

食品包装材料中 7 种光引发剂向水性模拟液中的迁移测定

刘芃岩*, 黄恩洁, 陈艳杰

(河北大学化学与环境科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 为了考察食品包装材料中光引发剂向食品中迁移的情况, 以水性模拟液作为迁移溶剂, 用 65 μm 聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯 (PDMS-DVB) 纤维头进行固相微萃取结合气相色谱-质谱 (SPME/GC-MS) 分析方法同时测定食品包装材料中 7 种光引发剂 (PIs) 的迁移量。方法的检出限为 0.001 2 ~ 0.006 9 $\mu\text{g/L}$, 线性范围为 0.03 ~ 1.0 $\mu\text{g/L}$ ($r^2 > 0.9909$)。在 3 种浓度的添加水平下, 加标回收率为 70.8% ~ 112.0%, 相对标准偏差不大于 14.0%。利用建立的方法对 20 个实际样品进行测定, 发现所有样品中均检出二苯甲酮, 其中 10 个样品中检出 4-甲基二苯甲酮, 3 个样品中检出 1-羟基环己基苯基甲酮, 1 个样品中检出安息香二甲醚。该方法的灵敏度高, 样品前处理过程简单, 无需使用有机溶剂, 为食品接触材料表面印刷油墨中 PIs 向水性样品中的迁移测定提供了参考。

关键词: 固相微萃取; 气相色谱-质谱; 光引发剂; 食品包装材料; 水性食品模拟液; 迁移

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)12-1235-06

Determination of the migration of seven photoinitiators in food packaging materials into aqueous solvent

LIU Pengyan*, HUANG Enjie, CHEN Yanjie

(College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The quantity of photoinitiators (PIs) migrated into hydrosoluble foods from packaging materials is usually very small. It is hardly detectable by using the current methods. For this reason, the article describes a new effective method for detecting the migration of PIs. In this method, the migration experiment was done in aqueous food simulation. After the PIs in printing inks used in food contact materials were extracted from the solution via solid-phase microextraction (SPME) using 65 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS-DVB)-coated fiber, their migration amounts were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in the selected ion monitoring mode (SIM). The PIs determined by SPME/GC-MS were benzophenone (BP), 1-hydroxycyclohexyl-phenylketone (CPK), ethyl-4-dimethyl-aminobenzoate (EDMAB), 4-methylbenzophenone (4-MBP), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (2,2-DMPA), methyl 2-benzoylbenzoate (OMBB) and 2-ethylhexyl-4-dimethyl-aminobenzoate (EHD-AB). The limits of detection ($S/N = 3$) were between 0.001 2 and 0.006 9 $\mu\text{g/L}$. The linearity ranged from 0.03 to 1.0 $\mu\text{g/L}$ ($r^2 > 0.9909$). The recoveries were in the range from 70.8% to 112.0% ($n = 3$) with the relative standard deviations no more than 14.0%. Twenty samples were tested by using this developed method. The analytical results showed that BP was detected in all samples, and the migration amounts of BP were from 0.002 to 0.074 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$; 4-MBP was detected in ten samples, and the migration amounts of 4-MBP were from 0.006 to 0.019 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$; CPK was detected in three samples, and its amounts were 0.005, 0.005, 0.007 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$; 2,2-DMPA was detected as 0.009 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ in one sample. The determination of real samples showed this method is feasible. The method is sensitive, simple and free from organic solvents. It could make reference to migrating determination of PIs in printing inks on food packaging surface.

Key words: solid-phase microextraction (SPME); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS);

* 通讯联系人: 刘芃岩, 博士, 教授, 主要研究方向为食品及环境污染物分析。E-mail: pylu01@yahoo.com.cn.

