

# 基于代谢组学法鉴定液体果蜡中漂白紫胶的模型构建

李坤<sup>1,2</sup>, 张雯雯<sup>1,2,\*</sup>, 唐保山<sup>2</sup>, 邢淑婕<sup>1</sup>, 马金菊<sup>2</sup>, 朱静<sup>1</sup>, 雷福厚<sup>3</sup>, 张弘<sup>2,\*</sup>

(1. 信阳农林学院食品学院, 河南 信阳 464000;

2. 中国林业科学研究院高原林业研究所, 国家林业和草原局特色森林资源工程技术研究中心, 云南 昆明 650233;

3. 广西民族大学广西林产化学与工程重点实验室, 广西林产化学与工程协同创新中心, 广西 南宁 530006)

**摘要:** 为鉴定液体果蜡中是否含有漂白紫胶, 借鉴代谢组学的研究思路和方法, 采用液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱定性, 并结合液相色谱蒸发光散射检测器对不同来源的漂白紫胶进行靶向化合物分析。通过无监督的主成分分析和有监督的偏最小二乘判别分析等多元统计分析, 筛选出12种靶向化合物。根据变量投影重要性值分为5种差异性化合物和7种共性化合物。最后, 以共性化合物为生物标识物, 在市售的商业化液体果蜡产品中, 验证了该方法的可行性, 通过该研究结论并结合色谱-质谱联用技术可以鉴定液体果蜡中是否含有漂白紫胶。

**关键词:** 漂白紫胶; 鉴定; 液体果蜡; 液相色谱-四极杆串联飞行时间质谱

## Metabolomics-Based Identification of Bleached Shellac in Liquid Fruit Wax

LI Kun<sup>1,2</sup>, ZHANG Wenwen<sup>1,2,\*</sup>, TANG Baoshan<sup>2</sup>, XING Shujie<sup>1</sup>, MA Jinju<sup>2</sup>, ZHU Jing<sup>1</sup>, LEI Fuhou<sup>3</sup>, ZHANG Hong<sup>2,\*</sup>

(1. College of Food, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China;

2. Institute of Highland Forest Science, Chinese Academy of Forestry, Research Center of Engineering and Technology on Characteristic Forest Resources, State Administration of Forestry and Grassland, Kunming 650233, China;

3. Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to identify whether liquid fruit waxes could be added with bleached shellac. The compounds of bleached shellac from different sources were analyzed by targeted metabolomics based on liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) combined with liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Twelve target compounds were selected by multivariate statistical analysis including unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). According to variable importance in the projection (VIP) value, five differential compounds and seven shared compounds were identified. Finally, the viability of this method in the detection of commercial liquid fruit wax products was verified using the shared compounds as biomarkers. These results showed that chromatography combined with mass spectrometry can identify whether bleached shellac could be added in liquid fruit wax.

**Keywords:** bleached shellac; authentication; liquid fruit wax; liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220110-074

中图分类号: Q599; S713; TQ917

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)14-0377-07

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 信阳农林学院青年基金项目(QN2021030); 广西民族大学开放基金项目(GXFG2012);

河南省科技攻关项目(232102110163); 河南省高等学校重点科研项目(23A550015);

信阳农林学院科技创新团队项目(XNKJTD-001)

第一作者简介: 李坤(1987—)(ORCID: 0000-0002-3911-5206), 男, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物化学与食品功能材料。

E-mail: likunkm@163.com

\*通信作者简介: 张雯雯(1985—)(ORCID: 0000-0002-3043-4059), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为天然产物开发与利用。E-mail: zhangwenwen1105@163.com

张弘(1963—)(ORCID: 0000-0003-4220-6026), 男, 研究员, 博士, 研究方向为天然特色生物资源化学与工程。E-mail: kmzhong@163.com

引文格式:

李坤, 张雯雯, 唐保山, 等. 基于代谢组学鉴定液体果蜡中漂白紫胶的模型构建[J]. 食品科学, 2023, 44(14): 377-383.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220110-074. <http://www.spkx.net.cn>

LI Kun, ZHANG Wenwen, TANG Baoshan, et al. Metabolomics-based identification of bleached shellac in liquid fruit wax[J]. Food Science, 2023, 44(14): 377-383. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220110-074.

