

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 11 种对苯二胺类
抗氧化剂及其氧化产物刘光臣^{1,2}, 王清格², 张磊², 李敬光^{1,2}

(1. 南京医科大学 公共卫生学院, 江苏 南京 211166; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

摘要: **目的** 建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)同时测定牛奶中 11 种对苯二胺类抗氧化剂(PPDs)及其氧化产物(PPD-Qs)的方法。**方法** 称取 2.00 g 牛奶样品, 冷冻干燥后加入 10 mL 乙腈, 振荡提取, 低温离心。上清液使用 Oasis HLB 固相萃取柱除杂净化, 合并上样液与净化液经氮气吹干复溶后, 进行进样分析。采用含 0.1% 甲酸的水溶液和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, WATERS ACQUITY BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)作为色谱分析柱, 在正离子电喷雾(ESI⁺)多反应监测模式下检测, 内标法定量。**结果** 在 0.1~50 μg/L 范围内, 11 种 PPD 及其氧化产物的相关系数(R^2)均>0.990, 方法检出限为 0.004~0.152 μg/kg, 定量限为 0.013~0.507 μg/kg, 3 种不同加标浓度的回收率为 84.4%~121.9%, 日间和日内精密度良好(RSD<14%)。应用该方法检测不同国家和地区的 28 份牛奶样品, 其中 6PPD 的检出率最高, 阳性样品浓度为 0.05~2.27 μg/kg; DTPD 的检出率为 39%, 阳性样品浓度为 0.07~0.79 μg/kg; 仅有两例样品中 6PPD-Q 的浓度高于定量限。**结论** 该方法具有良好的灵敏度、准确度和精密度, 适用于牛奶样品中对苯二胺类抗氧化剂及其氧化产物的检测。

关键词: 对苯二胺类抗氧化剂; 固相萃取法; 超高效液相色谱-串联质谱法; 牛奶

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2025)08-0715-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.08.004

**Determination of 11 p-phenylenediamine antioxidants and their oxidation products in milk by
ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

LIU Guangchen^{1,2}, WANG Qingge², ZHANG Lei², LI Jingguang^{1,2}

(1. School of Public Health, Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing 211166, China;

2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish the first method for the simultaneous determination of 11 p-phenylenediamine antioxidants (PPDs) and their oxidation products in milk by solid-phase extraction (SPE) coupled with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** A 2.00 g milk sample was weighed, freeze-dried, and extracted with 10 mL of acetonitrile. The mixture was shaken, then centrifuged at low temperature. The supernatant was purified using an Oasis HLB solid-phase extraction column. The combined sample and purified liquid were evaporated under nitrogen and resuspended for injection and analysis. Chromatographic separation was performed using a gradient elution with a mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile. The analysis was carried out on a WATERS ACQUITY BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm). Detection was conducted in positive ion electrospray ionization (ESI⁺) multiple reaction monitoring (MRM) mode, and quantification was achieved using the internal standard method. **Results** The correlation coefficients (R^2) for all 11 PPDs and their oxidation products were greater than 0.990 within the concentration range of 0.1-50 μg/L. The method detection limits ranged from 0.004 to 0.152 μg/kg, and the quantification limits ranged from 0.013 to 0.507 μg/kg. Recovery rates for three different spiked concentrations ranged from 84.4% to 121.9%, with good intra-day and inter-day precision (RSD<14%). When applied to 28 milk samples from different countries and regions, the detection rate for 6PPD was the highest, with positive concentrations ranging from 0.05 to 2.27 μg/kg. The detection rate for DTPD was 39%, with positive concentrations

收稿日期: 2025-07-07

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFF1104802)

作者简介: 刘光臣 男 在读研究生 研究方向为食品安全 E-mail: 13754908551@163.com

通信作者: 李敬光 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail: lijg@cfsa.net.cn

ranging from 0.07 to 0.79 $\mu\text{g/kg}$, and only two samples had 6PPD-Q concentrations above the limit of quantification.

Conclusion This method demonstrates excellent sensitivity, accuracy, and precision, making it suitable for detecting p-phenylenediamine-based antioxidants and their oxidation products in milk samples.