基金项目: 河北省教育厅重点项目 (ZH200805) 和保定市科技局项目 (08J03)。

收稿日期: 2012-09-03

photoinitiators; food-packaging material; aqueous food simulant; migration

光引发剂(photoinitiator, PIs) 是一类能在紫外光区或可见光区吸收一定波长的能量、产生自由基或阳离子等、从而引发单体聚合交联固化的化合物。此类物质由于无溶剂残留、毒性低和无环境污染等特点, 已逐渐被应用于食品包装材料表面^[1]。然而最近研究发现, 在油墨中残留的光引发剂在受热或光照后可穿透食品包装材料, 从而污染所接触的食品, 对人体健康造成潜在危害^[2]。2005 年的雀巢婴儿牛奶事件中, 由于检测到纸质包装材料印刷油墨中的光引发剂 2-异丙基硫杂蒽酮(ITX) 和对二甲氨基苯甲酸异辛酯(EHDAB) 渗入到牛奶中, 导致该公司从法国、葡萄牙、西班牙及意大利召回大批产品^[3]。2009 年 4 月欧盟食品和饲料快速预警系统(RASFF) 通报了在早餐燕麦片中首次检测出光引发剂 4-甲基二苯甲酮, 为此欧盟食物链和动物健康常务委员会(SCFCAH) 于 2009 年 5 月规定食品包装印刷油墨材料中 4-甲基二苯甲酮和二苯甲酮的总迁移限值必须低于 0.6 mg/kg^[4]。

自 2005 年光引发剂在牛奶中被检出后, 对其检测即开始受到关注, 由 2007 年前对牛奶^[5-8] 及果汁^[9] 中 ITX 的残留测定逐渐发展为多残留的测定, 测定对象也由牛奶^[10-12]、饮料^[13, 14]、早餐麦片等食品^[15-17] 中的残留测定扩展到食品接触材料中的残留及迁移^[18-20]。对食品包装材料中 PIs 向食品中的迁移测定研究有助于食品中 PIs 残留的源头控制。Sanches-Silva 等^[11, 20] 对 PIs 向奶粉和模拟液中的迁移动力学进行了研究, 通过对 6 种 PIs 扩散和迁移系数的测定, 认为影响迁移的主要因素是 PIs 本身的性质和温度; 国内也开始关注食品接触材料中 PIs 向食品中迁移的问题, 在迁移测定中多采用正己烷、乙酸乙酯^[18, 19] 等脂溶性模拟液, 或研究两种 PIs 的迁移^[21]。由于光引发剂种类的多样化和新品种的不断涌现, 需要同时对多种光引发剂残留的迁移和测定进行研究; 另外, 除酒类饮品外, 一般的饮料都是水溶液, 因此以水作模拟液更具有实际意义; 由于 PIs 在水中的迁移量很低, 一般很难检测到, 因此采用固相微萃取(SPME) 技术, 可大大提高富集效率。Negreira 等^[22] 曾将 SPME 用于牛奶中 PIs 的测定净化, 检出限达到 0.2 μg/L。本文以水作模拟液, 对 7 种 PIs 同时做迁移研究, 实验采用环境友好、富集分离效率高的 SPME 技术提取模拟液中的 PIs, 热解吸后进行气相色谱-质谱(GC/MS) 分析, 操作过程简单, 灵敏度高。

1 实验部分

1.1 仪器、设备与试剂

Agilent 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); 固相微萃取装置、萃取头涂层为 65 μm 聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯(PDMS-DVB) (美国 Supelco 公司); 电子加热磁力搅拌器(美国 Corning 公司); SF-300 塑料薄膜封口机(温州兴业机械设备有限公司); CF-2000D 超纯水器(北京市长风仪器仪表公司)。

标准品: 二苯甲酮(benzophenone, BP, 99.0%) 和 4-二甲氨基苯甲酸乙酯(ethyl-4-dimethylamino-benzoate, EDMAB, 98.0%) (J&K); 1-羟基环己基苯基甲酮(1-hydroxycyclohexyl-phenylketone, CPK, 98.0%)、4-甲基二苯甲酮(4-methylbenzophenone, 4-MBP, 95.0%)、邻苯甲酰苯甲酸甲酯(methyl 2-benzoylbenzoate, OMBB, 98.0%) 和对二甲氨基苯甲酸异辛酯(2-ethylhexyl-4-dimethylaminobenzoate, EHDAB, 98.0%) (TCI); 安息香双甲醚(2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone, 2,2-DMPA, 99.0%) (Acros Organics), 7 种光引发剂均购于 J&K 公司。甲醇为色谱纯(J. T. Baker, 美国), 实验室用水为超纯水。7 种光引发剂的结构式如图 1 所示。