<http://www.spkx.net.cn>

为了保持水果和蔬菜较好的感官品质、微生物安全和营养价值, 延长果蔬贮藏期和货架期, 保鲜处理是果蔬采后管理的重要环节。液体果蜡是一种用于果蔬处理的涂膜剂, 是广泛使用的果蔬涂膜保鲜剂<sup>[1]</sup>。液体果蜡涂覆在果蔬表面形成一层多孔、连续的不规则薄膜, 可以很好地抑制各种生理生化的反应速率, 减少水分和营养物质的流失, 保持果蔬的品质<sup>[2-3]</sup>。出于安全、环保和优质的因素, 可食性液体果蜡在果蔬中的应用也愈发受到人们的青睐。

紫胶是紫胶虫分泌的一种呈紫红色的天然混合物, 也叫赤胶或虫胶, 中药学上称为紫草茸。紫胶是目前已经开发利用的唯一一种动物树脂, 主要由紫胶树脂、色素和蜡组成<sup>[4-6]</sup>。紫胶树脂经过漂白, 去除紫胶黄色素, 便得到漂白紫胶<sup>[7-9]</sup>。漂白紫胶具有原料天然、无毒的特点, 且具有良好的成膜性、生物相容性和可降解性, 是中国<sup>[10]</sup>和联合国粮农组织及世界卫生组织<sup>[11]</sup>允许在食品和药品领域添加的齐聚物, 在果蔬保鲜领域应用极广<sup>[12]</sup>。然而, 由于近年来紫胶价格波动, 市场上出现了冒充漂白紫胶基液体果蜡的假冒液体果蜡产品。中国已发生数件因液体果蜡中是否含有漂白紫胶的争议而引发的商业纠纷案件。然而, 由于缺乏相应的检测手段, 不仅从业者面对琳琅满目的样品时难以辨别, 相关部门也显得无能为力。

紫胶树脂是由多种脂肪酸和倍半萜烯酸组成的内酯和交酯<sup>[13]</sup>, 是一系列复杂单体形成的聚酯混合物, 没有固定的结构和组成, 这给紫胶的检测带来了极大的困难。漂白紫胶是紫胶树脂经漂白后形成的浅色紫胶树脂, 漂白过程中除色素等发色基团被破坏外, 同时不同程度地对紫胶树脂产生影响, 这无疑加剧了紫胶树脂结构和组成的复杂性。在液体果蜡配方中, 漂白紫胶是成膜基质, 此外还含有其他类型聚合物或辅助性添加物<sup>[14]</sup>, 这些物质的干扰再次增加了漂白紫胶检测的难度。目前, 紫胶的检测方法可采用光谱法<sup>[15]</sup>, 其虽可与紫胶结构产生直接的关联, 但当紫胶存在于混合物中时可靠性急剧下降。此外, Wang Lili<sup>[16]</sup>和Sutherland<sup>[17]</sup>等分别采用气相色谱-质谱联用及热裂解气相色谱-质谱联用在分子水平上获得紫胶组成的详细信息。然而, 由于气相色谱需要化学或热预处理, 容易造成紫胶组成的信息丢失<sup>[18]</sup>。为此, Tamburini<sup>[18]</sup>和Coelho<sup>[19]</sup>等探索了以

液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, LC-QTOF-MS) 的方法检测紫胶的工作。这不仅促使业界深入认识了紫胶的化学组成, 同时给液体果蜡保鲜涂膜中漂白紫胶的定性检测带来了启示。

代谢组学是一种旨在识别和量化小分子代谢物的新型研究手段, 它从整体角度出发, 运用现代检测技术对目标物中尽可能多的代谢产物进行分析检测。代谢组学与现代仪器分析方法和化学计量学的结合大幅促进了其在食品领域的应用。随着高精度、高分辨仪器的发展和数据库的不断完善, 目前, 已在微生物代谢<sup>[20]</sup>、药物开发<sup>[21]</sup>、毒性评价<sup>[22]</sup>等领域广泛应用。

本实验借鉴代谢组学的研究思路和方法, 通过 LC-QTOF-MS 和蒸发光散射检测器 (evaporative light-scattering detector, ELSD) 相结合的方式, 对漂白紫胶的组成成分进行鉴定分析, 并筛选出其共性化合物组分, 从而建立漂白紫胶的定性分析方法。最后, 通过商业化液体果蜡和对照品的验证性分析证明方法的可靠性, 为液体果蜡产品中漂白紫胶的定性鉴定提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

漂白紫胶分别来自 B (17 个样本)、D (27 个样本)、L (54 个样本)、X (18 个样本) 和 Z (18 个样本) 5 个组。5 组样品分别购自云南省漂白紫胶的五家主要生产企业: 安宁戴科精细化工有限公司、昆明西莱克生物科技有限公司、贝思帝诺生物科技(昆明)有限公司、云南泽林林业科技有限公司、墨江县洪森虫胶有限公司(样本编码与企业无对应关系)。

GL-1 实验室中制备, 漂白紫胶质量分数 9% 的液体果蜡产品; GL-2~GL-4 为中国市场随机购买的商业液体果蜡产品。

(±)-9,10,16-三羟基棕榈酸标准品 (纯度 ≥ 98%) TCL (上海) 化成工业发展有限公司; 甲醇、乙腈 (均为色谱纯) 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 甲酸 (分析纯) 天津风船化学试剂科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

