

基于脂质组学的动植物油脂物证鉴别技术

刘平阳¹, 刘占芳^{2*}, 张冠男², 王萍², 李亚军², 周正², 孙振文²,
朱军², 周红², 刘耀^{1,2*}

(1. 中国人民公安大学 侦查学院, 北京 100038; 2. 公安部鉴定中心, 北京 100038)

摘要: 动植物油脂是人们日常生活中的常见食材, 也是凶杀、盗窃和纵火等案件中常常出现的重要物证种类, 对其进行鉴别是判断案件性质和确定侦查方向的重要技术手段。氧化作用、高温灼烧和基质干扰等导致案发现场的动植物油脂物证遭到破坏, 无法提取到有用信息。脂质组学是大规模对动植物油脂进行定性和定量分析, 并有效挖掘潜在生物标志物和提供全脂质谱图信息的新兴技术。将脂质组学应用到动植物油脂物证的鉴别中, 可解决油脂物证微量、组分易变和混合油脂干扰鉴别难等难题。该文按照近年来基于脂质组学的动植物油脂物证鉴别操作流程, 分别从样品前处理、分离分析和数据挖掘3大部分进行综述, 并对国内外基于脂质组学的动植物油脂物证鉴别中的新见解和新要求进行了批判性分析, 同时对其未来发展方向进行了展望。

关键词: 脂质组学; 动植物油脂物证; 样品前处理; 检测方法; 数据挖掘

中图分类号: O656.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2024)12-2021-10

Identification Technology of Vegetable Oils and Animal Fats Evidence Based on Lipidomics

LIU Ping-yang¹, LIU Zhan-fang^{2*}, ZHANG Guan-nan², WANG Ping², LI Ya-jun², ZHOU
Zheng², SUN Zhen-wen², ZHU Jun², ZHOU Hong², LIU Yao^{1,2*}

(1. School of Criminal Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China;

2. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract: Vegetable oils and animal fats are common ingredients in daily life, and are also an important type of biological evidence that often appears in cases of murder, theft, and arson. The identification of these substances plays a vital role in determining the nature of the case and guiding the direction of the investigation. Oxidation, high-temperature burning and microbial degradation have led to the destruction of vegetable oils and animal fats evidence at the crime scene, making it impossible to extract useful information. Lipidomics is an emerging technology that enables large-scale qualitative and quantitative analysis of vegetable oils and animal fats, effectively uncovering potential biomarkers, and providing information on whole lipid mass spectrometry. Applying lipidomics to the identification of vegetable oils and animal fats can solve the problems of low amount of lipid evidence, variable composition and difficulty in identifying mixed oils and fats. This article reviews the identification process of vegetable oils and animal fats evidence based on lipidomics in recent years, including sample pretreatment, separation analysis and data mining. It also critically analyzes the new insights and requirements in the identification of vegetable oils and animal fats evidence based on lipidomics both domestically and internationally. At the same time, it looks forward to the future development direction of lipidomics based vegetable oils and animal fats evidence identification technology.

Key words: lipidomics; vegetable oils and animal fats evidence; sample pretreatment; detection methods; data mining

室温下呈液态的油类物质称为油, 室温下呈固态的油类物质称为脂。在司法领域, 动植物油脂作为物证, 其鉴别技术对于案件侦破至关重要。它们不仅能够帮助明确侦查方向, 还能重建犯罪现场

收稿日期: 2024-05-16; 修回日期: 2024-06-14

基金项目: 中央级基本科研业务费项目(2024JB014)

* 通讯作者: 刘占芳, 博士, 研究员, 研究方向: 理化检验, E-mail: liuzhanfang2001@163.com

刘耀, 研究员, 研究方向: 法庭科学管理、毒物分析, E-mail: liuyao1123@aliyun.com

提供关键线索。然而,动植物油脂物证在司法鉴别中的应用并非易事,其难点在于:(1)油脂出现氧化酸败。案件现场提取到的动植物油脂,受到温度、时间、氧气、水、光照和微生物等因素的影响,会出现氧化酸败,导致油脂中的脂质种类和含量出现变化,不利于生物标志物的提取^[1];(2)检材量少。随着犯罪分子反侦察意识的不断增强,案件现场可提取到的动植物油脂的量越来越少,甚至出现微量或痕量的情况;(3)多种动植物油脂混合。如对肢解后的尸体进行油炸以消灭证据,提取到的物证通常是人油脂和动植物油脂的混合物;助燃剂纵火等案件中提取到的动植物油脂物证,为汽油等矿物油和酒精等有机溶剂与动植物油脂的混合物;(4)基质复杂。检材中的动植物油脂可能附着在建筑装饰材料(泥土、砖块、木板)和日常用品(地毯、服装、纸板)等载体上,样品前处理中在提取目标组分的同时会萃取出一部分干扰物,有时萃取剂还会与基质发生反应,产生副产物,影响后续仪器分析和数据解读。(5)人油脂鉴别难。动植物油脂的研究主要集中在食品安全领域,对于人油脂国内外的相关研究匮乏,而在法庭科学领域,涉及到人油脂的案件较为常见,对人油脂进行有效鉴别和潜在生物标志物的发现一直是司法鉴别中的难点。对犯罪现场的动植物油脂物证进行鉴别,对于明确侦查方向、重建犯罪现场意义重大。

组学研究是相对于单独分析的目标物而言,例如,基因研究,可以是对单独一个基因进行研究,即传统的基因研究,也可以同时对一组或一系列基因进行研究,即基因组学。同样,脂质组学不是对单个脂质分子进行研究,而是对一组或一系列脂质分子进行分析。组学的优势是将与所研究目标相关联的所有个体一起研究,因此不会因整体分析而丢失个体信息,反而会因整体分析得到一些新的、规律性的信息,产生“1+1>2”的效果。

脂质组学是继基因组学、蛋白质组学、转录组学和代谢组学后发展起来的新兴组学研究方法。Han和Gross于2003年正式提出脂质组学的概念^[2]。基因组学、转录组学和蛋白质组学的分析对象是生物体内大分子,代谢组学和脂质组学的分析对象是动植物体内小分子代谢产物,脂质组学是代谢组学的一个分支。微生物降解、高温灼烧和氧化作用等条件会导致案发现场的生物大分子遭到破坏而无法提取到有用信息,该情况下代谢组学和脂质组学可发挥作用。在动植物油脂分析中,脂质组学相对于代谢组学的优势是:(1)动植物油脂的组成以脂质为主。其包括95%的甘油三酯和5%的非甘油三酯成分(磷脂、甾醇、三萜醇、脂肪醇、脂肪酸、脂肪烃、色素和脂溶性维生素等)(图1),换言之,动植物油脂中几乎全部是脂质成分,故对动植物油脂的分析就是分析脂质;(2)在动植物油脂物证分析方面,脂质组学相较于代谢组学更有优势。代谢组学是对生物体中所有代谢物进行研究的学科,而脂质是生物体代谢物的第一大类,它参与了细胞间的信息通信、能量运输和网络调控等关键过程。随着近年来脂质组学的飞速发展,将脂质组学从代谢组学中单独划分出来,将有助于全面解析脂质代谢的生化机制,发现潜在生物标志物和利用脂质组学数据进行高通量分析和分子建模^[3]。