Key words: p-Phenylenediamine antioxidants; solid phase extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; milk

N, N'-取代的对苯二胺(p-phenylenediamine, PPD)是一类价格低廉的抗氧化剂,广泛应用于轮胎、手套与电缆等橡胶相关的工业和消费产品中^[1]。2020年N-(1,3-二甲基丁基)-N'-苯基-对苯二胺[N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine, 6PPD]在北美的年产量已达到23 000~45 000 t,并被列为高产量化合物^[2]。环境中的6PPD及其氧化产物主要来自轮胎橡胶磨损颗粒物(Tire wear particles, TWP),并通过各种机制迁移和分布到不同的环境介质中,如空气、水、土壤等。此外,蔬菜、鱼肉与蜂蜜等食品中也已经发现这类物质的污染^[3-6]。N-(1,3-二甲基丁基)-N'-苯基对苯二胺醌(6PPD-quinone, 6PPD-Q)是6PPD在较为温和条件下与臭氧发生反应产生的醌类化合物^[7]。2021年,TIAN等^[8]在《Science》上阐明城市道路径流中存在的6PPD-Q是导致太平洋银鲑洄游繁殖期间急性死亡的关键因素,揭示了“城市径流死亡综合征”现象的主要原因。研究表明,长期暴露于PPDs及其氧化产物会对人体造成神经系统、呼吸系统与生殖系统上的潜在毒性影响^[9-11]。皮肤接触、空气中颗粒的吸入(如TWP)以及被污染食物的摄入都可能是PPD及其氧化产物潜在的人体暴露途径。已有研究表明奶牛场中使用的橡胶管道中的PPDs会发生不同程度的环境迁移,成为牛奶的潜在污染源^[12]。但由于缺乏有针对性的分析方法,针对牛奶中PPDs污染情况的报道尚少^[5]。因此亟需开发一种高灵敏度、可准确测定牛奶中PPDs及其氧化产物的检测方法。

目前,道路尘土、沉积物及空气颗粒物等环境样品中PPDs的提取方法为固相萃取法,常用的提取溶剂为乙腈、甲醇及二氯甲烷^[4,13-14]。此外,针对部分食品类基质还使用了盐析超声萃取、QuEChERS法等^[5,15]。但以上方法去除复杂基质干扰的能力较差,且定量限较高,不适用于绝大部分食品样本的检测。牛奶中富含蛋白质($\geq 3.2\text{ g}/100\text{ mL}$)、脂质等营养成分,固相萃取法(Solid-phase extraction, SPE)操作简单、试剂用量少,不仅能有效分离待测化合物与杂质,还可去除高蛋白、脂肪等干扰成分,净化效果显著,因此在农药检测等领域应用广泛。其中HLB固相萃取柱不仅广泛应用于牛奶中高氯酸盐、双酚、磺胺类兽药等污染物的检测,还用于城市径流、

自来水等环境样本中PPDs的检测^[16-18]。基于此,本研究拟建立一种牛奶中11种PPDs及其氧化产物的高效检测方法,通过对提取溶剂、洗脱溶剂等参数进行优化,获得最佳的前处理方法,并将其应用于市售牛奶样品的PPDs及氧化产物检测。本研究为牛奶中PPDs及其氧化产物的精准定量提供准确可靠的检测方法,同时也为其他膳食样本中PPDs及其氧化产物的检测提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、试剂与材料

超高效液相色谱-三重四级杆质谱仪(Xevo TQ Absolute, Waters公司,美国),PL303电子天平(精度为0.001 g,梅特勒中国有限公司)、Alpha 2-4冷冻干燥机(德国Christ公司)、HNV-50A振荡仪(天津恒奥有限公司)、3K15离心机(德国Sigma公司)

11种对苯二胺类抗氧化剂标准品溶液(100 mg/L)购自天津阿尔塔科技有限公司,包括N-苯基-N'-环己基对苯二胺(1,4-Benzenediamine, N1-cyclohexyl-N4-phenyl-, CPPD)、N-异丙基-N-苯基对苯二胺(N-isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine, IPPD)、6PPD、N,N'-二甲苯基对苯二胺[N,N'-Bis(Methylphenyl)-1,4-Benzenediamine, DTPD]、1,4-二甲基戊基-N'-苯基对苯-1,4-二胺[N-(1,4-dimethylpentyl)-N'-phenylbenzene-1,4-diamine, 7PPD]、N,N'-二苯基-对苯二胺(1,4-Dianilinobenzene, DPPD)、6PPD-Q、2-(异丙基氨基)-5-(苯氨基)环己-2,5-二烯-1,4-二酮[2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2-(cyclohexylamino)-5-(phenylamino), IPPD-Q]、2-(环己基氨基)-5-(苯基氨基)环己-2,5-二烯-1,4-二酮[2-(Cyclohexylamino)-5-(phenylamino)cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, CPPD-Q]、2,5-双(苯基氨基)环己-2,5-二烯-1,4-二酮[2,5-Bis(phenylamino)-1,4-benzoquinone, DPPD-Q]、2,5-双(邻甲苯氨基)环己-2,5-二烯-1,4-二酮(2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,5-bis[(2-methylphenyl)amino]-, DTPD-Q); $^{13}\text{C}_6$ -6PPD-Q (100 mg/L) 购自 Cambridge Isotope Laboratories 公司; 6PPD-D₅ (100 mg/L) 购自天津阿尔塔科技有限公司。二氯甲烷、甲醇、乙腈和甲酸均为色谱级,购自美国Fisher Scientific公司。实验所需超纯水通过美国Millipore公司的纯水设备制得。

