DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251111009
引用格式: 吴小勇, 李密, 张荣, 等. 基于非靶向代谢组学的外源合成冰乙酸(乙醇发酵法)配制食醋的鉴别及特征标志物分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 88–98.
WU XY, LI M, ZHANG R, *et al*. Identification and characteristic biomarker analysis of vinegar prepared with exogenous synthetic glacial acetic acid (ethanol fermentation method) based on untargeted metabolomics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 88–98. (in Chinese with English abstract).

基于非靶向代谢组学的外源合成冰乙酸(乙醇发酵法)配制食醋的鉴别及特征标志物分析

吴小勇[1], 李　密[2*], 张　荣[2], 陶桂松[1], 贾　玮[2*]
(1. 咸阳市食品药品检验检测中心, 咸阳　712021; 2. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 西安　710021)

摘　要: 目的　建立基于非靶向代谢组学技术方法, 分析酿造食醋中勾兑冰乙酸(乙醇发酵法)后的代谢物差异, 筛选特征标志物用于掺假鉴别。**方法**　以宁化府工艺老陈醋为研究对象, 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap tandem mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap MS/MS)对不同勾兑程度食醋样品(酸度 6.0%~8.0%)的代谢物成分进行采集, 结合主成分分析和偏最小二乘判别分析等多元统计分析方法筛选并鉴定差异代谢产物。**结果**　共筛选出 5 个具有显著性差异的标志物, 包括油酸酰胺、N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯和单棕榈酸甘油。当油酸酰胺含量明显低于 479.99 μg/kg 以及 N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯和单棕榈酸甘油含量高于传统酿造食醋水平(分别为 0.92、0.89、10.82 μg/kg 和 56.56 mg/kg)时, 可有效判别食醋是否掺假。油酸酰胺含量随冰乙酸浓度升高呈明显下降趋势, 在酸度为 8.0%的样品中含量为 39.40 μg/kg。N-苄基-亚油酰胺(9.50 μg/kg)在酸度为 7.0%时达到峰值, 柠檬酸三乙酯(4.22 μg/kg)、单棕榈酸甘油(129.26 mg/kg)与己二酸二丁酯(27.66 μg/kg)含量在酸度 8.0%样品中分别达到传统食醋的 4.75、2.29 和 2.56 倍。**结论**　本研究建立的基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 的非靶向代谢组学方法, 筛选出的显著性差异标志物, 为食醋真实性鉴定提供了一种新型的技术手段, 保障食醋产品质量及保护消费者健康权益。

关键词: 醋; 乙醇发酵法; 冰乙酸; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱法; 代谢组学; 鉴别

Identification and characteristic biomarker analysis of vinegar prepared with exogenous synthetic glacial acetic acid (ethanol fermentation method) based on untargeted metabolomics

WU Xiao-Yong[1], LI Mi[2*], ZHANG Rong[2], TAO Gui-Song[1], JIA Wei[2*]

收稿日期: 2025-11-11
基金项目: 陕西省市场监督管理局科技计划项目(2023KY18)
第一作者: 吴小勇(1977—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: 3842454171@qq.com
***通信作者:** 李密(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: mimisivan@163.com
贾玮(1986—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: jiawei@sust.edu.cn