1.2 标准溶液的配制

光引发剂标准储备液的配制: 分别称取 7 种光引发剂标准品各 2.50 mg, 用甲醇溶解并定容至 7 支 25 mL 容量瓶中, 配成 100 mg/L 的标准储备溶液并于 4 °C 冷藏。

光引发剂标准溶液的配制: 从光引发剂标准储备液中分别移取 0.05 mL 于一支 10 mL 容量瓶中并用甲醇定容, 配成质量浓度为 500 μg/L 的混合标准溶液, 再逐级稀释, 配制成质量浓度为 300.0、240.0、150.0、60.0、30.0、15.0、9.0 μg/L 的系列工作溶液, 于 4 °C 冰箱中保存两周。

1.3 实验条件

1.3.1 测定条件

色谱柱: HP-5MS 毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 柱温: 80 °C $\xrightarrow{25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 170 °C (1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 220 °C (1 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 270 °C (5 min); 进样口温度: 260 °C; 载气: 高纯氦气(≥99.999%) 流量: 1 mL/min; 不分流进样。离子源: 电子轰击离子(EI) 源, 能量: 70 eV, 温度: 230

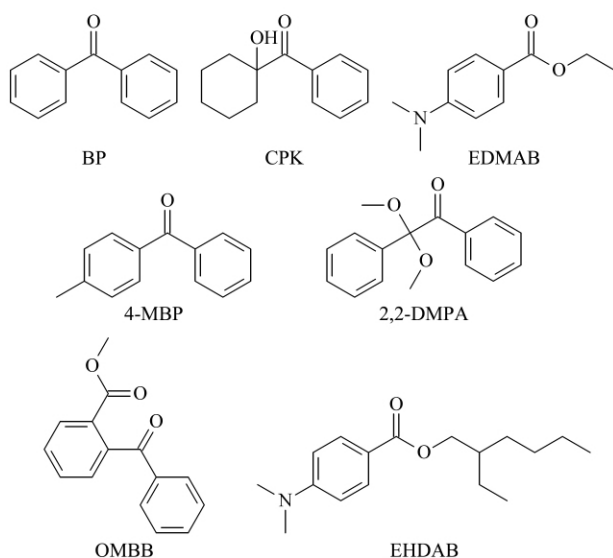


图 1 7 种光引发剂的结构

Fig. 1 Structures of the seven photoinitiators (PIs)

BP: benzophenone; CPK: 1-hydroxycyclohexyl-phenylketone; EDMAB: ethyl 4-dimethylaminobenzoate; 4-MBP: 4-methylbenzophenone; 2, 2-DMPA: 2, 2-dimethoxy-2-phenylacetophenone; OMBB: methyl 2-benzoylbenzoate; EHDAB: 2-ethylhexyl 4-dimethylaminobenzoate.

℃; 四极杆温度: 150 ℃; 辅助通道加热温度: 280 ℃, 选择离子 (SIM) 监测, 所选择的离子见表 1。

表 1 7 种光引发剂的监测离子及定量离子

Table 1 Monitoring ions and quantitative ions of the PIs

Photoinitiator	Monitoring ions (m/z)
BP	182.0, 105.0*, 77.0, 51.1
CPK	105.0, 99.1*, 81.1, 77.1
EDMAB	193.1, 164.1, 148.1*, 120.1, 77.0
4-MBP	196.1, 181.1, 119.0*, 91.1
2,2-DMPA	151.1*, 91.1, 77.1, 51.1
OMBB	163.0*, 240.1, 209.0, 152.0
EHDAB	277.2, 165.1*, 148.1

* Quantitative ion.