固相萃取柱 Oasis®HLB 柱规格均为 150 mg, 6 mL,购自美国 Waters 公司。

从国内电商平台及当地市场收集了 28 份市售盒装牛奶样本:11 种国产牛奶,以及来自德国(2 种)、新西兰(2 种)、丹麦、爱尔兰、波兰、荷兰、乌拉圭、斯洛文尼亚、英国、比利时、澳大利亚、俄罗斯、法国、西班牙和韩国多个国家的进口牛奶,购买后置于阴凉处常温保存。

1.2 研究方法

1.2.1 标准溶液配制

分别准确吸取 11 种 PPDs 标准溶液(浓度均为 100 mg/L)各 100 μL,合并至 10 mL 容量瓶中,以乙腈定容,配制标准品混合中间母液(各组分浓度为 1 000 μg/L)。另取 2 种同位素内标溶液(浓度均为 100 mg/L)各 100 μL,合并后同样以乙腈定容至 10 mL,配制内标混合中间母液(浓度均为 1 000 μg/L)。上述溶液于-20 ℃条件下保存。使用标准品中间母液按比例稀释,制备 10 μg/L 和 100 μg/L 的标准品工作稀释液。随后,分别取 10 μL 和 50 μL,与 10 μL 内标混合母液(1 000 μg/L)混合,并以乙腈定容至 1 mL,依次配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10 和 50 μg/L 的标准工作溶液。其中,10 μg/L 稀释液用于配制 0.1 和 0.5 μg/L 标准工作溶液,100 μg/L 稀释液用于配制 1 和 5 μg/L 标准工作溶液,1 000 μg/L 混合中间母液用于配制 10 和 50 μg/L 标准工作溶液。所有标准工作溶液中同位素内标的最终浓度均为 10 μg/L。

1.2.2 样品前处理

准确称量 2.00 g 牛奶于 50 mL 离心管中,在-80 ℃冰箱中预冻 12 h 后置于真空冷冻干燥仪中冷冻干燥 48 h,加入 20 ng 内标溶液与 10 mL 乙腈,以 2 100 r/min 振荡 15 min,以 8 000×g 离心 15 min。在 HLB 固相萃取柱中先加入 6 mL 甲醇活化,再加入 6 mL 超纯水平衡小柱。将样品以 2 mL/min 的流量加载至柱子中,并收集上样液。接着,使用 2 mL 二氯甲烷溶液以 2 mL/min 的流量洗脱,收集洗脱液。最终,将上样液和洗脱液合并,转移至 15 mL 离心管中,然后在 35 ℃恒温水浴下氮吹至接近干燥,残渣溶解于 1 mL 乙腈中,过 0.22 μm 有机滤膜后进行 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.3 仪器条件

色谱分析条件:Waters ACQUITY UPLC BEH C18 液相色谱柱(2.1 mm×100 mm,粒径 1.7 μm),柱温 40 ℃,流动相 A 和 B 分别为 0.1% 甲酸水和乙腈,梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min。梯度洗脱程序:0~1 min, B 为 5%;1~6 min,B 从 5% 增加至 100%;6~7 min,保

持 100%B;7~8 min, B 相降至 5%;8~10 min,维持 5%B 重新平衡色谱柱。进样体积为 2 μL。

质谱检测条件:电喷雾离子源,正离子电离模式(ESI⁺),毛细管电压:2.50 kV,锥气孔流速为 150 L/h;脱溶剂气温度为 500 ℃,脱溶剂气流速为 800 L/h,离子源温度为 150 ℃。采集数据模式:多反应监测(Multiple reaction model,MRM)模式。11 种 PPDs 及其氧化产物的保留时间及质谱参数列于表 1。

表 1 PPDs 的保留时间、定性与定量离子、碰撞电压
Table 1 Retention times, qualitative and quantitative ions, and collision voltages of PPDs