(1. *Xianyang Food and Drug Inspection and Testing Center*, *Xianyang* 712021, *China*; 2. *School of Food Science and Engineering*, *Shaanxi University of Science and Technology*, *Xi'an* 710021, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a technical method based on untargeted metabolomics, analyze the differences in metabolites after blending glacial acetic acid (ethanol fermentation method) in brewed vinegar, and screen characteristic markers for adulteration identification. **Methods** Taking Ninghuafu traditional aged vinegar as the research object, ultra performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap tandem mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap MS/MS) was used to collect metabolite components of vinegar samples with different dilution degrees (acidity ranging from 6.0%–8.0%). Combined with multivariate statistical analysis methods such as principal component analysis and partial least squares discriminant analysis, differential metabolites were screened and identified. **Results** A total of 5 markers with significantly differences were identified, including oleamide, N-benzyl-linoleamide, triethylcitrate, dibutyladipate and monopalmitin. When the content of oleamide was significantly lower than 479.99 μg/kg, and the content of N-benzyl-linoleamide, triethylcitrate, dibutyladipate and monopalmitin were higher than the levels in traditional brewed vinegar (0.92, 0.89, 10.82 μg/kg and 56.56 mg/kg, respectively), these compounds could effectively distinguish whether the vinegar had been adulterated. The content of oleamide showed a significant downward trend with increasing glacial acetic acid concentration, with a content of 39.40 μg/kg in samples with an acidity of 8.0%. N-benzyl-linoleamide (9.50 μg/kg) reached peaks in the sample groups 7.0% acidity. Triethylcitrate (4.22 μg/kg), monopalmitin (129.26 mg/kg) and dibutyladipate (27.66 μg/kg) in the 8.0% acidity sample reached 4.75, 2.29 and 2.56 times that of traditional vinegar. **Conclusion** The untargeted metabolomics method based on UPLC-Q-Orbitrap MS/MS established in this study screens out significantly differential biomarkers, which provides a novel technical approach for the authenticity identification of vinegar, and guarantees the quality of vinegar products as well as protects the health rights and interests of consumers.

KEY WORDS: vinegar; ethanol fermentation method; glacial acetic acid; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap tandem mass spectrometry; metabolomics; identification

0　引　言

食醋是兼具营养和保健功能的传统调味品, 生产主要依赖固态和液态发酵工艺[1–2]。在亚洲国家, 固态发酵占据主导地位, 用于生产山西陈年醋、黑醋等特色产品[3]。传统食醋通常以高粱、豌豆和麦麸等为原料发酵而成[4–5], 先后经历酒精发酵(酵母将糖转化为乙醇)和醋酸发酵(乙醇转化为醋酸)两个阶段[6–7]。食醋发酵过程中产生的氨基酸、糖类、醇类、有机酸和维生素等丰富代谢物赋予其抗氧化、降血压及抗菌等多种生理活性[8–9]。此外, 食醋还具有助消化、刺激食欲等益处[10–11]。

随着食醋产业规模持续扩大, 市场竞争加剧[5]。部分商家为牟取利益, 利用配制醋冒充传统酿造食醋[12]。配制醋(又称合成醋)的生产无需复杂发酵过程, 以酿造醋为基底(不得低于 50%), 添加外源合成冰乙酸(如乙醇发酵法)混合调配而成, 以快速提高总酸含量以满足标准要求(GB 2719—2018《食品安全国家标准 食醋》, 总酸≥3.5 g/100 mL)[13–14]。尽管乙醇发酵法制备的冰乙酸与天然发酵产生的乙酸化学本质一致, 仅来源不同, 但配制醋与传统酿造醋在原料成本、生产工艺、品质价值上差异显著。《市场监管总局关于加强酱油和食醋质量安全监督管理的公告》要求食醋生产应当具有完整的发酵酿造工艺, 不得使用冰乙酸等原料配制生产食醋。由于普通消费者难以辨别配制食醋, 部分商家借此以次充好, 严重损害消费者权益[3]。因此开发精准检测酿造食醋中乙醇发酵法冰乙酸的方法, 是加强食醋质量安全监管、保障消费者权益的关键技术支撑。