1.3.2 固相微萃取操作条件

样品放入 40 mL 顶空瓶中, 在 40 ℃ 水浴、转速为 1 100 r/min 的条件下搅拌萃取 40 min, 萃取头为 65 μm PDMS-DVB。

1.4 样品预处理及测定

将食品包装袋洗净后晾干, 按 1 mL/cm² 计算装入蒸馏水, 热封口。然后将其置于预先调至 60 ℃ 的烘箱内, 恒温 40 min, 提取完成后, 取出样品振荡 1 min, 然后剪开封口将提取液倒入烧杯中自然冷却至室温, 准确量取 30 mL 提取液并加入磁转子密封于 40 mL 顶空瓶中, 在一定转速下水浴萃取, 然后送入气相色谱进样口热解吸 3 min 测定。

2 结果与讨论

2.1 固相微萃取操作条件优化

2.1.1 SPME 萃取头的选择

考察了 3 种不同萃取头的萃取效率, 结果表明对于 EHDAB 这种化合物, 85 μm 聚丙烯酸酯 (PA) 萃取头的萃取效率略微高于其他两种 (100 μm 聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 和 65 μm PDMS-DVB), 而其余化合物均表现出 PDMS-DVB 萃取头的萃取效率最高 (见图 2), 故最终选取 PDMS-DVB 为本实验的萃取头。

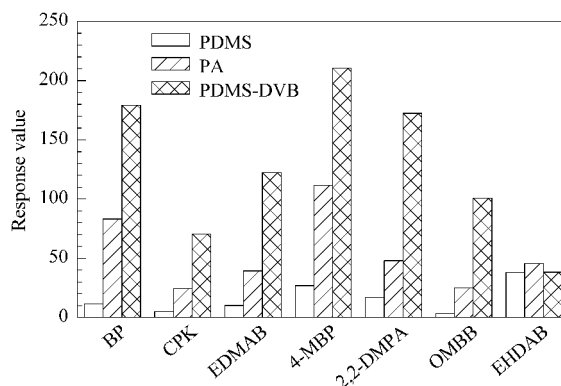


图 2 3 种不同萃取头的萃取效率

Fig. 2 Extraction efficiencies with three different SPME fibers

2.1.2 SPME 温度的选择

在一定萃取时间的条件下, 考察了不同温度下的萃取效率, 结果见图 3, 除 EHDAB 的萃取效率在 60 ℃ 时达到最大值, 其余 6 种均在 40 ℃ 时萃取效率最高。综合考虑, 选取 40 ℃ 作为本实验的萃取温度。

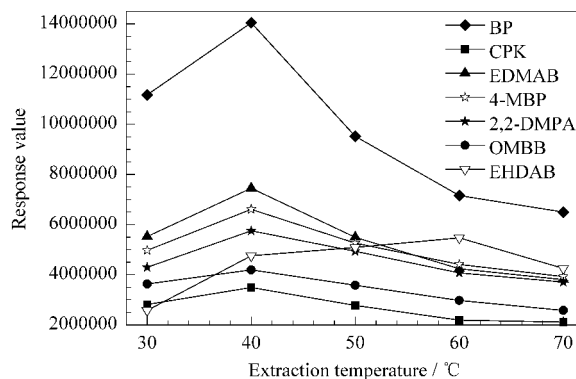


图 3 萃取温度对萃取效率的影响

Fig. 3 Influences of extraction temperature on extraction efficiencies
SPME fiber: PDMS-DVB.

2.1.3 SPME 时间的选择

在 40 ℃ 的水浴条件下, 进行不同萃取时间的实

验 如图 4 所示 ,所有物质的萃取效率在 40 min 时达到最大值 40 min 后 ,所有目标物质的萃取效率逐渐趋于平稳。故选择萃取时间为 40 min。

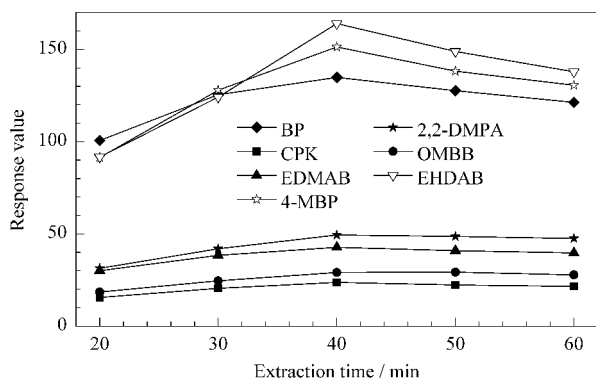


图 4 萃取时间对萃取效率的影响
Fig. 4 Influences of extraction time on extraction efficiencies
SPME fiber: PDMS-DVB.