当前,动植物油脂的研究主要集中在油脂保质期^[4]、油脂掺假^[5]和油脂营养^[6]等油脂安全方面;在法庭科学领域,动植物油脂物证的研究主要集中在对动植物油脂的种属进行鉴别^[7]。与其他研究方向相比,将脂质组学应用到动植物油脂物证鉴别中的文献非常匮乏,但这方面的研究对于动植物油脂物证鉴别非常重要。为此,笔者汇总了可检索的国内外基于脂质组学的动植物油脂物证鉴别中的绝大部分文献,对其进行介绍和评述,以期法庭科学鉴定人员和相关研究者提供借鉴和参考。

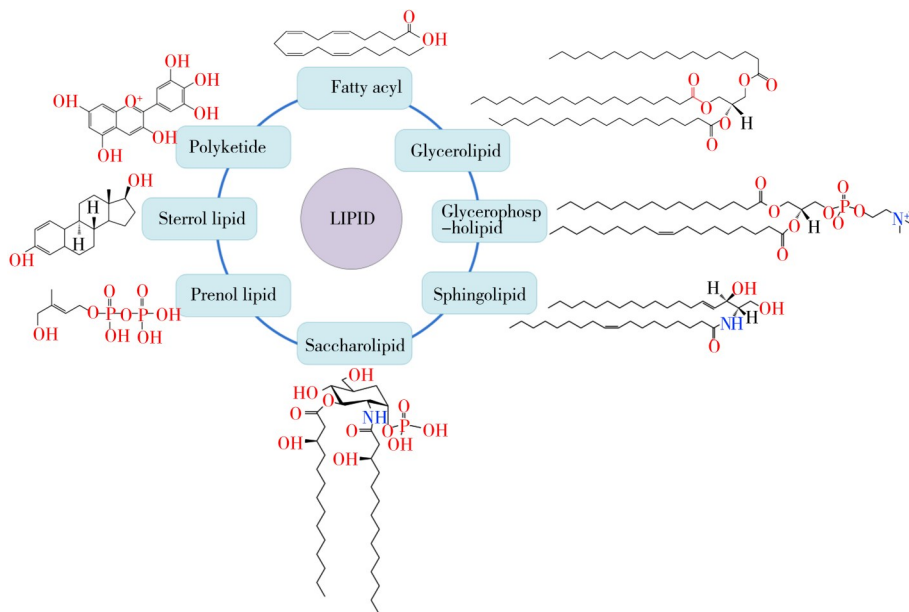
1 动植物油脂物证样品前处理的最新进展

1.1 通用样品前处理方法

法庭科学中的动植物油脂物证通常受到严重污染,所以动植物油脂物证必须进行样品前处理,方可进行检测。样品前处理是整个鉴别环节中最重要步骤之一,其耗时最长、步骤繁复,样品前处理的好坏直接影响最终的鉴定结果。样品前处理可将待分析物从复杂基质中分离出来,再通过富集和纯化来提高待分析物浓度,便于仪器检测。样品前处理方法又分为样品提取方法和样品富集与纯化方法。

1.1.1 样品提取方法

理想的提取方法是在保证检材原始状态的前提下,从复杂基质中有效提取动植物油脂物证^[8-9]。目前,通用的动植物油脂物证提取方法有:溶剂提取法^[10]、索氏提取法^[11]和超临界二氧化碳萃取法(SCE)^[12]。经过前人的不断探索和实践检验,上述3种方法已经形成了标准化的操作流程,并被法庭科学动植物油脂检验实验室广泛使用。

图 1 动植物油脂中 8 种主要脂质及其代表性化学结构式^[8]Fig. 1 Eight categories of lipids with their representative chemical structures in vegetable oils and animal fats^[8]

溶剂提取法是 3 种提取法中应用最广泛和最早提出的方法。该方法是应用氯仿、正己烷、乙腈、乙醇、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚或甲醇将动植物油脂物证从各种检材上萃取出来^[13-15], 具有操作简单和无需特殊设备等优势。但该方法的选择性欠佳, 会破坏检材的原始状态, 检材上的其他干扰组分也会被萃取出来, 且溶剂本身的杂质会干扰动植物油脂的后期检测, 同时有机溶剂大多具有毒性, 对人体具有危害^[15-16]。有研究表明, 检材的含水量对动植物油脂的提取有较大影响^[15]。与含水量低的检材(干粉末)相比, 含水量高的检材(如湿泥土、湿苔藓或湿微藻)会抑制动植物油脂与非极性有机溶剂(如正己烷)之间的接触, 导致动植物油脂萃取率降低^[15,17-18]。可通过使用乙醇或乙酸乙酯等中等极性有机溶剂将水的影响降至最低^[19]。从检材中提取动植物油脂是第一步, 而从动植物油脂中选择性提取目标脂质是后续检测的关键一环。选择合适的溶剂提取方法对于有效提取主要和次要脂质不可或缺。不同溶剂提取法选择的原则可总结如下: (1) 依据检材的来源, 如附着在建筑材料、装饰材料和日常用品等载体上的动植物油脂物证; (2) 依据检材的物理状态, 如固体脂肪组织、液体或斑痕; (3) 依据检材中水分含量和油脂含量; (4) 依据后续仪器检测要求而定^[20]。从人和动物脂肪等固体检材中提取油脂优选 Folch 法(氯仿-甲醇-水, 2 : 1 : 0.75, 体积比)^[13], 而含水量较大的检材更适合于 Bligh 和 Dyer 方法(氯仿-甲醇-水, 1 : 1 : 0.9, 体积比)^[21]。

索氏提取法是一种通过萃取剂反复多次浸润固体检材而将动植物油脂提取出来的方法。索氏提取法的优点是萃取率高, 可有效地从脱水检材中提取动植物油脂。但该方法也存在一些不足之处: (1) 只适用于固体检材, 无法处理液体检材。这也是与溶剂提取法最主要的区别所在^[22]; (2) 萃取时间较长, 大约 2~5 h^[19]; (3) 有机溶剂用量大; (4) 破坏检材的原始状态。检材需研磨成粉末, 以增加固体和有机溶剂的接触面积, 当检材量过少时, 需谨慎选择该方法^[23]; (5) 该方法需对有机溶剂持续加热, 可能会导致动植物油脂氧化。溶剂的选择是索氏提取法的关键。

在 SCE 技术中, 二氧化碳(CO₂)因能在接近室温的条件下实现高效萃取而成为最常用的萃取剂, 且由于是 CO₂ 覆盖, 可有效防止检材中热敏性物质的氧化和逸散^[24]。香料类植物油脂(精油)物证受热易挥发, 采用上述方法很难进行有效提取。Wu 等^[25]应用 SCE 解决了香料类植物油脂物证提取难的问题, 该方法既能溶解精油, 又可从较低温度下将精油从固体检材中有效提取出来, 精油提取率高, 纯度高。且该方法使用的是 CO₂, 不使用有机溶剂, 故无萃取剂残留, 对人体无危害, 不污染环境, 操作便捷, 但其从动物脂肪中提取脂质的适用性还有待研究。