现行食醋质量标准检测主要依赖 GB 18187—2000《酿造食醋》中总酸、不挥发酸和可溶性无盐固形物, 以及挥发性组分、有机酸、醇类、氨基酸、游离矿酸等指标, 但这些方法难以有效识别乙醇发酵法冰乙酸的掺入[5]。因此, 配制食醋鉴别技术研究成为调味品领域的热点[15]。现有检测技术主要包括稳定同位素技术、气相色谱法、同步荧光法和核磁共振法等[13]。例如, HSIEH 等[16]利用点特异性天然同位素分馏核磁共振技术测定米醋、糖蜜酒精醋和合成醋的 $(D/H)_{CH3}$ 值, 分别为 98.50、108.46 和 131.58 ppm, 发现该值随着糖蜜酒精醋或合成醋的加入而线性升高, 可量化配制米醋的勾兑程度。郭洁丽等[17]利用同步荧光法在激发波长为 250~550 nm、波长间隔为 70 nm 处收集掺杂食用冰乙酸的山西老陈醋同步荧光信号, 相对偏差在±5%之间, 预测最低掺假量为 10%。FANG 等[4]

通过气相色谱-同位素比值质谱法建立了米醋中稳定碳同位素比率的测定方法，其中 $\delta^{13}C_{\text{醋酸}}$(–26.97‰至–25.38‰)和 $\Delta\delta^{13}C$ (0.61%至 2.27‰)的置信区间为 95%，可用于鉴定掺假 10%以上合成乙酸的米醋产品。但这些技术依赖于特定目标(如同位素比值、特定光谱信号)的检测，当掺假物与天然产物化学本质高度相似时，其区分能力显著受限[18–19]。近年来，基于质谱的非靶向代谢组学为食品掺假检测提供了全新视角。非靶向代谢组学通过对生物样本中小分子代谢物进行高通量、全局性的谱图分析，揭示掺假引起的整体变化规律[20–21]。超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap tandem mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap MS/MS)因其高灵敏度、高分辨率以及精确分子量测定的优势，为筛选特异性生物标志物提供强大工具[22–24]。贾莹莹等[25]基于超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)分析发现山西陈醋与恒顺香醋在有机杂环类化合物和生物碱及其衍生物的构成上存在显著性差异。杨晓璇[26]基于 UPLC-MS/MS 结合多元统计分析鉴定出不同食醋之间的 7 种非挥发性差异代谢物，为食醋的风味研究和品质评价等提供依据。但目前尚缺乏利用代谢组学技术分析掺入冰乙酸前后食醋整体代谢差异，并据此筛选标志物用于配制食醋鉴别的研究。本研究以宁化府工艺老陈醋为对象，建立一种基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 的非靶向代谢组学方法，筛选乙醇发酵法冰乙酸配制食醋中的特征性差异标志物，旨在为市场监管部门和检测机构提供一种新型的技术手段，保障食醋产品真实性与消费者健康权益。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

同一批次宁化府工艺酿造的老陈醋购自当地超市，样品常温避光保存。经测定所有食醋样品的酸度为 6.0%。

甲酸(formic acid, FA, 纯度≥95%)、甲酸铵(纯度≥99%)(美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲醇、乙腈(acetonitrile, ACN)(纯度≥95%, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 乙醇发酵法冰乙酸[纯度≥99%, 食品级, 广州康本生物科技公司(中国广东)]; 油酸酰胺(纯度≥70%)、N-苄基-亚油酰胺(纯度≥98%)、柠檬酸三乙酯(纯度≥99%)、单棕榈酸甘油(纯度≥95%)、己二酸二丁酯(纯度≥98%)标准物质(上海泰坦科技股份有限公司); 超纯水来自 Milli-Q 净水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 仪器与设备

UPLC-Q-Orbitrap MS/MS、Hypersil Gold C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BenchMixer™ XL 多管涡旋混合仪(美国 Benchmark 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司); Centrifuge5430R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

准确量取 1.0 mL(精确到 0.01 mL)酸度 6.0%的食醋样品置于离心管中，分别加入 0、5、10、15、20 μL 乙醇发酵法冰乙酸，参照 GB/T 12456—2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》，采用 pH 计电位滴定法测定总酸，制备酸度 6.0%、6.5%、7.0%、7.5%和 8.0%的食醋-冰乙酸样品(分别标记为 VG、VGE1、VGE2、VGE3 和 VGE4 组)。充分涡旋混匀后，在 4 °C 下以 9000×*g* 的速度离心 10 min。经 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜(millipore bedford, MA)过滤至进样瓶中。从各组待测液中取等体积样品混合于进样瓶中制备质控样品(quality control, QC)，用于检测仪器的灵敏度和稳定性。