6540LC-QTOF-MS 仪、1260B 型蒸发光散射检测器

美国Agilent有限公司; AB204-S电子天平 梅特勒-托利多(中国)有限公司; FD-1C-50冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; PURELAB ELGA纯水机 莱特莱德(北京)环境技术股份有限公司; 78-1磁力加热搅拌器 金坛市杰瑞尔电器有限公司; 高纯氮(纯度 $\geq 99.999\%$ ) 昆明广瑞达气体有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 漂白紫胶样品的预处理

称取漂白紫胶样品各20 g放入250 mL带冷凝器的圆底烧瓶中, 各加入200 mL质量分数25%氢氧化钠溶液在90 °C搅拌反应30 h。反应停止后各加入饱和氯化钠溶液200 mL进行盐析, 盐析目的是去除大部分的紫胶桐酸(aleuritic acid, Ale), 此为Ale的碱水解制备方法<sup>[23-24]</sup>, 以免Ale单一组分含量过高对其他化合物的检测灵敏度和准确性造成干扰。然后用硅藻土作为过滤介质进行抽滤, 滤液用18%盐酸溶液酸化至弱酸性, 之后离心, 沉淀用水洗至中性, 最后冷冻干燥备用。

#### 1.3.2 液体果蜡样品的预处理

量取各商用液体果蜡100 mL, 其他步骤与1.3.1节保持一致。

#### 1.3.3 HPLC-QTOF-MS分析条件

色谱条件: Zorbax 5 SB-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 柱温30 °C; 进样体积10  $\mu$ L; 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)进行梯度洗脱; 洗脱程序: 0~60 min, 5%~100% A、95%~0% B; 流速1.0 mL/min。

ELSD参数: 雾化器温度60 °C; 蒸发管温度60 °C; 气体流速1.6 L/min(高纯氮)。

质谱条件: 电喷雾电离源, 负离子模式; 喷雾电压为3 500 V; 工作气为氮气, 雾化气压力35 psi; 离子源温度350 °C; 碰撞能量10 eV; 碰撞能量范围 $\pm 1.0$  eV。建立信息关联采集方法结合动态背景扣除, 设置一级质谱质量扫描范围 $m/z$  100~1700, 二级质谱质量扫描范围为 $m/z$  50~1 700, 在每个循环内同时进行10个MS/MS扫描。

#### 1.3.4 质控样本

质控(quality control, QC)主要是为了保证样品检测过程的准确性, 对提取或检测过程中差异较大的样品或代谢物质进行分析判断<sup>[25-26]</sup>。QC样本由不同来源的5组样本目标物等量混合制备而成, 共3个重复, 用来分析样品在相同处理方法下的重复性。在仪器分析过程中, 每5个检测样本加入一个QC样本, 通过对不同QC样本展示分析, 考察整个分析过程的重复性。

#### 1.3.5 数据处理与化学计量学分析

使用Qualitative Analysis B.06.00软件对HPLC-MS

数据进行处理, 之后结合网络数据库和相关文献记载(表1)进行对比, 结合标准品验证, 确定物质结构。化合物确定后, 通过HPLC-ELSD归一法计算相对含量, 最后将处理的数据矩阵导入SIMCA 14.1软件, 进行无监督的主成分分析(principal component analysis, PCA)和有监督的偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)等多元统计分析, 再根据变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)和组间变化的显著性( $P < 0.05$ )进行差异性化合物和共性化合物的筛选<sup>[27-28]</sup>。

表1 文献中组成紫胶树脂单体的已知化合物

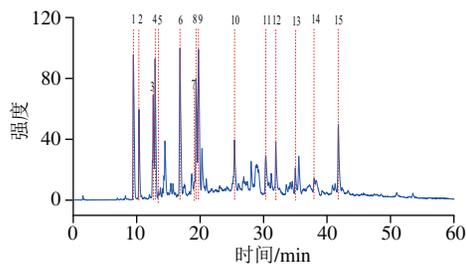
Table 1 Compounds from shellac monomer reported in the literature

序号	缩写	化合物名称	参考文献
1	LJA	紫胶壳脑醛酸 laccijalaric acid	[16-18,30]
2	OLJA	氧化紫胶壳脑醛酸 oxidised laccijalaric acid	[18]
3	JA	壳脑醛酸 jalaric acid	[16-18]
4	OJA	氧化壳脑醛酸 oxidised jalaric acid	[18]
5	JAI	壳脑醛酸异构体 jalaric acid isomer	[18]
6	LLA	紫胶壳脑醇酸 laccilaksholic acid	[16-18]
7	LSA	紫胶壳脑酸 laccishelloic acid	[16-18,29]
8	SA	壳脑酸 shellolic acid	[16-17,19,30]
9	OSA	氧化壳脑酸 oxidised shellolic acid	[18]
10	OEA	氧化表壳脑酸 oxidised epishelloic acid	[18]
11	LA	壳脑醇酸 laksholic acid	[16,18-19,29,30]
12	Ale	紫胶桐酸 aleuritic acid	[18-19,30]
13	OAle	氧化紫胶桐酸 oxidised aleuritic acid	[18]
14	6-ODA	6-氧代十四烷酸 6-oxotetradecanoic acid	[18]
15	BA	布醇酸 butolic acid	[18-19,30]
16	PA	棕榈酸 palmitic acid	[19]
17	9,10-DTA	9,10-二羟基十四烷酸 9,10-dihydroxytetradecanoic acid	[18]
18	16-H-9-A	16-羟基十六烷-9-烯酸 16-hydroxyhexadec-9-enoic acid	[18,30]
19	16-HAA	16-羟基十六烷酸 16-hydroxyhexadecanoic acid	[18]
20	9,10-DDA	9,10-二羟基十六碳二烯酸 9,10-dihydroxyhexadecadienoic acid	[18]
21	9,10-DEA	9,10-二羟基十六碳烯酸 9,10-dihydroxyhexadecenoic acid	[18]
22	9,10-DAA	9,10-二羟基十六烷酸 9,10-dihydroxyhexadecanoic acid	[18]