1.1.2 样品富集与纯化方法 检材经提取后, 如果动植物油脂浓度较高, 则可直接进行仪器分析, 但许多检材中的动植物油脂含量极少, 存在微量或痕量的情况, 单独使用样品提取方法时, 待测组分

的浓度无法达到仪器检测限,因此,在样品提取后需增加样品富集和纯化步骤,以去除干扰物和增加分析物浓度,提高仪器分析的灵敏度。样品富集和纯化的优势是^[26]:(1)去除样品中特定的干扰物,消除其对目标分析物检测和定量的影响;(2)提高目标分析物的浓度,使之更易检测和定量;(3)降低质谱分析过程中的离子抑制。

固相萃取法(SPE)是利用检材与萃取填料之间分子作用力的不同,将待测组分先吸附到固定相上,再通过淋洗、洗脱、净化和富集等步骤进行纯化^[27]。该方法提高了动植物油脂的回收率,并可将干扰组分进行有效分离;SPE 选择性好、成本低,可与不同后续检测手段兼容^[28]。SPE 主要用于动植物油脂中甾醇、角鲨烯、白藜芦醇、胆固醇、磷脂和酚类等化合物的富集^[29-31]。Shen 等^[32]采用 SPE 对降解油脂中的脂质氧化物进行了选择性分离。研究发现,SPE 可选择性地捕获极性脂质氧化物,这为分离氧化动植物油脂物证中脂质氧化物提供了重要参考。

固相微萃取法(SPME)的原理是基于分析物与涂层固定相之间的分配平衡^[33]。由于 SPME 的顶部空间可使挥发性物质富集,因此,SPME 主要用于动植物油脂物证中挥发物的测定,且其独特便捷的微型装置设计,使之可与气相色谱(GC)、气相色谱-质谱(GC-MS)或全二维气相色谱(GC×GC)联合使用^[34]。该方法的优点是操作简单、有机溶剂和检材消耗少、检测速度快等^[35]。其缺点是萃取头价格较高,且易断裂,含杂质较高的检材或结合态物质不适合用该方法进行富集和纯化^[36]。已有报道将固相微萃取与气相色谱-质谱(SPME/GC-MS)结合用于动植物油脂物证测定^[37-39]。

分子印迹技术(MIT)的原理是利用分子印迹聚合物对印迹分子进行专一化识别^[40]。其关键在于分子印迹聚合物的合成,制备方法是待分离物质的纯品(印迹分子)、功能单体和交联剂混合并发生相互作用形成聚合,再去除印迹分子,即可得到分子印迹聚合物(图 2)^[41]。MIT 具有特异性识别、稳定性高、机械强度好、制备简单和可反复使用等优点,尤其适合作为 SPE 和 SPME 的涂层材料,在动植物油脂物证分离和富集方面受到广泛关注。胆固醇广泛存在于动植物体内,在细胞生命活动中起到了重要作用。胆固醇与类固醇是动物油脂与植物油脂区分的重要标志物,但二者的理化性质极其相似,通过沉降、色谱等方式较难得到纯净物。Pešić 等^[42]成功制备了一种非共价型分子印迹聚合物,该聚合物在制备过程中未使用功能性单体,而仅采用丙烯酸二酯作为交联剂。此外还加入异丙醇作为成孔剂,以优化聚合物的结构和性能,并减少模板分子与潜在干扰物之间的非特异性相互作用,从而确保该分子印迹聚合物能够高效地区分胆固醇与其他分子结构类似的类固醇类物质。

综上,法庭科学工作者需根据案件情况、检材种类等综合考虑选择合适的样品提取、富集与纯化方法。通常,当检材量较多时,可选择样品提取方法,但索氏提取法耗时较长;如检材较少,可先采用溶剂提取法,再采用样品富集与纯化方法来提高目标物含量。

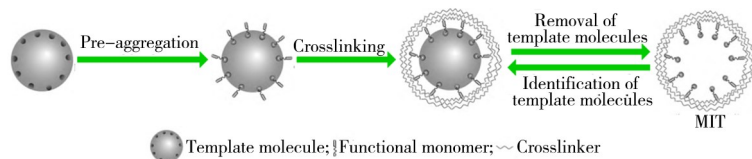


图 2 分子印迹聚合物合成原理示意图^[41]

Fig. 2 Schematic diagram of the synthesis principle of molecularly imprinted polymers^[41]

1.2 动植物油脂物证样品前处理的新趋势

1.2.1 样品提取方法的新趋势 在动植物油脂检材鉴别过程中,上述方法占据主导地位,但为了应对一些特殊案件和弥补上述方法的不足,许多新型和改进的样品提取方法应运而生,例如超声辅助萃取法(UAE)、微波辅助萃取法(MAE)和微流体平台技术等。UAE 是一种利用超声波辅助溶剂提取脂质的方法,其特点是效率高和低温提取,特别适合于生物检材处理^[43]。Liu 等^[44]使用 UAE 从动物组织中提取脂质,研究表明,该方法与溶剂提取法的萃取率相当,但溶剂消耗更低,萃取时间更短,具有对环境友好的优势。MAE 是一项新兴技术,通过微波来提高样品萃取过程的温度和压力,从而提高萃取率、缩短萃取时间、减少萃取剂用量^[45]。但微波对热不稳定性化合物存在潜在影响,故 MAE 在脂质萃取中的应用较少。Hu 等^[46]采用 MAE 提取动物油脂,该法与索氏提取法的萃取率相当,但 MAE 提取

的油脂具有良好的理化性质和氧化稳定性,这是因为MAE提取的油脂中总酚含量较高,具有较强的抗氧化活性。微流体平台技术通过生物芯片将大规模的台式仪器小型化、便携化为微型规模,方便危险场所或警方办案现场应用,这种技术也被应用到动植物油脂物证的提取中^[47]。Lim等^[48]开发了一种基于聚二甲基硅氧烷(PDMS)的集成微流控平台,可以在一台设备上实现多个样品前处理步骤,高效和定量分析不同植物中的脂质。在集成装置上使用毒性较小的水溶液异丙醇萃取脂质的效率是Bligh-Dyer法的113.6%。综上所述,新型基于脂质组学的动植物油脂物证样品提取技术具有高通量、溶剂消耗少、自动化等优点,是未来的研究方向。

1.2.2 样品富集与纯化的新趋势 样品富集与纯化方法正朝着两个方向飞速发展,包括样品富集与纯化设备的自动化,以及更高选择性的吸附剂(限进材料(RAM)和免疫吸附剂)^[49-51]。全自动样品富集与纯化设备已应用于土壤、空气和水等有机污染物的富集和分离,可自动进行溶剂萃取、洗脱、富集和纯化操作,减少了人为操作的失误,提高了检测结果的可靠性。法庭科学实验室也可自主研究适合处理动植物油脂物证的全自动样品富集与纯化设备^[52]。RAM实际上是一种具有生物相容性的生物样品富集材料,内表面具有反相性质,外表面具有亲水性,主要作为固相萃取柱材料^[53]。RAM不但可吸附目标脂质化合物的官能团,还具有阻挡干扰蛋白大分子的作用,同时,不会使蛋白质发生不可逆变性,避免蛋白质因变性堵塞固相萃取柱的微孔^[54]。免疫吸附剂是一种可吸附特异性抗体(或抗原)的载有抗原(或抗体)的不溶性溶剂^[55]。对于蛋白质等大分子,免疫吸附剂只与特定蛋白质发生特异性反应,从而达到富集与纯化目的。目前,免疫吸附主要应用于医疗领域,在法庭科学领域,免疫吸附剂是否可选择性去除检材中蛋白质等大分子,留下脂质小分子,还有待法庭科学家们的进一步探索。