分析物	保留时间/ min	母离子/ (m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV
IPPD	3.83	227.1	107.0	35
			184.2*	20
IPPD-Q	4.95	257.1	187.5	30
			215.1*	18
DPPD	5.86	261.1	168.2	35
			184.2*	33
CPPD	4.30	267.1	185.0*	15
			223.1	20
6PPD	4.52	269.2	184.1*	20
			212.1	20
6PPD-D ₅	4.50	274.2	189.0*	20
			217.0	20
7PPD	4.77	283.2	184.1*	22
			212.1	24
DTPD	6.34	287.9	106.0	20
			180.8*	33
DPPD-Q	5.36	291.1	263.1*	21
			144.0	28
CPPD-Q	5.65	297.1	187.1*	34
			215.1	15
6PPD-Q	5.80	299.2	187.0	28
			241.1*	30
¹³ C ₆ -6PPD-Q	5.79	305.2	247.1*	30
			262.0	21
DTPD-Q	5.73	319.1	212.1	18
			301.8*	25

注: *为定量离子

1.2.4 提取溶剂的选择

通过考察绝对回收率来选择合适的提取溶剂。2 g 牛奶经冷冻干燥 48 h 后加入 20 μL 浓度为 100 μg/L 的标准品工作稀释液,分别用 10 mL 甲醇/二氯甲烷/乙腈进行提取,每组设置 3 组平行,取尽上清液后通过 HLB 萃取柱进行纯化,2 mL 二氯甲烷洗脱,合并后的过滤液氮吹至近干,1 mL 乙腈复溶后上机,

1.2.5 样品净化方式的选择

通过考察绝对回收率来选择合适的提取溶剂。2 g 牛奶经冷冻干燥 48 h 后加入 20 μL 浓度为 100 μg/L 的标准品工作稀释液,采用上述方法提取,净化方法分为 3 组:QuEChERS 法(取尽上清液加入到 C18/PSA/MgSO₄(10/10/60 mg/mL)的 15 mL

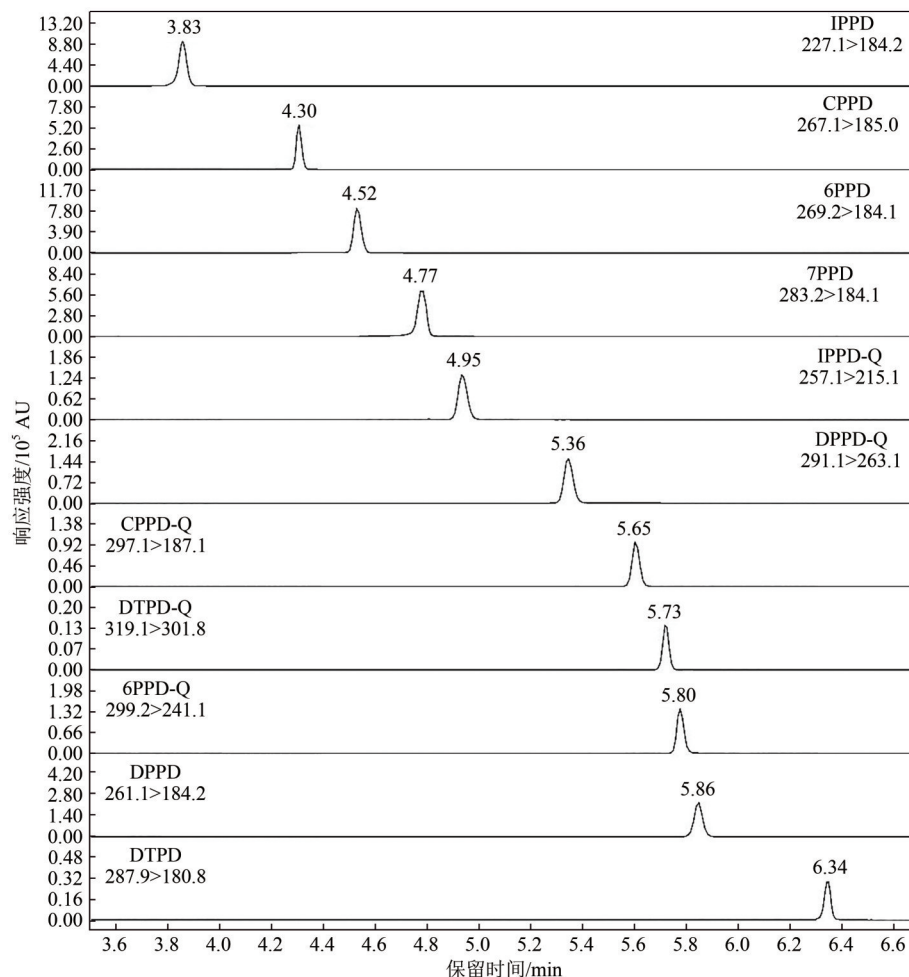


图1 11种PPDs及其氧化产物的MRM色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of 11 PPDs and their oxidation products