1.3.2 色谱质谱条件

(1)色谱条件

流动相: A 相为超纯水溶液(含 0.1% FA 和 4 mmol/L 甲酸铵); B 相为 ACN(含 0.1% FA 和 4 mmol/L 甲酸铵); 样品进样体积 5 μL; 体积流量为 0.3 mL/min。梯度洗脱条件设置如下: 0~1 min, 5% B; 1~7 min, 5%~60% B; 7~9 min, 60%~85% B; 9~14 min; 85%~100% B; 14~17 min, 100% B; 17~20 min, 100%~5% B。柱温设置为 35 °C。为确保数据的准确性与重现性，每个样品重复进样 6 次。

(2)质谱条件

离子源: 加热电喷雾离子源, 正离子模式; 扫描模式: 全扫描/数据依赖性质谱扫描模式; 质量扫描范围 *m*/*z* 100~1000; 一级和二级质谱分辨率分别为 70000 FWHM 和 35000 FWHM; 自动增益控制(automatic gain control, AGC)设置为 1.0×10^6; 喷雾电压为 3.0 kV; 毛细管温度设定为 350 °C; 最大注入时间为 120 ms; 动态背景扣除为 10.0 s; 碰撞能量(collision energy, CE)分别为 17.5、35.0 和 52.5 eV。

1.4 数据处理

原始质谱数据使用 MSConvertGUI version 3.0.10730.0 转换为.mzML 格式，导入 MS-DIAL version 4.24 软件进行预处理，使用电喷雾电离(+)-MS/MS 模式谱库，包含 16481 个独特化合物和 324191 条记录[采用 NIST MS 格式(NIST MSP ASCII)文件]。并在 mzCloud、ChemSpider、ChemicalBook、PubChem 和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库中检索化合物信息，对所有代谢物进行识别[27–28]。利用 Mass Frontier version 8.0 提供的化合物碎片图谱和分子