2 基于脂质组学的动植物油脂物证分离分析技术

2.1 气相色谱-质谱联用法(GC-MS)

GC-MS是脂质组学分析动植物油脂物证中脂肪酸的最常用分析方法,集分离和检测于一体,具有分离效能高、检测灵敏度高和检材用量少等优点,是ASTM E 2881-18标准指定的火灾中动植物油脂检测的分析方法^[1]。当前,国内外大多数法庭科学实验室出具的动植物油脂检测报告都是建立在GC-MS的分析结果之上^[56-57]。但GC-MS只能检测脂肪酸浓度高的检材,具有一定的局限性。

GC-MS特别适合鉴别低分子量易挥发的矿物油(汽油、柴油或煤油等),而对于高沸点、不易挥发的动植物油脂则需先进行脂肪酸甲酯化,再进行GC-MS分析^[58]。脂肪酸甲酯化是增加脂肪酸的挥发性、提高检测灵敏度、改善色谱分辨率和减少长链脂肪酸色谱峰拖尾的常见步骤^[59]。甲酯化方法包括酸催化甲酯化法、无机碱催化甲酯化法和有机碱催化甲酯化法^[60-61]。酸催化甲酯化法适用于甘油三酯、磷脂和游离脂肪酸,也是AOAC 969.33^[62]与GB 5009.168-2016^[56]指定的脂肪酸甲酯化方法。无机碱催化法主要适用于甘油三酯和磷脂等脂肪酸的甲酯化,不适用于游离脂肪酸、脂肪酸盐以及酸价大于2的脂质甲酯化^[63]。有机碱催化甲酯化适合于所有脂质种类^[64],且操作简便、步骤少、可有效减少中间环节及样品损失,转化率高,甲酯化完全。MacGee等^[65]对比了3种甲酯化方法的甲酯化转化率,认为有机碱催化甲酯化法优于酸和碱甲酯化法。但有机碱催化甲酯化法要求进样口温度达到360~400℃,导致其使用受到一定限制。脂肪酸是动植物油脂鉴别中的重要特征指标,常用于动植物油脂的种属区分^[66]。张炳谦等^[67]利用GC-MS/MS研究了人油脂和5种植物油脂物证中主要脂肪酸的组成,采用碱催化甲酯化,以肉豆蔻酸为潜在生物标志物,当信噪比大于3时,实现了对刑事案件现场提取的0.2 mg以上的油脂的有效鉴别。

2.2 液相色谱-质谱联用法(LC-MS)

相较于其他分析技术,LC-MS可达到较佳的脂质组学动植物油脂覆盖范围^[68-70]。GC-MS不适用于不挥发物质和热不稳定物质的分析,而LC-MS不受样品的挥发性和热稳定性的限制。高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)对热不稳定性化合物具有适应性,可避免甲酯化中的异构化^[71]。但该方法缺乏标准谱库作为支撑,脂质的鉴别完全依赖科研人员的经验。因此,在应用上不及GC-MS普及。

由于刑事案件现场的动植物油脂检材所处载体及外部环境复杂,有必要对老化油脂进行研究。王岩等^[72]采用高效液相色谱-蒸发光检测法对不同载体上的老化油脂物证进行分析,发现人油脂和6种动

植物油脂可通过比较色谱峰进行区分,人油脂老化受时间、温度、湿度、光照和载体等因素的协同作用。Kimpe 等^[73]采用反相液相色谱-质谱联用法对古罗马时期的油脂进行分析,发现大量的多不饱和甘油三酯和微量的饱和甘油三酯,通过该方法可实现对较长放置时间的动物油脂物证的鉴别。

2.3 基于MS的分析技术

MS 凭借其灵敏度和选择性,成为脂质组学定性和定量分析的首选方法。虽然目前还不可能检测和量化给定细胞系统中的所有个体脂质,但脂质组学分析的目的是确定尽可能多的个体脂质。与 DNA、RNA、碳水化合物或蛋白质等生物聚合物相比,脂质在质谱分析中显示出更少的标准化片段,这主要归因于每种脂类都有其独特的破碎规则和特定的电离效率。这些因素共同构成了一个巨大的挑战,即发展一种能够全面检测所有个体脂质并实现标准化的方法^[74]。基于质谱的脂质组学大体分为鸟枪法脂质组学、基于 LC-MS 的脂质组学和脂质组学中的基质辅助激光解吸-质谱(MALDI-MS)^[75]。

鸟枪法脂质组学指不经过色谱,直接将溶液注入电喷雾-质谱(ESI-MS)进行脂质分析。该方法的优势是^[76]:(1)可有效降低脂质聚集,提高脂质定量准确性;(2)可保持特定脂类中不同脂质分子之间的离子峰强度比率不变;(3)可保持不同脂质分子之间的离子抑制恒定。鸟枪法脂质组学包括串联质谱鸟枪法脂质组学、高质量精度鸟枪法脂质组学和多维质谱鸟枪法脂质组学。串联质谱鸟枪法脂质组学是将溶液注入串联质谱(MS/MS)中,经双重质谱过滤后,质谱的信噪比(S/N)大幅度提高,该方法目前主要用于植物样品物证的脂质组学分析^[77]。其优点是应用三重四极杆质谱仪进行分析,操作简单、灵敏度高和仪器成本较低,一次 MS/MS 采集可实现某一类脂质内所有脂质分子的检测。但该方法需要更多的内标物,脂质的脂肪酰基难识别,精确定量难。高质量精度鸟枪法脂质组学应用四极杆飞行时间质谱仪或四极杆轨道阱质谱仪在小质量范围内逐步进行子离子质谱分析,最终得到所有质量范围内的碎片信息。它可以提高检测的准确性、灵敏度和分辨率,有助于减少假阳性的出现。许多文献中提及的自上而下的脂质组学、自下而上的鸟枪法脂质组学和多产物离子扫描的高质量精度鸟枪法脂质组学均是指该方法^[78-80]。其优势是灵敏、高效和高覆盖率,但也有一些难点需要克服,如需要多个内标物,对非极性脂质定量时需进行离子化响应校正,高峰碎片离子会影响低丰度碎片的分析。多维质谱鸟枪法脂质组学主要利用不同类别的脂质具有不同的电荷性质,在多维质谱中选择性电离某些脂质,可在 MS 中实现各类脂质的源内分离^[81]。该方法相较于上述两种方法,优势更加明显,质谱仪不但可作为分析仪器,也可用于脂质的分离,起到色谱仪的作用,可大幅度提高 S/N 的信号强度,且无需预先了解目标脂质的有关信息。但其也有一些局限性,如分析含量极低的脂质时存在离子抑制,同分异构体碎裂无法区分,未知脂质的定性和定量效果有限。