2.1.4 SPME 热解吸时间的确定

考察了不同解吸时间对测定效率的影响 ,结果表明随着解吸时间的增长响应值增大 ,但在 3 min 后达到平衡 ,如图 5 所示。因此确定最佳解吸时间为 3 min。

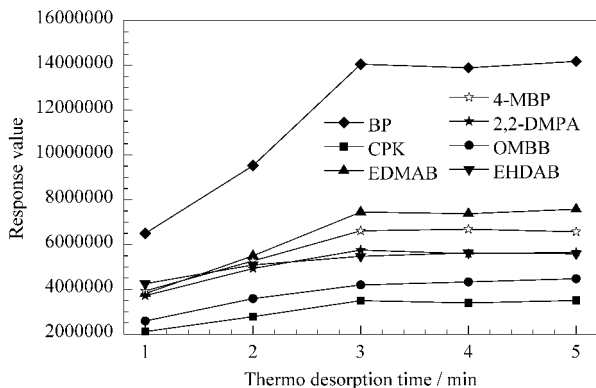


图 5 热解吸时间对各物质响应值的影响
Fig. 5 Influences of thermo desorption time on the abundances of the seven PIs
SPME fiber: PDMS-DVB.

2.1.5 搅拌速度对萃取效率的影响

考察了搅拌速度分别为 500、700、900 和 1 100 r/min 时对萃取效率的影响 ,结果表明搅拌速度为 1 100 r/min 时 ,所有目标化合物的萃取效率均达到最高。

2.1.6 离子强度对萃取效率的影响

离子强度有时会影响吸附效率 ,通过加入 NaCl 实验 ,发现 NaCl 的加入会对所有目标化合物的吸附过程产生抑制作用 ,因此 ,实验中不加 NaCl。

2.2 实际样品的提取条件优化

选取一个含有 BP 和 4-MBP 的食品包装材料进行了条件实验。

2.2.1 温度对提取效果的影响

通过实际样品在 20、40、60、80 和 100 °C 下的浸泡效果实验 ,发现 60 °C 时溶出量最大。

2.2.2 时间对提取效果的影响

考察了在 60 °C 下分别浸泡 20、40、60 和 80 min 时的提取效果 ,发现 40 min 后响应值不再增加 ,故选择浸泡 40 min。

2.3 方法评价

2.3.1 线性关系及检出限

从 1.2 节配制好的 7 种光引发剂系列工作溶液中分别取 0.1 mL ,加入到装有 30 mL 蒸馏水的顶空瓶中 ,配成质量浓度为 1.0、0.8、0.5、0.2、0.1 和 0.03 μg/L 的标准溶液 ,每个质量浓度平行测定 3 次 ,将峰面积的平均值与所对应的标准溶液质量浓度做标准曲线 ,其线性范围为 0.03 ~ 1.0 μg/L; 检出限按 3 倍信噪比(S/N=3) 确定 ,结果列于表 2。7 种光引发剂的选择离子流图见图 6。

表 2 7 种光引发剂标准溶液的线性方程、相关系数(r²) 及检出限(LOD) (n=3)

Table 2 Linear equations , correlation coefficients (r²) and limits of detection (LOD) of the seven PIs (n=3)

Photoinitiator	Linear equation	r ²	LOD/ (μg/L)
BP	y = 3.83 × 10 ⁶ x + 44292	0.9940	0.0012
CPK	y = 1.28 × 10 ⁶ x - 20782	0.9951	0.0032
EDMAB	y = 2.00 × 10 ⁶ x - 65819	0.9909	0.0037
4-MBP	y = 1.70 × 10 ⁶ x - 79900	0.9911	0.0040
2,2-DMPA	y = 2.68 × 10 ⁶ x - 77691	0.9934	0.0020
OMBB	y = 1.63 × 10 ⁶ x - 40307	0.9930	0.0040
EHDAB	y = 1.90 × 10 ⁵ x - 3201.9	0.9926	0.0069

y: peak area; x: mass concentration , μg/L. Linear range: 0.03 - 1.0 μg/L. LOD: S/N=3.