## 2 结果与分析

### 2.1 漂白紫胶中靶向化合物的确定

从结构看, 漂白紫胶是由种类众多的环状组分和链状组分形成的内酯与交酯; 从组成看, 漂白紫胶是由一系列结构类似化合物组成的复杂混合物, 并且漂白紫胶的结构和组成还受到不同漂白工艺的影响, 这些影响给漂白紫胶的检测带来了极大的不确定性<sup>[29-30]</sup>。因此, 直接以漂白紫胶为靶向化合物进行差异或共性化合物的鉴定分析时难度较大, 尤其靶向化合物的鉴定十分困难。为解决上述问题, 选择组成漂白紫胶单体的链状和环状化合物进行靶向化合物的筛选。由图1可知, 漂白紫胶鉴定的化合物为15种, 其中环状组分为8种, 链状组分为7种, 具体化合物见表2。



图中编号同表2。图2、6同。

图1 LC-QTOF-MS检测样品的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow chromatogram of compounds from bleached shellac samples detected by LC-QTOF-MS

表2 LC-QTOF-MS在目标物中检测到的特征标记化合物

Table 2 Overview of characteristic biomarker compounds detected by LC-QTOF-MS

序号	缩写	标记化合物	时间/min	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	计算分子质量 [M-H] <sup>-</sup>	分子式	$m/z$ MS/MS ES <sup>-</sup>
1	SA*	壳脑酸 shellolic acid	9.471	295.212 6	295.118 7	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	251, 249, 207, 177, 147, 121
2	LA*	壳脑醇酸 laksholic acid	10.363	281.232 0	281.139 4	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	279, 263, 237, 219, 201, 189, 139
3	LAI*	壳脑醇酸异构体 laksholic acid isomer	12.600	281.232 0	281.139 4	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	279, 263, 237, 219, 201, 189, 139
4	SAI*	壳脑酸异构体 shellolic acid isomer	12.895	295.212 6	295.118 7	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	251, 249, 207, 177, 147, 121
5	LSA*	紫胶壳脑酸 laccishellolic acid	13.436	279.124 2	279.123 8	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	235, 217, 187, 173, 103
6	LLA*	紫胶壳脑醇酸 laccilaksholic acid	16.839	265.235 0	265.144 5	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	261, 249, 221, 217, 191, 129, 109
7	LJA*	紫胶壳脑酸 laccijalaric acid	19.077	263.212 9	263.128 9	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	235, 219, 201, 189, 163, 151, 107
8	JA*	壳脑酸 jalaric acid	19.365	279.216 1	279.123 8	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	261, 235, 217, 191, 147, 121, 107
9	Ale <sup>◇</sup>	紫胶酮酸 aleuritic acid	19.744	303.312 9	303.217 7	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	285, 267, 249, 201, 171, 155, 127, 113
10	9,10-DTA <sup>◇</sup>	9,10-二羟基十四烷酸 9,10-dihydroxytetradecanoic acid	25.414	259.282 0	259.368 6	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	241, 223, 201, 183, 171, 157, 143, 127, 113
11	9,10-DEA <sup>◇</sup>	9,10-二羟基十六烷酸 9,10-dihydroxyhexadecanoic acid	30.380	285.132 8	285.207 1	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	267, 235, 217, 171, 143, 127
12	9,10-DAA <sup>◇</sup>	9,10-二羟基十六烷酸 9,10-dihydroxyhexadecanoic acid	31.952	287.316 5	287.222 8	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	269, 251, 211, 171, 143, 127, 113
13	BA <sup>◇</sup>	布醇酸 butolic acid	34.998	243.284 8	243.196 6	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	225, 197, 155, 113, 85
14	16-H-9-A <sup>◇</sup>	16-羟基十六烷-9-烯酸 16-hydroxyhexadec-9-enoic acid	38.310	269.303 8	269.212 2	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	251, 223, 217, 155, 121, 113
15	16-HAA <sup>◇</sup>	16-羟基十六烷酸 16-hydroxyhexadecanoic acid	41.789	271.319 7	271.227 9	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	253, 225, 155, 141, 127, 113