基于 LC-MS 的脂质组学是应用液相色谱的出色分离能力和质谱的高灵敏检测能力进行脂质分析的方法,是国内外脂质分析最常用的方法^[82-83]。开发基于 LC-MS 的脂质组学方法需考虑 3 个方面^[84]:(1)选择合适的色谱柱及分离条件;(2)选择合适的洗脱条件与质谱仪的适当联用;(3)选择合适的质谱参数。基于 LC-MS 的脂质组学包括正相 LC-MS、反相 LC-MS、亲水作用 LC-MS 等方法。正相 LC-MS 主要用于分离不同类别的脂质,由于各个类别的洗脱时间太短,所以,这种方法通常使用选择 SIM 模式^[85]。反相 LC-MS 主要用于特定类别脂质中不同脂质的分离^[86]。该方法主要使用含有十八烷基甲硅烷基的固定相,流动相以乙腈或甲醇为主。亲水作用 LC-MS 特别适合全脂质分析,使用亲水固定相,反相洗脱液,任何可和水互溶的非质子溶剂均可作为其流动相^[87]。基于 LC-MS 的脂质组学主要用于新型脂质或低含量脂质的鉴别,但其在绝对定量方面的应用受限。

MALDI-MS 是一种软电离技术,利用紫外激光束诱导基质材料产生解吸和消融。在消融过程中,基质材料吸收激光能量后,其外表面会发生快速蒸发,形成包含中性基质分子、离子化基质分子、质子化基质分子以及基质簇的热羽流。这些基质分子和簇在羽流中能够将电荷转移给脂质分子,从而使脂质分子离子化。通过 MALDI-MS 技术,可以检测到这些离子化的脂质分子,它们通常以中性分子加合物或准分子离子的形式出现^[88]。MALDI-MS 可用于绝大多数脂质、氧化脂质和脂质提取物的检测^[89]。其优点是分析速度快、易于操作、灵敏度高和全自动化^[90]。但也有一些局限性,如定量存在困难,质谱分析难,在混合脂质分析方面的效果欠佳^[91]。由于分子结构的多样性,目前还没有一种单一的质谱方法可以覆盖所有动植物油脂物证的脂质组学检测,通常是不同实验平台的结合^[8,92-93]。

3 数据挖掘

动植物油脂物证检测数据分析一直是一项具有挑战性的工作^[94]。基于脂质组学的动植物油脂物证的检测会产生复杂的质谱信息,如不同加合离子形式、脂质分子特征、同位素峰和同分异构体等,涉及数百乃至数千种脂质小分子^[95-96]。同时,随着样本数量的增加,数据处理的难度也呈几何难度增加,这使得多元数据分析方法成为动植物油脂物证脂质组学研究中数据处理和分析的重要手段,实验设计、数据采集、数据预处理、脂质分子注释、一级和二级质谱库检索、统计分析和数据解释等均与多元数据处理策略密切相关^[97]。

近年来,多元数据分析方法在动植物油脂物证鉴别中得到了广泛应用^[98]。对于复杂的动植物油脂检材,仅通过谱图比对,已不能进行准确区分,还需利用多元数据分析方法对数据进行深度挖掘,建立数学模型,将动植物油脂的谱图数据与其组成之间的关系进行定量关联。通过建立有效模型,可以快速对未知成分的动植物油脂物证进行鉴别。大体来说,多元数据分析方法在动植物油脂物证数据分析中的应用可分为两类:无监督学习方法和有监督学习方法^[99]。典型方法如图3所示。

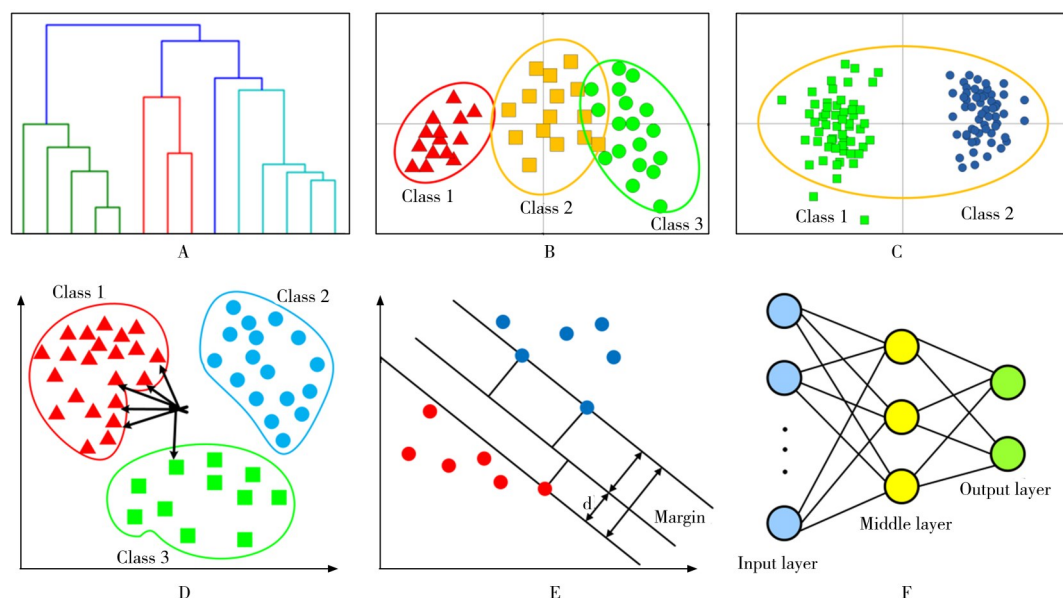


图3 数据分析中的典型多元数据分析方法

Fig. 3 Typical multivariate data analysis methods in data analysis

A. different types of HCA diagrams, B. PCA score plot, C. OPLS-DA score plot for two groups in positive and negative modes, D. schematic diagram of k-NN (arrows indicate the Euclidean distance between unknown and known samples), E. SVM model diagram for two classifications (the distance between the two lines represents margin), F. the display of DL classification model, which includes input layer, middle layer, and output layer (A. 不同种类的 HCA 图, B. PCA 得分图, C. 正负模式下两组的 OPLS-DA 得分图, D. k-NN 原理示意图(箭头表示未知样本和已知样本之间的欧氏距离), E. 两个分类的 SVM 模型图(两条线之间的距离代表决策边界), F. DL 分类模型, 包括输入层、中间层和输出层)

在对动植物油脂物证分析的实验设计中,多元数据分析方法的选择应由数据特点和实验目的驱动^[97]。无监督学习又称探索性分析,是指在没给样本贴标签的情况下,通过可视化工具将数据聚类成组,并挖掘数据之间的差异性和相似性,在无先验信息的前提下,探索数据内的规律性^[100]。在无监督学习中,层次聚类分析(HCA)是一种将数据划分为不同组或类别的方法,同一组内的样本具有较高的相似度,而不同组之间具有较低的相似度^[101]。主成分分析(PCA)常用于未知检材数据的初步探索,用以确定不同检材的相关性、异常值和稳定性^[102]。有监督学习则是通过对贴有标签的数据进行训练得到一个最优的模型,用该模型输入数据 X 来预测变量 Y ^[103]。有监督学习包括正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)、k-NN、支持向量机(SVM)和深度学习(DL)等^[104]。