聚丙烯离心管中净化)、常规式固相萃取法(取尽上清液氮吹至吹干,初始流动相5%乙腈-水溶液复溶后过柱,5%甲醇-水溶液淋洗,2 mL二氯甲烷洗脱)、直通式固相萃取法(取尽上清液通过活化的HLB柱,2 mL二氯甲烷洗脱),分别将以上3种净化方式的滤过液氮吹至近干,1 mL乙腈复溶上机检测。

1.2.6 洗脱溶剂的选择

取2 g牛奶经冷冻干燥48 h后加入20 μ L浓度为100 μ g/L的标准品工作稀释液,并分别按照1.2.1样品处理方式进行前处理,保持其他条件不变,仅改变洗脱溶剂类型和体积。收集每1 mL洗脱溶剂,上质谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂优化

11种PPDs及其氧化产物的极性范围(LogKow)为2.58~5.94,因此选用适当的提取溶剂至关重要。目前已有的研究常选用乙腈、二氯甲烷与甲醇进行多次提取。基于此,本研究评估以上3种溶剂的提

取效率。3种提取溶剂的绝对回收率如图2所示,结果显示除7PPD外,乙腈组的绝对回收率均高于二氯甲烷组与甲醇组,各目标物质的回收率为73%~107%,而且乙腈相较二氯甲烷可以在提取过程中最大程度地减少亲脂性杂质的干扰,表现出更好的提取效率。因此后续实验均采用乙腈作为提取溶剂。

2.2 样品净化处理的选择

目前PPD的研究多集中于道路尘土、水与沉积物等环境样本中,液-液萃取法与固相萃取法较为成熟。此外,JI等^[5]采用QuEChERS方法测定蜂蜜与鱼肉中PPDs的含量,方法定量限为0.00043 mg/kg,具有较高的灵敏度。本研究基于QuEChERS和固相萃取对净化方法进行筛选和优化,以建立适用于牛奶基质的前处理方法。3种净化方式的绝对回收率如图3所示,结果表明常规式固相萃取法在母体化合物(如CPPD、7PPD)的绝对回收率低于直通式固相萃取法,且直通式净化方法较为简便,PPDs的绝对回收率均在54%以上,符合GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中的回收率要求^[19]。所以后续实验采用直通式固相萃取法对

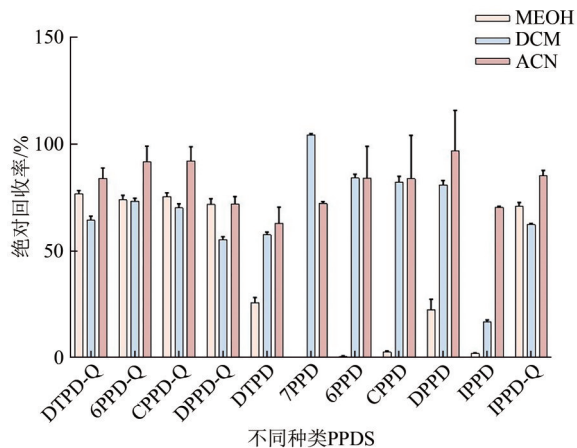


图2 11种PPDs在甲醇、乙腈、二氯甲烷中的平均绝对回收率及标准差($n=3$)

Figure 2 Average absolute recovery rate and standard deviation of 11 PPDs in methanol, acetonitrile, and dichloromethane ($n=3$)

样品进行净化处理。

2.3 洗脱溶剂优化

按照相似相溶原理,洗脱剂的极性会直接影响到 11 种 PPDs 及其氧化产物的洗脱效果。实验选择甲醇、乙腈和二氯甲烷 3 种洗脱溶剂,并对其用量进行考察。每 1 mL 洗脱溶剂所测得 PPDs 含量与洗脱溶剂的体积用量关系如图 4 所示。结果显