2.3.2 加标回收率及方法精密度

选取 1 种含有目标化合物的食品包装袋 ,按照 1.4 节样品处理方法和检测方法测定该包装样品的加标回收率。取 0.10、0.50、0.80 μg/L 3 个水平的 7 种光引发剂混合标准品做加标回收试验 ,每个水平平行做 3 份 ,测定加标回收率和方法精密度 ,结果见表 3。

2.4 实际样品的测定

随机抽取 20 种不同品牌的食品包装袋 ,按 1.4 节方法处理 ,再利用 GC-MS 方法进行测定 ,结果列于表 4。

表 3 7 种光引发剂在 3 个加标水平下的回收率和相对标准偏差 ($n=3$)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of the seven PIs spiked at three levels ($n=3$)

%

Photoinitiator	0.10 $\mu\text{g/L}$		0.50 $\mu\text{g/L}$		0.80 $\mu\text{g/L}$	
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
BP	95.6	9.1	76.2	8.1	82.3	10.2
CPK	92.2	13.6	77.7	12.7	93.7	7.2
EDMAB	98.0	14.0	78.3	13.7	79.9	12.3
4-MBP	81.3	4.8	75.5	9.6	75.1	11.5
2,2-DMPA	112.0	14.0	82.6	12.3	96.1	6.2
OMBB	89.2	7.9	106.1	5.7	110.7	2.4
EHDAB	82.6	12.5	70.8	6.4	76.4	9.7

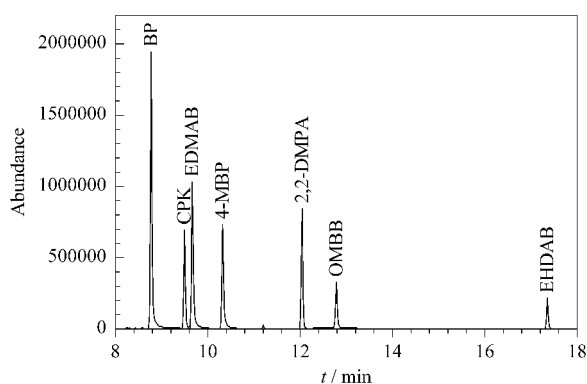


图 6 7 种光引发剂的选择离子流图 ($0.5 \mu\text{g/L}$)

Fig. 6 Selected ion chromatogram of the PIs ($0.5 \mu\text{g/L}$)

表 4 20 种食品包装材料中光引发剂的迁移量 ($n=3$)

Table 4 Migration amounts of PIs in 20 brands of food packaging materials ($n=3$)

Sample	BP	CPK	4-MBP	2,2-DMPA
1 [#]	0.059	ND	0.017	0.009
2 [#]	0.074	ND	0.015	ND
3 [#]	0.030	ND	0.013	ND
4 [#]	0.012	ND	ND	ND
5 [#]	0.024	ND	0.008	ND
6 [#]	0.013	ND	ND	ND
7 [#]	0.002	ND	ND	ND
8 [#]	0.014	ND	ND	ND
9 [#]	0.003	ND	ND	ND
10 [#]	0.007	0.007	ND	ND
11 [#]	0.015	0.005	0.009	ND
12 [#]	0.009	ND	0.019	ND
13 [#]	0.019	0.005	0.017	ND
14 [#]	0.003	ND	0.006	ND
15 [#]	0.006	ND	0.012	ND
16 [#]	0.006	ND	ND	ND
17 [#]	0.006	ND	ND	ND
18 [#]	0.007	ND	ND	ND
19 [#]	0.005	ND	ND	ND
20 [#]	0.005	ND	0.014	ND

ND: not detected. EDMAB, OMBB and EHDAB were not detected in all the 20 samples.