PCA 和 OPLS-DA 等方法通过降维和模式识别可将复杂数据简化并保留基本特征。由于线性、拟合和独立性的限制,上述方法较难用于复杂的非线性变量和超大型高维数据集的处理^[105]。相反,k-NN、SVM 和 DL 等方法可通过训练集的训练来提高模型的预测能力,在复杂非线性变量方面具有更强的处理能力。PCA 是动植物油脂物证鉴别分析的有效方法,可用于动植物油脂物证的初步评估。Lee 等^[106]将 7 种植物油脂物证的气相色谱数据结合 PCA 进行分析,发现 7 种植物油脂物证分别集中在不同的组,各组之间均得到准确

区分。PCA 和 OPLS-DA 的结合有利于发现新的潜在生物标志物。Rombouts 等^[107]将 PCA 和 OPLS-DA 结合用于动物油脂区分, 根据 VIP 和 p 值发现, L -肉碱是区分摄入红肉和白肉的潜在生物标志物。

动植物油脂中的脂质化合物是鉴别油脂物证种属的重要潜在生物标志^[108]。结合多元数据分析策略的脂质组学不仅可进行全面的指纹图谱解析, 还可获得动植物油脂物证之间的显著性差异及筛选出潜在生物标志物, 已成为解决动植物油脂物证相关问题的有力工具^[102]。由于动植物油脂物证之间的脂质种类和含量相近, 单纯通过仪器分析对动植物油脂物证进行鉴别难度较大, 且难以满足法庭科学领域准确、快速鉴别的需求, 因此, 检测数据的深度挖掘成为必然选择。总之, 综合考虑实验目的和数据特点, 选择恰当的多元数据分析方法可能有助于深入理解数据间的相互关系。数据间的相互关系可以从以下几个方面进行探索^[109]: (1) 通过相关性分析, 探索不同脂质化合物之间的内在联系, 了解其油脂物证中的共存模式。这种分析可帮助识别出哪些脂质化合物可共同作用于某一特定的生物过程或环境因素, 从而提供更深层的鉴别线索; (2) HCA 可将具有相似特征的脂质化合物归为一类, 帮助识别出不同油脂物证之间的共有和特有脂质成分。这种分类不仅有助于简化数据, 还能提供更直观的鉴别依据; (3) PCA 和 OPLS-DA 等多元数据分析方法能够进一步提炼数据中的关键信息, 通过降维和分类技术, 实现动植物油脂物证的准确鉴别。这些方法的应用, 不仅能够提高物证鉴定人员对于鉴别油脂物证的能力, 还能为揭示油脂物证中潜在的生物标志物和生物过程提供有力支持。

4 结 论

我国脂质组学研究起步比西方国家晚, 但近十多年来发展迅猛, 众多科研院校都建立了各具特色的脂质组学平台, 脂质组学研究主要集中在医学、农业和工业等方面, 而在法庭科学领域的脂质组学研究特别匮乏。笔者在课题组前期研究的基础上, 围绕法庭科学领域案件现场常见的动植物油脂物证, 系统性介绍了当前国内外脂质组学在动植物油脂物证检验鉴别方面的最新进展, 以期有更多的研究人员和技术人员加入到动植物油脂物证鉴别研究中。

但也要看到, 脂质组学在动植物油脂物证鉴别中依然面临诸多挑战: (1) 数据库缺乏。由于犯罪现场动植物油脂氧化酸败、基质复杂等因素的影响, 目前的工具和数据库还不足以支撑对复杂未知物进行可靠的注释, 故脂质化合物注释的准确性和数据处理结果的可靠性还需进一步加强^[96]; (2) 分析仪器限制。脂质组学的快速发展很大程度上是因为质谱技术的突破, 所以, 未来动植物油脂物证鉴别方面还需进一步开发新的分析仪器; (3) 同分异构体鉴别难。动植物油脂物证中复杂脂质同分异构体的定性和定量分析依然具有挑战, 需要创新多元数据分析方法和扩充动植物油脂脂质数据库, 以便为法庭科学动植物油脂物证鉴别提供深入和全面的见解。

参考文献:

- [1] ASTM E 2881-18. Standard Test Method for Extraction and Derivatization of Vegetable Oils and Fats from Fire Debris and Liquid Samples with Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. ASTM International, 2018.
- [2] Han X, Gross R W. *J. Lipid Res.*, 2022, 63(2): 100164.
- [3] Liu P Y, Liu Z F, Zhou H, Zhu J, Liu Y. *China Biotechnol.* (刘平阳, 刘占芳, 周红, 朱军, 刘耀. 中国生物工程杂志), 2023, 43(1): 87-103.
- [4] Alasalvar H, Basyigit B, Türker D A, İçyer N C, Çam M. *Carpathian J. Food Sci. Technol.*, 2022, 14(4): 89-102.
- [5] Handy O, Mohammed H S. *J. Fluoresc.*, 2023, 33(4): 1631-1639.
- [6] Mannucci P M, Joliet O, Meijaard E, Slavin J, Rasetti M, Aleta A, Moreno Y, Agostoni C. *Front Public Health*, 2023, 11: 1106083.
- [7] Kitazawa I K, Yamaguchi K. *Bunseki Kagaku*, 2021, 70(10/11): 631-637.
- [8] Ting H, Jin L. *J. Sep. Sci.*, 2018, 41(1): 351-372.
- [9] Casiraghi A, Roda G, Casagni E, Cristina C, Musazzi U M, Franzè S, Rocco P L, Giuliani C, Fico G, Minghetti P, Gambaro V. *Planta Med.*, 2018, 84(4): 242-249.
- [10] Al Juhaimi F, Uslu N, Babiker E E, Ghafoor K, Ahmed I A M, Özcan M M. *J. Oleo Sci.*, 2019, 68(11): 1099-1104.
- [11] Thilakarathna R C N, Siow L F, Tang T K, Chan E S, Lee Y Y. *Ultrason. Sonochem.*, 2023, 92: 106280.
- [12] Ubeyitogullari A, Rizvi S S H. *J. Dairy Sci.*, 2020, 103(10): 8796-8807.
- [13] Folch J, Lees M, Stanley G. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226: 495-509.
- [14] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T V, Shevchenko A, Schwudke D. *J. Lipid Res.*, 2008, 49: 1137-1146.
- [15] Lin J H, Liu L Y, Yang M H, Lee M H. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(16): 4984-4986.