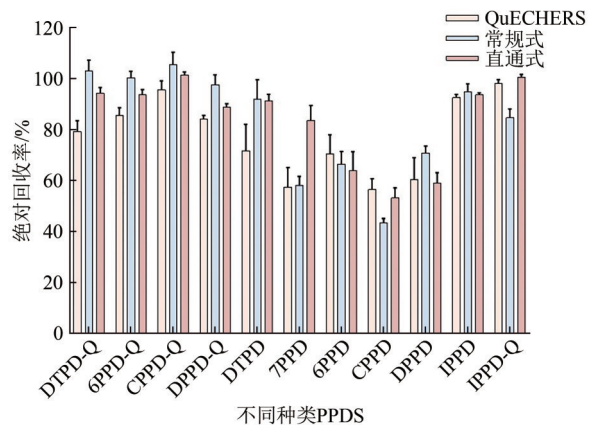
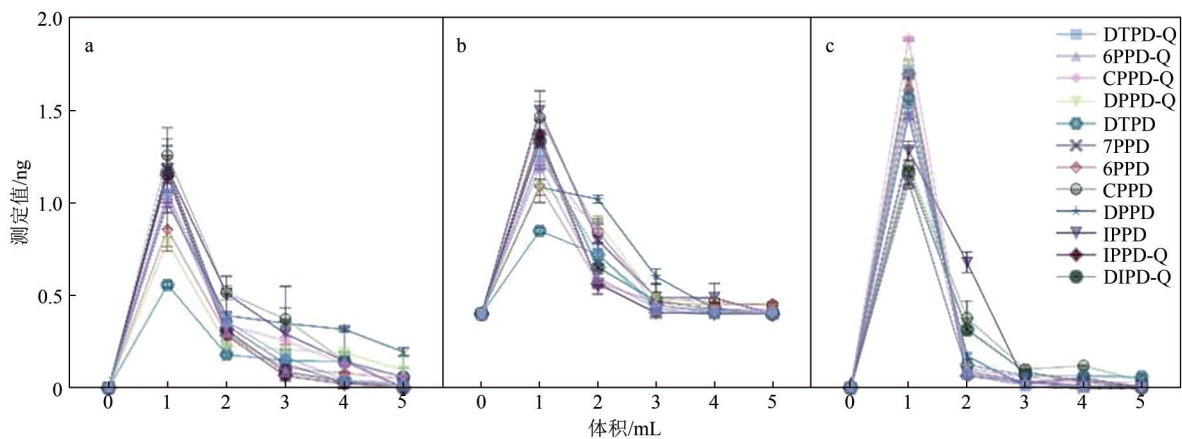


图3 11种PPDs在不同净化处理条件下的平均绝对回收率及标准差($n=3$)

Figure 3 Average absolute recovery rate and standard deviation of 11 PPDs under different purification conditions ($n=3$)

示,当采用二氯甲烷作为洗脱剂时,DPPD、DTPD 等弱极性物质的洗脱率显著增加。此外,二氯甲烷使得 PPDs 洗脱较为完全,其体积用量明显低于乙腈和甲醇。在实际操作中,二氯甲烷洗脱液在氮吹过程中挥发速度较快(沸点 39.6°C),相较于其他溶剂,能够显著提高实验效率。为了防止牛奶中过多的脂溶性杂质影响净化效果,需要严格控制二氯甲烷的用量。综上,选择 2 mL 二氯甲烷作为最佳洗脱剂。



注:a.甲醇洗脱曲线;b.乙腈洗脱曲线;c.二氯甲烷洗脱曲线

图4 11种PPDs在3种洗脱溶剂下的洗脱曲线($n=3$)

Figure 4 Elution curves of 11 PPDs under three elution solvents ($n=3$)

2.4 基质效应、线性范围及定量限

基质增强或抑制效应可能导致假阳性或假阴性结果,采用纯溶剂和空白牛奶基质提取液分别制备 11 种 PPDs 及其氧化产物的标准曲线。在未使用内标校正的情况下,通过比较两种标准曲线的斜率比值,对基质效应的影响进行评估。内标校正后 11 种 PPDs 的基质效应均处于可接受的范围内 ($0.80\sim1.20$)。基于此,本研究选用溶剂标准曲线进行线性范围的考察,并采用同位素内标法对 11 种

PPDs 进行定量分析,以弥补前处理过程中可能产生的损失。为评估线性关系,制备一系列不同浓度的标准溶液 ($0.1\sim50\text{ }\mu\text{g/L}$),并在每种溶液中均添加了 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的同位素标记内标溶液(浓度为 1 mg/L)以进行仪器分析。在优化的条件下,目标化合物在 $0.1\sim50\text{ }\mu\text{g/L}$ 范围内相关系数(R^2)均 >0.990 。此外,在空白牛奶样本中以标准曲线范围内的低浓度水平进行添加,对经前处理的样本进行检测。通过 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)分别考察了方法检出限和