注: ★. 倍半萜烯酸; ◇. 脂肪酸。

## 2.2 漂白紫胶样品的HPLC-ELSD定量检测

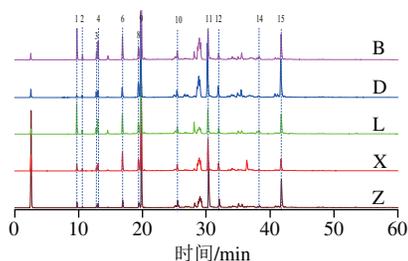


图2 不同组漂白紫胶的HPLC-ELSD定量分析图

Fig. 2 Quantitative analysis of target compounds from different groups of bleached shellac by HPLC-ELSD

在检测中发现, 由于不同结构单体化合物电离响应性的差异, 目标物的质谱检测器和ELSD的响应强度存在明显区别<sup>[31]</sup>。依据2种检测器的响应差异, 进一步将在HPLC-ELSD中响应信号不明显的LSA、LJA和BA去掉, 从而将漂白紫胶靶向化合物的筛选范围限定在12种化合物中(图2)。考虑到不同来源的漂白紫胶分析是以寻找共性靶向化合物为目的, 因此, 为了消除质谱检测时电离响应性差异所带来的离子丰度差异, 获得化合物更加真实的含量数据, 在以LC-QTOF-MS中化合物的分子质量和碎片完成靶向化合物的鉴定后, 选择以HPLC-ELSD的方法对漂白紫胶单体的化合物组成进行峰面积归一法的定量分析, 以靶向化合物含量进行代谢组学的聚类 and 差异性分析。

## 2.3 靶向代谢组学模型的建立和分析

## 2.3.1 聚类分析

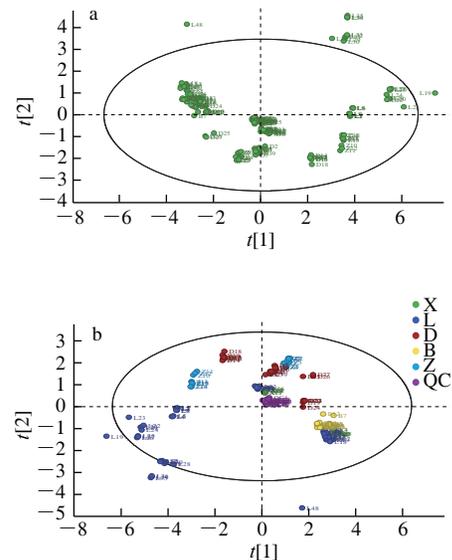


图3 靶向化合物的无监督PCA (a)和有监督PLS-DA (b)得分图

Fig. 3 Score plots of PCA (a) and PLS-DA (b) of target compounds

为进一步明确不同来源漂白紫胶在单体组成上的聚类特征, 首先对样本进行无监督模式下的PCA。如图3a所示, 6个PC的相关性仅达到95.9%, PC1、PC2、PC3的占比为87.8%。这说明各个来源组的样本较为分散, 聚类特征不明显。PCA虽然能够有效地提取主要信息, 但是对于相关性较小的变量不敏感, 而PLS-DA可以使组间区分最大化, 有利于寻找差异性化合物。在无监督PCA基础上进行有监督模式下的PLS-DA, 由图3b可知, QC样本聚类明显, 表明实验操作及仪器稳定, 数据可靠。L组的样品相对分散, B组的样品聚类明显。说明PLS-DA模型解释度较好, 相比于PCA模型效果更好。且PLS-DA模型的 $R_x^2$ 为0.999,  $R_y^2$ 为0.589,  $Q^2$ 为0.54, 3个参数值均大于0.5, 说明模型建立合理有效<sup>[32]</sup>。

2.3.2 果蜡保鲜剂中紫胶树脂的靶向代谢组学鉴定模型

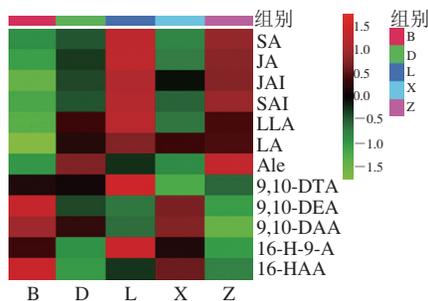


图4 靶向化合物热图

Fig. 4 Heatmap of target compounds

为了直观呈现12种靶向化合物在不同5个来源组漂白紫胶中的分布情况，将化合物含量绘制热图（颜色编码刻度表示每个化合物的相对含量：绿色为含量低，红色为含量高）。如图4所示，5个来源组漂白紫胶中单体化合物的含量及分布均有差异。B组漂白紫胶中的16-HAA、9,10-DAA、9,10-DEA含量较为丰富；D组漂白紫胶中的Ale、9,10-DAA、LA、LLA、9,10-DTA的含量相对丰富；L组漂白紫胶中的9,10-DTA、SA、JA、JAI、SAI、LLA、16-H-9-A含量相对丰富；X组漂白紫胶中的LA、9,10-DEA、9,10-DAA、JAI、16-HAA、16-H-9-A的含量相对丰富；Z组漂白紫胶中的Ale、SAI、SA、JA、JAI、LLA、LA的含量相对丰富。