- [16] González-Fernández M J, Manzano-Agugliaro F, Zapata-Sierra A, Belarbi E, Guil-Guerrero J L. *J. Cleaner Prod.*, **2020**, 276: 123081.
- [17] Sicaire A G, Vian M A, Fine F, Carré P, Tostain S, Chemat F. *Ultrason. Sonochem.*, **2016**, 31: 319–329.
- [18] Lee J Y, Yoo C, Jun S Y, Ahn C Y, Oh H M. *Bioresour. Technol.*, **2010**, 101(Suppl 1): S75–S77.
- [19] Saini R K, Prasad P, Shang X M, Keum Y S. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22(24): 13643.
- [20] Iverson S J, Lang S L, Cooper M H. *Lipids*, **2001**, 36(11): 1283–1287.
- [21] Bligh E G, Dyer W J. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1959**, 37(8): 911–917.
- [22] Virot M, Tomao V, Colnagui G, Visinoni F, Chemat F. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1174(1/2): 138–144.
- [23] Uttama S, Itharat A, Rattarom R, Makchuchit S, Panthong S, Sakpakdeejaroen I. *J. Med. Assoc. Thailand*, **2014**, 97 (Suppl 8): S125–S132.
- [24] Chen X Q, Zhang Y, Wang Z Y, Zu Y G. *Nat. Prod. Res.*, **2011**, 25(19): 1807–1816.
- [25] Wu H, Li J L, Jia Y, Xiao Z H, Li P W, Xie Y X, Zhang A H, Liu R K, Ren Z W, Zhao M R, Zeng C Z, Li C Z. *J. Anal. Methods Chem.*, **2019**, 2019: 8192439.
- [26] Gauchier M, van Mierlo G, Vermeulen M, Déjardin J M. *Nat. Methods*, **2020**, 17(4): 380–389.
- [27] Li Y J, Wang T Y, Qin S Z, Li Y, Hu W, Cheng W B. *Chromatographia*, **2023**, 86(4): 333–347.
- [28] Cao X Y, Ye Z, Li X, Xu Y J, Liu Y F. *Food Control*, **2022**, 137: 108896.
- [29] Qi X, Wang X F, Yu L, Wa F, Wang X P, Zhang L X, Li P W. *Chin. J. Oil Crop Sci.* (戚欣, 汪雪芳, 喻理, 马飞, 王秀斌, 张良晓, 李培武. 中国油料作物学报), **2022**, 44(4): 718–728.
- [30] Yang Z Y, Hollebone B P, Wang Z D, Yang C, Landriault M. *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34(4): 409–421.
- [31] Han W C, Shi N, Wang X Y, Wang Z H, Wang K L, Gao M, Yu L, Chen D, Xu X. *Food Chem.*, **2021**, 339: 127885.
- [32] Shen Q, Zhang Z C, Emami S, Chen J C, Leite Nobrega de Moura Bell J M, Taha A Y. *NPJ Sci. Food*, **2021**, 5(1): 7.
- [33] Ji X Y. *Rev. Anal. Chem.*, **2022**, 41(1): 180–188.
- [34] Fang M C, Chin P S Y, Sung W C, Chen T Y. *Molecules*, **2023**, 28(11): 4376.
- [35] Ma Y J, Zhang L, Zhu B W, Du M, Xu X B. *Talanta*, **2024**, 270: 125573.
- [36] Scortichini S, Boarelli M C, Castello M, Chiavarini F, Gabrielli S, Marcantoni E, Fiorini D. *Adv. Mass Spectrom.*, **2020**, 55(11): e4534.
- [37] Jia X, Zhou Q, Wang J Q, Liu C S, Huang F H, Huang Y. *J. Food Biochem.*, **2019**, 43(10): e12786.
- [38] Xu Z H, Lv Z Z, Zhang W. *Anal. Lett.*, **2023**, 56(17): 2777–2791.
- [39] Soto C, Herreraez-Hernandez R, Campins-Falco P. *Adv. Sample Prep.*, **2023**, 8: 100093.
- [40] He Y F, Pang Y Q, Ge C, Xu Y. *Prog. Biochem. Biophys.*, **2023**, 50(6): 1319–1329.
- [41] Guan Q H, Yan L L, Tang L H, Xu M, Zhang L L, Huang L X. *Biomass Chem. Eng.* (管勤昊, 闫林林, 汤丽华, 徐曼, 张亮亮, 黄立新. 生物质化学工程), **2023**, 57(5): 51–60.
- [42] Pešić M P, Todorov M D, Becskerekki G, Horvai G, Verbić T Z, Tóth B. *Talanta*, **2020**, 217: 121075.
- [43] Lasunon P, Sengkhamparn N. *Molecules*, **2022**, 27(4): 1157.
- [44] Liu L Y, Na L X, Niu Y C, Guo F C, Li Y, Sun C H. *J. Chromatogr. Sci.*, **2013**, 51(4): 376–382.
- [45] Sampaopan Y, Suksaeree J. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **2022**, 58: e20577.
- [46] Hu B, Li C, Zhang Z Q, Zhao Q, Zhu Y D, Su Z, Chen Y Z. *Food Chem.*, **2017**, 231: 348–355.
- [47] Goncalves M, Goncalves I M, Borges J, Faustino V, Soares D, Vaz F, Minas G, Lima R, Pinho D. *Polymers*, **2024**, 16(10): 1416.
- [48] Lim H S, Kim J Y, Kwak H S, Sim S J. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(17): 8585–8592.
- [49] Mendes T V, Rosa M A, De Figueiredo E C. *Braz. J. Anal. Chem.*, **2022**, 9(35): 18–38.
- [50] Gholve C, Banerjee S, Kulkarni S. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2020**, 323(3): 1041–1046.
- [51] Birk M S, Charpentier E, Frese C K. *J. Proteome Res.*, **2021**, 20(10): 4886–4892.
- [52] Salazar J K, Fay M, Eckert C, Stewart D, Cranford V, Tortorello M L. *J. Food Prot.*, **2021**, 84(4): 639–646.
- [53] Bo C M, Li Y H, Liu B, Gong B L, Tang X F, Ma G J, Li Y. *Food Chem.*, **2023**, 418: 135988.
- [54] Wang H W, Huang C, Ma S J, Bo C M, Ou J J, Gong B L. *Trends Anal. Chem.*, **2022**, 147: 116526.
- [55] Zhang L J, Zang B, Huang C D, Ren J, Jia L Y. *Molecules*, **2019**, 24(11): 2119.
- [56] GB 5009.168–2016. National Food Safety Standard – Determination of Fatty Acids in Foods. Standard of the People's Republic of China (食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [57] Golay P A, Moulin J. *J. AOAC Int.*, **2016**, 99(1): 210–222.
- [58] Sciarone D, Tranchida P Q, Ragonese C, Schipilliti L, Mondello L. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33(4/5): 594–599.
- [59] Chiu H H, Kuo C H. *J. Food Drug Anal.*, **2020**, 28(1): 60–73.
- [60] Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Hill A R, Yurawecz M P, Delmonte P, Mossoba M M, Dugan M E, Kramer J K. *J. AOAC Int.*, **2004**, 87: 545–562.
- [61] Tsai C J, Liu C C, Hung L B, Pan B S. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **2012**, 89: 9–16.
- [62] 969.33AOAC. Fatty Acids in Oils and Fats—Preparation of Methyl Esters—Boron Trifluoride Method. AOAC Official Method, **2000**.