表2 11种PPDs的线性范围、检出限、定量限与基质效应

分析物	线性方程	R^2	方法检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	方法定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	基质效应
DTPD-Q	$y=0.793\ 72x-0.001\ 78$	0.994	0.010	0.032	0.83
6PPD-Q	$y=0.888\ 84x+0.012\ 62$	0.999	0.004	0.013	0.76
CPPD-Q	$y=0.539\ 99x-0.003\ 01$	0.993	0.007	0.023	0.79
DPPD-Q	$y=0.637\ 87x+0.030\ 92$	0.991	0.013	0.043	0.89
DTPD	$y=0.088\ 89x+0.002\ 90$	0.995	0.012	0.039	0.76
7PPD	$y=1.393\ 29x-0.032\ 13$	0.999	0.015	0.051	1.16
6PPD	$y=1.550\ 38x+0.045\ 14$	0.990	0.010	0.032	0.94
CPPD	$y=1.028\ 20x+0.003\ 94$	0.998	0.045	0.151	0.92
DPPD	$y=0.836\ 76x-0.091\ 47$	0.993	0.152	0.507	0.78
IPPD	$y=0.424\ 09x+0.774\ 74$	0.999	0.005	0.016	0.94
IPPD-Q	$y=0.490\ 64x+0.096\ 25$	0.992	0.012	0.040	0.82

方法定量限,详细信息见表2。

2.5 准确度和精密度

为了评估方法的准确性和精密度,采用空白牛奶样本作为加标基质,对11种PPDs及其氧化产物的加标回收率和相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)进行考察。实验中,分别向牛奶样本中添加了不同浓度水平的标准溶液,制备成不同加标水平的样品(定量限水平、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$),并严格按照本研究建立的方法进行处理。在1 d内对样品测定6次,考察日内精密度;连续测定6 d,考察日间精密度。如表3所示,11种PPDs的平均加标回收率为84.4%~121.9%,RSD值为0.9%~13.9%。结果表明,本研究建立的检测方法具有较高的准确度和良好的精密度,适用于牛奶样本中PPDs的定量分析(表3)。

2.6 实际样品的测定

利用本方法对28份市售盒装牛奶样本进行分析。所有样品中6PPD的检出率最高为53%,检出浓度为0.05~2.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$;DTPD的检出率为39%,检出浓度为0.07~0.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$;仅有2例样品中6PPD-Q的浓度高于LOQ。此外仅2例样品中发现IPPD-Q与CPPD,含量范围为0.12~0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余PPDs均未检出。

3 结论

本研究首次建立了固相萃取法与UPLC-MS/MS相结合检测牛奶样品中11种PPDs及其氧化产物的方法,并成功应用于实际牛奶样品中PPDs的定量分析。该方法的检出限低于液液萃取法等已有的前处理方法,具有准确高效和灵敏度高的优势,为后续对苯二胺类抗氧化剂的膳食暴露评估提供了技术支撑^[20]。DTPD、6PPD在牛奶中检出率最高,新西兰进口牛奶的6PPD含量较高。此外,不同产地牛奶中橡胶抗氧化剂衍生物的污染类型存在差异。尽管目前检测到的污染物浓度相对较低,但考虑到牛奶的广泛消费和长期摄入的可能性,未来

表3 11种PPDs在牛奶中的回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 3 Recovery and relative standard deviation of 11 PPDs in milk ($n=6$)				
分析物	加标水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对回收率/%	日内	日间
			精密度/%	精密度/%
DTPD-Q	定量限	114.6	10.7	9.1
	1	111.4	9.1	6.7
	10	116.2	8.5	7.4
6PPD-Q	定量限	108.0	7.4	5.1
	1	100.4	5.0	5.3
	10	106.1	3.4	6.0
CPPD-Q	定量限	111.2	9.3	6.2
	1	107.7	8.1	7.8
	10	113.5	7.0	7.6
DPPD-Q	定量限	113.8	10.3	13.7
	1	111.3	9.8	13.5
	10	117.0	8.7	12.7
DTPD	定量限	106.3	7.3	13.0
	1	104.9	7.6	12.9
	10	86.6	7.9	10.9
7PPD	定量限	108.1	8.1	2.2
	1	84.4	2.2	3.0
	10	79.8	13.9	5.6
6PPD	定量限	112.8	10.6	6.2
	1	90.0	1.6	5.2
	10	81.5	12.1	5.7
CPPD	定量限	105.8	7.3	6.2
	1	91.2	3.3	6.3
	10	86.8	9.3	5.8
DPPD	定量限	113.5	11.8	7.7
	1	101.5	9.9	8.3
	10	117.1	9.2	10.4
IPPD	定量限	105.3	5.1	4.3
	1	88.7	0.9	2.2
	10	121.9	10.2	3.1
IPPD-Q	定量限	111.4	9.0	11.1
	1	111.6	10.0	12.3
	10	112.5	6.9	12.8

的研究应进一步深入探讨这些污染物的来源、迁移机制和潜在健康风险,为牛奶质量安全控制提供更全面的科学依据。

参考文献

[1] CHEN X, HE T, YANG X, et al. Analysis, environmental occurrence, fate and potential toxicity of tire wear compounds 6PPD and 6PPD-quinone[J]. Journal of Hazardous Materials,