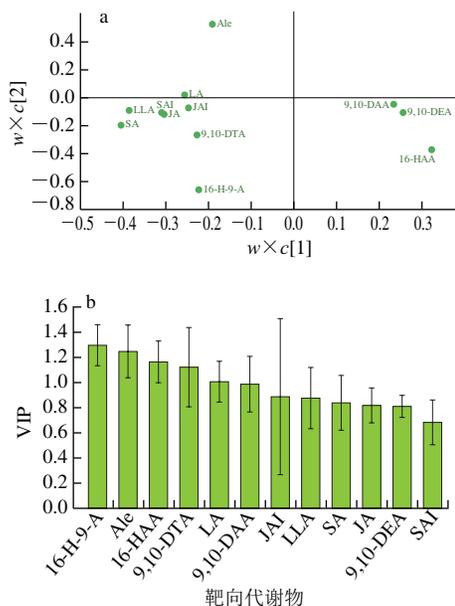


图5 靶向代谢物的PLS-DA载荷图(a)和VIP值(b)

Fig. 5 Loading plot (a) and VIP values (b) of PLS-DA for target compounds

液体果蜡是以漂白紫胶为选择性配方之一的商业化产品，一般不以漂白紫胶原料来源对产品做有效区分。换言之，液体果蜡中的漂白紫胶原料可能来源于任意一

个组。因此，为增加定性检测方法的可靠性，必须要求在靶向化合物中所筛选出的标志性化合物是5个组的共性化合物，且含量差异较小。热图虽然可以直观地显示各种化合物的含量水平与分布情况，但哪些化合物可作为不同组漂白紫胶的共性化合物，并可用于漂白紫胶的定性分析并不能直接给出结论。为此，采用代谢组学差异性分析的方法，进一步对不同靶向化合物在5个组漂白紫胶中的代表性进行分析。

如图5a所示，化合物离中心点越近，说明该化合物在5个组中的共性越强，离中心点越远，则表示该化合物在5个组中的差异性越大。显然，16-H-9-A、Ale、16-HAA、9,10-DTA、LA是偏离中心点较远的化合物，说明其在5个组中有较大的差异。为量化评价这种差异性，通过化合物（变量）的VIP值对相关性进行排序，结果如图5b所示。通常认为VIP值大于1的化合物，可作为差异性化合物。相反，VIP值小于1的化合物，则可作为共性化合物<sup>[33-34]</sup>。因此，漂白紫胶的共性化合物（标志性化合物）有7种，按照相关性由大到小排序为SAI、9,10-DEA、JA、SA、LLA、JAI、9,10-DAA；差异性化合物共5种，按照差异性由大到小的顺序为16-H-9-A、Ale、16-HAA、9,10-DTA、LA。对比上述7种共性化合物后发现，仅有9,10-DEA和9,10-DAA为链状组分，其余5种均为环状萜烯。而在5种差异性化合物中，仅有LA为环状组分，其余4种均为链状脂肪酸。在化合物本身对紫胶树脂的标识性方面，脂肪酸具有更加广泛的来源和丰富的结构，因此，环状萜烯酸相对特殊的结构和组成更加适合作为漂白紫胶的特征标识物用在液体果蜡中漂白紫胶的鉴定分析中。

2.4 商业化液体果蜡中漂白紫胶的鉴定分析

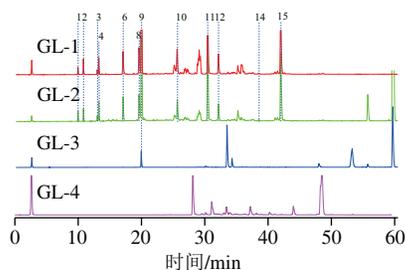


图6 HPLC-ELSD法检测商业化液体果蜡产品的色谱图

Fig. 6 Chromatograms of target compounds in commercial liquid fruit wax products detected by HPLC-ELSD

以上述筛选出的标志性化合物为依据、从市场随机购买不同品牌并在产品说明书中标明含有漂白紫胶的液体果蜡商业产品（GL-2~GL-4）为检测样品、实验室自制的样品（GL-1）作为对照品，按照1.3.2节方法进行样品处理后进行HPLC-ELSD检测，结果如图6所示。在本研究所选的3种市售液体果蜡产品中，GL-2检出了本实