- [63] Yang P H, Zheng Z W, Zhao Q X, Zhang Z, Feng D X. *China Oils Fats*(杨培慧, 郑志雯, 赵秋香, 张峥, 冯德雄. 中国油脂), **2003**, 28(7): 3.
- [64] Dworzanski J P, Berwald L, McClenen W H, Meuzelaar H L C. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **1991**, 21(1/2): 221–232.
- [65] MacGee J, Allen K G. *J. Chromatogr. A*, **1974**, 100(1): 35–42.
- [66] Shi Q N. *Environ. Chem.*, **2023**, 42(10): 3600–3602.
- [67] Zhang B Q, Wang J Z, Sun G J. *J. People's Public Secur. Univ. China: Sci. Technol.* (张炳谦, 王季中, 孙桂进. 中国人民公安大学学报: 自然科学版), **2004**, 10(4): 3.
- [68] Song Y H, Cai C Y, Song Y Z, Sun X, Liu B X, Xue P, Zhu M X, Chai W Q, Wang Y H, Wang C F, Li M M. *Food Sci. Anim. Resour.*, **2022**, 42(1): 1–17.
- [69] Bryant C M, Warnkca J M, Chen R, Shepard C. *J. Forensic Sci.*, **2021**, 66(2): 534–546.
- [70] Harrider E M, Kretschmer F, Bocker S, Witting M. *J. Chromatogr. B*, **2022**, 1188: 123069.
- [71] Sznajder-Katarzynska K, Surma M, Wiczowski W, Pisku M. *Food Res. Int.*, **2020**, 137: 109583.
- [72] Wang Y, Huang H B. *J. China Crim. Police Univ.* (王岩, 黄浩博. 中国刑警学院学报), **2017**, 138(4): 78–83.
- [73] Kimpe K, Jacobs P A, Waelkens M J. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 937(1/2): 87–95.
- [74] Yang K, Cheng H, Gross R W, Han X L. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(11): 4356–4368.
- [75] Han X L. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. Wang Y H, Xu L, Lan D M, transl. Beijing: China Light Industry Press(韩贤林. 脂质组学: 脂质的综合质谱分析. 王永华, 许龙, 蓝东明, 译. 北京: 中国轻工业出版社), **2016**: 38–56.
- [76] Nielsen I O, Olsen A V, Dicroce-Giacobini J, Papaleo E, Andersen K K, Jäättelä M, Maeda K, Bilgin M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2020**, 31(4): 894–907.
- [77] Hsu F F. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, 410(25): 6387–6409.
- [78] Jia W, Du A, Fan Z, Shi L. *Food Chem.*, **2022**, 391: 133270.
- [79] Schuhmann K, Moon H, Thomas H, Ackerman J M, Groessl M, Wagner N, Kellmann M, Henry I, Nadler A, Shevchenko A. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(18): 12085–12093.
- [80] Ejsing C S, Duchoslav E, Sampaio J, Simons K, Bonner R, Thiele C, Ekroos K, Shevchenko A. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(17): 6202–6214.
- [81] Wang M, Han X. *Methods Mol. Biol.*, **2014**, 1198: 203–220.
- [82] Yang Y, Wu L, Lv Y, Miao Z, Wang Y, Yan J, Li J, Li C, Ding H. *Biochimie*, **2023**, 208: 46–55.
- [83] Schönberger K, Mitterer M, Buescher J M, Cabezas-Wallscheid N. *STAR Protoc.*, **2022**, 3(2): 101408.
- [84] Cajka T, Fiehn O. *Trends Anal. Chem.*, **2014**, 61: 192–206.
- [85] Hermansson M, Uphoff A, Kakela R, Somerharju P. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(7): 2166–2175.
- [86] Brouwers J F. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1811(11): 763–775.
- [87] Wang S, Li J, Shi X, Qiao L, Lu X, Xu G. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1321: 65–72.
- [88] Engel K M, Prabutzki P, Leopold J, Nimptsch A, Lemmnitzer K, Vos D R N, Hopf C, Schiller J. *Prog. Lipid Res.*, **2022**, 86: 101145.
- [89] Yang Z, Chang Z, Deng K, Gu J, Wu Y, Sun Q, Luo Q. *Anal. Chem.*, **2023**, 95(46): 16786–16790.
- [90] Schiller J, Suss R, Fuchs B, Muller M, Zschornig O, Arnold K. *Front. Biosci.*, **2007**, 12: 2568–2579.
- [91] Gonzalo X, Broda A, Drobniewski F, Larrouy-Maumus G. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2021**, 27(6): 912.e1–912.e5.
- [92] Uran S, Larsen S, Jacobsen P B, Skotland T. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 758(2): 265–275.
- [93] Gao F, Tian X, Wen D, Liao J, Wang T, Liu H. *Biochim. Et. Biophys. Acta*, **2006**, 1761(7): 667–676.
- [94] Wu B F, Wei F, Xu S L, Xie Y, Lv X, Chen H, Huang F H. *Trends Food Sci. Technol.*, **2021**, 107: 358–376.
- [95] Hailina P W, Maritha V, Musfiroh I. *Food Sci. Anim. Resour.*, **2022**, 42(5): 744–761.
- [96] Qin Z J, Wang J, Wang D, Xiao H M, Lv X, Chen H, Wei F. *Trends Food Sci. Technol.*, **2024**, 143: 104298.
- [97] Lu C H, Li B Q, Jing Q, Pei D, Huang X Y. *Food Chem.*, **2023**, 420: 136161.
- [98] Martín-Alberca C, Ortega-Ojeda F E, García-Ruiz C. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 928: 1–19.
- [99] Blaise B J, Correia G D S, Haggart G A, Surowiec I, Sands C, Lewis M R, Pearce J T M, Trygg J, Nicholson J K, Holmes E, Ebbels T M D. *Nat. Protoc.*, **2021**, 16(9): 4299–4326.
- [100] Ieyer N C, Kuran N. *J. Food Sci.*, **2024**, 89(2): 1035–1046.
- [101] Heidari M, Talebpour Z, Abdollahpour Z, Adib N, Ghanavi Z, Aboul-Enein H Y. *J. Food Sci. Technol.*, **2020**, 57(9): 3415–3425.
- [102] Sohail A, Arif F. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2020**, 151: 14–22.
- [103] Bastanlar Y, Ozuysal M. *Methods Mol. Biol.*, **2014**, 1107: 105–128.
- [104] Fisher C M, Croley T R, Knolhoff A M. *Trends Anal. Chem.*, **2021**, 136: 116118.
- [105] Shan D, Xu D, Hu S, Qi P, Lu J, Wang D. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2023**, 235: 115608.
- [106] Lee D S, Noh B S, Bae S Y, Kim K. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 358(2): 163–175.
- [107] Rombouts C, Van Meulebroek L, De Spiegeleer M, Goethals S, Van Hecke T, De Smet S, De Vos W H, Vanhaecke L. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2021**, 65(7): e2000463.
- [108] Criado-Navarro I, Mena-Bravo A, Calderón-Santiago M, Priego-Capote F. *Food Chem.*, **2019**, 299: 125136.
- [109] Olshansky, Giles C, Salim A, Meikle P J. *Prog. Lipid Res.*, **2022**, 87: 101177.