林秋萍. 食品科学, 2002, 23: 97-98
- 6 王德强, 方宏兵. 农产品加工, 2013, 3: 63-64
- 7 刘晓庚. 中国粮油学报, 2006, 21: 168-171
- 8 丁建英, 潘欢欢, 张根华, 权英, 詹月华. 食品科学, 2013, 34: 272-275
- 9 Yang WP, Zhang ZJ, Xu H. *Talanta*, 2004, 62: 661-666
- 10 李榕生, 王峰, 干宁. 中国粮油学报, 2009, 24: 157-160
- 11 Wang CY, Hu XY. *Anal Lett*, 2005, 38: 2175-2187
- 12 Wei L, Zhang ZJ, Liu Y. *Food Chem*, 2005, 95: 693-698
- 13 田林双, 于伟, 吴存兵, 顾鹏程, 周琳琨, 邱琳. 中国粮油学报, 2013, 28: 96-100
- 14 Kulmala S, Ala-Kleme T, Heikkilä L, Väre L. *J Chem Soc Faraday Trans*, 1997, 93: 3107-3113
- 15 Kulmala S, Ala-Kleme T, Kulmala A, Papkovsky D, Loikas K. *Anal Chem*, 1998, 70: 1112-1118
- 16 Wu AH, Sun JJ, Zheng RJ, Yang HH, Chen GN. *Talanta*, 2010, 81: 934-940
- 17 Barker JR. *J Lumin*, 1981, 23: 101-126
- 18 Chen XY, Zheng RJ, Qin SF, Sun JJ. *Talanta*, 2012, 101: 362-367
- 19 Zheng RJ, Fang YM, Qing SF, Song J, Sun JJ. *Sens Actu B Chem*, 2011, 157: 488-493
- 20 吴爱红. 几种新型阴极电致化学发光体系及其应用研究. 博士学位论文. 福州: 福州大学, 2010. 43-60
- 21 Eskola J, Makinen P, Oksa L, Loikas K, Nauma M, Jiang QH, Hakansson M, Suomi J, Kulmala S. *J Lumin*, 2006, 118: 238-244

Determination of benzoyl peroxide (BPO) in wheat flour based on hot electron-induced cathodic electrochemiluminescence

Xiaoyan Chen^{1,2}, Lingqing Ren¹, Jifang Zhang¹, Jianjun Sun^{1*}

¹ Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety, Ministry of Education; Fujian Provincial Key Laboratory of Analysis & Detection Technology for Food Safety; Collaborative Innovation Center of Food Safety Detection Technology and Products; College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

² Fujian Metrology Institute, Fuzhou 350003, China

*Corresponding author (email: JJSun@fzu.edu.cn)

Abstract: A sensitive method based on hot electron-induced cathodic electrochemiluminescence has been developed for the trace determination of benzoyl peroxide (BPO). Under the cathodic pulse potential of -18.0 V (vs. Ag/AgCl), after tunneling through the C_xO_{1-x} film, the hot electrons underwent a fast hydration reaction in the conduction band of water, and forming hydrated electrons partially. The hydrated electrons reacted with BPO, and the strong oxidants $\text{C}_6\text{H}_5\text{-COO}^{*-}$ were formed. Ultimately, the cathodic ECL results from the luminol oxidized by the strong oxidants. Under the optimum conditions, the excellent linearity was observed in the range from $10\text{--}1000\text{ }\mu\text{g/L}$. The limit of detection ($S/N=3$) was $0.7\text{ }\mu\text{g/L}$. The proposed method has been applied to the analysis of BPO in flour with satisfactory results.

Keywords: hot electron-induced, cathodic electrochemiluminescence, BPO, trace determination, wheat flour

doi: 10.1360/N032015-00216