- 2023, 452: 131245.
- [2] ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT OECD). N-(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-1,4-phenylenediamine[EB/OL]. <https://hpvchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=5e1a446c-5969-479c-9270-7ced8726952e>.
- [3] CAO G, WANG W, ZHANG J, et al. New evidence of rubber-derived quinones in water, air, and soil [J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(7): 4142-4150.
- [4] KLÖCKNER P, SEIWERT B, WEYRAUCH S, et al. Comprehensive characterization of tire and road wear particles in highway tunnel road dust by use of size and density fractionation [J]. Chemosphere, 2021, 279: 130530.
- [5] JI J, LI C, ZHANG B, et al. Exploration of emerging environmental pollutants 6PPD and 6PPDQ in honey and fish samples [J]. Food Chemistry, 2022, 396: 133640.
- [6] JIANG N, HAO X, WANG Z, et al. p-Phenylenediamine antioxidants in PM2.5: New markers for traffic in positive matrix factorization source apportionment [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 476: 135122.
- [7] HU X, ZHAO H N, TIAN Z, et al. Transformation product formation upon heterogeneous ozonation of the tire rubber antioxidant 6PPD (N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine) [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2022, 9(5): 9.
- [8] TIAN Z, ZHAO H, PETER K T, et al. A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon [J]. Science, 2021, 371(6525): 185-189.
- [9] WU J, CAO G, ZHANG F, et al. A new toxicity mechanism of N-(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine quinone: Formation of DNA adducts in mammalian cells and aqueous organisms [J]. Science of the Total Environment, 2023, 866: 161373.
- [10] DU B, LIANG B, LI Y, et al. First report on the occurrence of N-(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine (6PPD) and 6PPD-Quinone as pervasive pollutants in human urine from South China [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2022, 9(12): 1056-1062.
- [11] FANG J, WANG X, CAO G, et al. 6PPD-quinone exposure induces neuronal mitochondrial dysfunction to exacerbate Lewy neurites formation induced by α -synuclein preformed fibrils seeding [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 465: 133312.
- [12] YUAN X, HU C, WANG Z. The migration and degradation of N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine from rubber hoses in milk lines [J]. International Journal of Dairy Technology, 2023, 76(2): 329-338.
- [13] HIKI K, YAMAMOTO H. Concentration and leachability of N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine (6PPD) and its quinone transformation product (6PPD-Q) in road dust collected in Tokyo, Japan [J]. Environmental Pollution, 2022, 302: 119082.
- [14] HUANG W, SHI Y, HUANG J, et al. Occurrence of Substituted p-Phenylenediamine Antioxidants in Dusts [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2021, 8(5): 381-385.
- [15] LIANG B, GE J, DENG Q, et al. Occurrence of multiple classes of emerging synthetic antioxidants, including p-phenylenediamines, diphenylamines, naphthylamines, macromolecular hindered phenols, and organophosphites, in human milk: implications for infant exposure [J]. Environmental Science, 2024, 11(3): 259-265.
- [16] 赵寅, 卢玉, 刘桂亮, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中22种磺胺类兽药残留 [J]. 分析试验室, 2022, 41(2): 187-191.
- ZHAO Y, LU Y, LIU G L, et al. Simultaneous determination of 22 sulfonamide veterinary drug residues in milk by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. Analytical Laboratory, 2022, 41(2): 187-191.
- [17] 刘春波, 陈旭, 张海燕, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳中高氯酸盐含量及其暴露水平 [J]. 食品科技, 2024, 49(8): 329-334.
- LIU C B, CHEN X, ZHANG H Y, et al. Determination of perchlorate content and exposure level in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(8): 329-334.
- [18] 李星, 王浩, 张文超, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中双酚a、双酚f和双酚s [J]. 中国食品学报, 2022, 22(4): 382-386.
- LI X, WANG H, ZHANG W C, et al. Simultaneous determination of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in milk by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(4): 382-386.
- [19] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- STANDARDIZATION ADMINISTRATION OF CHINA. GB/T 27404—2008 Laboratory quality control specification for food physical and chemical testing [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [20] 卢祝靓子, 邓芬芳, 白志军, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿及灰尘中N-(1,3-二甲基丁基)-N'-苯基-对苯二胺-醌 [J]. 色谱, 2025, 43(9): 1025-1033.
- LU Z J Z, DENG F F, BAI Z J, et al. Determination of N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine quinone in human urine and dust by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chromatography, 2025, 43(9): 1025-1033.