鉴定12种靶向化合物,且与对照品(GL-1)的鉴定结果高度一致。从GL-4样品的色谱图中看出,该液体果蜡中不含有漂白紫胶中的靶向化合物,可基本判断该液体果蜡产品中不含有漂白紫胶。在GL-3样品中未检测到漂白紫胶树脂的共性化合物,但从色谱图中看出GL-3样品中检测出了Ale组分,而Ale组分是本研究得出的差异性化合物之一,目前,依据公开的文献资料,在除紫胶以外的其他物质中,未见发现Ale的研究报道,因此从理论上讲,Ale可作为漂白紫胶的标识性化合物。但根据上述代谢组学的鉴定结果,仅以Ale作为液体果蜡中漂白紫胶的标识性化合物时不仅含量波动大,影响其检测准确性;且Ale作为一种多羟基脂肪酸类的化合物已是成熟的商业化产品,可通过在配方中添加的方式达到规避检测的目的。因此,不能仅凭借GL-3样品中含有Ale就判定该产品中含有漂白紫胶,这也是本研究筛选共性化合物的意义所在,只有同时含有7种共性化合物才可作为漂白紫胶定性的依据。因此,GL-3、GL-4样品中不含漂白紫胶,GL-2中含有漂白紫胶。综上所述,本研究建立的标识性化合物筛选方法,对果蔬保鲜液体果蜡中漂白紫胶的定性分析具有较高的可靠性。

### 3 结论

针对液体果蜡中是否添加漂白紫胶的问题,借鉴代谢组学的方法,采用基于LC-QTOF-MS结合ELSD的检测技术,通过收集不同来源且具有代表性的漂白紫胶开展系统研究。由无监督的PCA和有监督的PLS-DA多元统计分析,鉴定出12种已知代表性的化合物。结合化合物VIP值大小,分为7种共性化合物(SAI、9,10-DEA、JA、SA、LLA、JAI、9,10-DAA)和5种差异性化合物(16-H-9-A、Ale、16-HAA、9,10-DTA、LA)。为增加检测方法的可靠性,以共性化合物为生物标识物,在市售的商业化液体果蜡产品中验证了该方法的可行性。结果表明,本研究可为液体果蜡中是否含有漂白紫胶的鉴定分析提供新思路 and 科学依据。

### 参考文献:

- [1] MA J J, ZHOU Z Q, LI K, et al. A gas-permeation controllable packaging membrane with porous microspheres as gas "switches" for efficient preservation of litchi[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69: 10281-10291. DOI:10.1021/acs.jafc.1c02293.
- [2] MA J J, ZHOU Z Q, LI K, et al. Novel edible coating based on shellac and tannic acid for prolonging postharvest shelf life and improving overall quality of mango[J]. Food Chemistry, 2021, 354: 129510. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129510.
- [3] NA J, ZHENG D H, KIM J, et al. Coating of Pt-loaded mesoporous silica layers on ceramics scaffolds for practical preservation system for greengrocery[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(35): 32084-32089. DOI:10.1021/acsami.9b07011.
- [4] PATEL A R, REMIJN C, CABERO A, et al. Novel all-natural microcapsules from gelatin and shellac for biorelated applications[J]. Advanced Functional Materials, 2013, 23(37): 4710-4718. DOI:10.1002/adfm.201300320.
- [5] PHAECHAMUD T, SENARAT S, PUYATHORN N, et al. Solvent exchange and drug release characteristics of doxycycline hyclate-loaded bleached shellac *in situ*-forming gel and-microparticle[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 135(18): 1261-1272. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.098.
- [6] SAENGSDOD S, LIMMATVAPIRAT S, LUANGTANA-ANAN M. Optimum condition of conventional bleaching process for bleached shellac[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(8): e13291. DOI:10.1111/jfpe.13291.
- [7] LI K, ZHENG H, ZHANG H, et al. A novel approach to the fabrication of bleached shellac by a totally chlorine-free (TCF) bleaching method[J]. RSC Advances, 2016, 6(60): 55618-55625. DOI:10.1039/C6RA09132F.
- [8] MUHAMMAD D R A, SEDAGHAT D A, GUPTA V, et al. Stability and functionality of xanthan gum-shellac nanoparticles for the encapsulation of cinnamon bark extract[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105377-105383. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105377.
- [9] 李坤, 郑华, 张雯雯, 等. 响应面法优化紫胶全无氯漂白工艺及其产物性能[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 41-51. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201622007.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB/T 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 112-113.
- [11] General Standard for Food Additives, Codex Stan 192-1995, Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization[S]. Codex Alimentarius International Food Standards.
- [12] ZHOU Z Q, MA J J, LI K, et al. A plant leaf-mimetic membrane with controllable gas permeation for efficient preservation of perishable products[J]. ACS Nano, 2021, 15: 8742-8752. DOI:10.1021/acsnano.1c00997.
- [13] LI K, LUO Q M, XU J, et al. A novel freeze-drying-free strategy to fabricate a biobased tough aerogel for separation of oil/water mixtures[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(12): 3779-3785. DOI:10.1021/acs.jafc.9b07629.
- [14] SABERI B, CHOCKCHAIASAWASDEE S, GOLDING J B, et al. Development of biocomposite films incorporated with different amounts of shellac, emulsifier, and surfactant[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 72: 174-184. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.05.042.
- [15] VANDENABEELE P, WEHLING B, MOENS L, et al. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 407(1/2): 261-274. DOI:10.1016/S0003-2670(99)00827-2.
- [16] WANG L L, ISHIDA Y, OHTANI H, et al. Characterization of natural resin shellac by reactive pyrolysis-gas chromatography in the presence of organic Alkali[J]. Analytical Chemistry, 1999, 71(7): 1316-1322. DOI:10.1021/ac981049e.
- [17] SUTHERLAND K, DELRÍO J C. Characterisation and discrimination of various types of lac resin using gas chromatography mass spectrometry techniques with quaternary ammonium reagents[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1338: 149-163. DOI:10.1016/j.chroma.2014.02.063.
- [18] TAMBURINI D, DYER J, BONADUCE I. The characterisation of shellac resin by flow injection and liquid chromatography coupled with electrospray ionisation and mass spectrometry[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 14784. DOI:10.1038/s41598-017-14907-7.