从表 4 可以看出 20 个样品中均检出了 BP, 其残留量为 $0.002 \sim 0.074 \mu\text{g}/\text{dm}^2$; 4-MBP 则在 10 例样品中检出, 其残留量为 $0.006 \sim 0.019 \mu\text{g}/\text{dm}^2$; 说

明 BP 的使用率最高, 也较容易迁移; CPK 和 2,2-DMP 分别在 3 例样品和 1 例样品中检出, 其余光引发剂均未检出。从检出率和迁移量中可了解目前光引发剂的使用情况。

3 结论

本文建立了食品接触材料中 7 种光引发剂残留量的 SPME-GC/MS 测定方法, 并用建立的方法测定了 20 个实际样品。该方法操作简单、省时, 无需使用溶剂, 是一种绿色环保的检测方法, 且该方法检出限比其他方法低 2~3 个数量级 (达到几个 ng/L), 可提高痕量有机化合物的检出率, 为实际样品的迁移研究提供灵敏的检测手段。在今后的研究中, 一方面应不断扩充同时测定的种类, 以便满足实际需求; 另一方面应对迁移机制进行深入探讨, 以防控此类物质向食品中的迁移。

参考文献:

- [1] Bose S, Bogner R H. Pharm Dev Technol, 2007, 12(2): 115
- [2] Anderson W A C, Castle L. Food Addit Contam, 2003, 20(6): 607
- [3] European Commission. Annual Report, the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2005: 22. [2012-09-03]. http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
- [4] European Commission Health and Consumers Directorate-General, Standing Committee on the Food Chain and Animal Health Section Toxicological Safety. Conclusions of the Meeting of 06 March 2009. [2012-09-03]. <http://www.food.gov.uk/science/research/surveillance/fsisbranch2006/fsis1806>
- [5] Deng X J, Guo D H, Li B, et al. Chinese Journal of Chromatography (邓晓军, 郭德华, 李波, 等. 色谱), 2007, 25(1): 39
- [6] Bagnati R, Bianchi G, Marangon E, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(13): 1998
- [7] Gil-Vergara A, Blasco C, Pico Y. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(2): 605
- [8] Morlock G, Schwack W. Anal Bioanal Chem, 2006, 385(3): 586
- [9] Sagratini G, Manes J, Giardina D, et al. J Agric Food Chem, 2006, 54(20): 7947
- [10] Zhu W X, Yang J Z, Liu Y F, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (祝伟霞, 杨冀州, 刘亚风, 等. 分析实验室),

- 2010 ,29(12) : 31
- [11] Sanches-Silva A , Pastorelli S , Cruz J M , et al. *J Agric Food Chem* ,2008 ,56(8) : 2722
- [12] Shen D X , Lian H Z , Ding T , et al. *Anal Bioanal Chem* ,2009 ,395(7) : 2359
- [13] Sun C , Chan S H , Lu D , et al. *J Chromatogr A* ,2007 ,1143(1/2) : 162
- [14] Sagratini G , Caprioli G , Cristalli G. *J Chromatogr A* , 2008 ,1194(2) : 213
- [15] Van Hoeck E , De Schaetzen T , Pacquet C , et al. *Anal Chim Acta* ,2010 ,663(1) : 55
- [16] Benetti C , Angeletti R , Binato G , et al. *Anal Chim Acta* ,2008 ,617(1/2) : 132
- [17] Gallart-Ayala H , Núñez O , Moyano E , et al. *J Chromatogr A* , 2011 ,1218(3) : 459
- [18] Han W , Yu Y J , Li N T , et al. *Chinese Journal of Chromatography* (韩伟 ,于艳军 ,李宁涛 ,等. 色谱) ,2011 ,29(5) : 417
- [19] Han W , Yu Y J , Li N T , et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (韩伟 ,于艳军 ,李宁涛 ,等. 分析化学) ,2011 ,39(9) : 1387
- [20] Sanches-Silva A , Andre C , Castanheira I , et al. *J Agric Food Chem* ,2009 ,57(20) : 9516
- [21] Wang H S , Chen M , Tang L J , et al. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (王红松 ,陈明 ,汤礼军 ,等. 中国卫生检验杂志) ,2011 ,21(2) : 272
- [22] Negreira N , Rodríguez I , Rubí E , et al. *Talanta* ,2010 ,82(1) : 296