- [19] COELHO C, NANABALA R, MÉNAGER M, et al. Molecular changes during natural biopolymer ageing: the case of shellac[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2012, 97(6): 936-940. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2012.03.024.
- [20] JIN Y, LI D, AI M, et al. Correlation between volatile profiles and microbial communities: a metabonomic approach to study Jiang-flavor liquor *Daqu*[J]. *Food Research International*, 2019, 121: 422-432. DOI:10.1016/j.foodres.2019.03.021.
- [21] GOU X J, FENG Q, FAN L, et al. Serum and liver tissue metabonomic study on fatty liver in rats induced by high-fat diet and intervention effects of traditional Chinese medicine Qushi Huayu decoction[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 2017: 6242697. DOI:10.1155/2017/6242697.
- [22] SU G, WANG H, BAI J, et al. A metabonomics approach to drug toxicology in liver disease and its application in traditional Chinese medicine[J]. *Current Drug Metabolism*, 2019, 20(4): 292-300. DOI:10.2174/1389200220666181231124439.
- [23] NAGAPPAYYA S K, GAIKAR V G. Extraction of aleuritic acid from seedlac and purification by reactive adsorption on functionalized polymers[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, 49(14): 6547-6553. DOI:10.1021/ie902061e.
- [24] 刘世平, 张弘, 周梅村, 等. 微波皂化法制备紫胶桐酸[J]. *食品科学*, 2011, 32(14): 79-84.
- [25] 彭琳秀, 谢彤, 单进军. 基于气相色谱-质谱联用的抗结核药致肾损伤代谢组学及谷胱甘肽治疗作用研究[J]. *分析化学*, 2020, 48(9): 1160-1168. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.191579.
- [26] 谢冰, 周帆, 章宸, 等. 基于植物代谢组学的新疆一枝蒿产地标志物多维度研究[J]. *分析化学*, 2020, 48(6):733-743. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.191710.
- [27] 任繁栋, 丁筱雪, 蔡芳, 等. 基于超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术研究冠心病及冠心病合并2型糖尿病患者代谢特征[J]. *分析化学*, 2020, 48(1):49-56. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.191618.
- [28] 李维薇, 汪受传, 单进军, 等. 超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱质谱联用技术用于胆道闭锁患儿尿液代谢组学研究[J]. *分析化学*, 2019, 47(7): 1082-1089. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.181500.
- [29] LU J, WANG H Y, HUANG J, et al. Sesquiterpene acids from Shellac and their bioactivities evaluation[J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 64-70. DOI:10.1016/j.fitote.2014.05.014.
- [30] COLOMBINI M P, BONADUCE I, GAUTIER G. Molecular pattern recognition of fresh and aged shellac[J]. *Chromatographia*, 2003, 58(5/6): 357-364. DOI:10.1365/s10337-003-0037-3.
- [31] BONFIGLIO R, KING R C, OLAH T V, et al. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999, 13(12): 1175-1185. DOI:10.1002/(SICI)1097-0231(19990630)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0.
- [32] 邵坚, 吴祥明, 李谕光, 等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap代谢组学技术的不同产地黄连组分比较研究[J]. *中药材*, 2020, 43(2): 309-313. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2020.02.010.
- [33] JANDRI Z, ISLAM M, SINGH D K, et al. Authentication of Indian citrus fruit/fruit juices by untargeted and targeted metabolomics[J]. *Food Control*, 2017, 72: 181-188. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.10.044.
- [34] XIE W P, ZHANG W P, REN J, et al. Metabonomics indicates inhibition of fatty acid synthesis,  $\beta$ -oxidation, and tricarboxylic acid cycle in triclocarban-induced cardiac metabolic alterations in male mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(6): 1533-1542. DOI:10.1021/acs.jafc.7b05220.