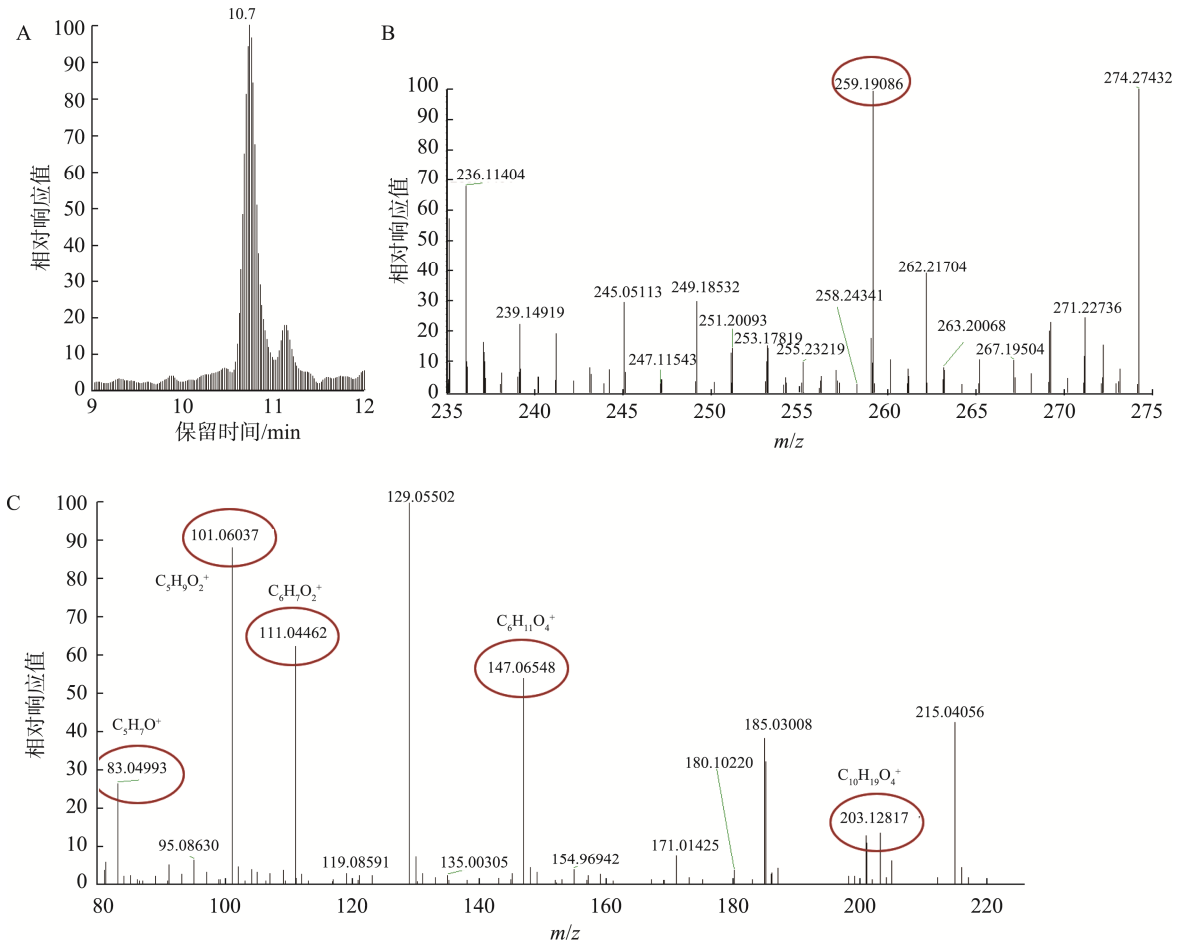
式等信息，排除质量偏差大于 5 ppm 的代谢物。使用 MetaboAnalyst 6.0 对原始数据归一化处理后进行统计学分析，并建立预测模型。

2　结果与分析

2.1　勾兑外源合成冰乙酸食醋中代谢物的注释和鉴定

采用 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 在正离子模式下对不同酸度食醋-冰乙酸样本的代谢物数据进行采集，以揭示掺入外源合成冰乙酸(乙醇发酵法)后代谢物的动态变化。原始 MS 数据转换为标准化的数据格式(.mzML)后导入 MS-DIAL 平台进行数据处理。在 MS-DIAL 平台完成峰值检测、MS^2Dec 提取数据、峰识别、样品间的峰对齐和同位素追踪等步骤后，最终生成包含化合物名称、保留时间(retention time, RT)、质荷比(m/z)、分子式及峰面积等信息的代谢物转换列表[29–30]。为提升鉴定可靠性，对候选代谢物进一步在 ChemSpider、ChemicalBook、PubChem 和 KEGG 等代谢组学参考数据库中进行化学特征比对确认[27]。利用 Mass Frontier 8.0 预测代谢物碎裂路径，并通过其碎裂数据库对碎片离子结构归属，有效消除同分异构体和立体异构体的复杂性，从而实现代谢物的高置信度鉴定[31–32]。随后对归一化数据进行统计学分析并建立预测模型，筛选用于区分传统酿造食醋(VG)和配制食醋(VGE1~VGE4)的特征化合物。

在正离子模式下，对食醋-冰乙酸样品中代谢物成分进行测定，获得 2753 个离子色谱峰峰。经数据库注释，获得 2404 个高置信度代谢物结构。以己二酸二丁酯($C_{14}H_{26}O_4$，m/z 259.19039)为例，样品中己二酸二丁酯与商业标记标准物的 MS/MS 谱图进行了比较，完成己二酸二丁酯的鉴定和验证(图 1)。食醋-冰乙酸样品中己二酸二丁酯色谱峰分离效果良好，响应强度较高，满足设定的标准，质谱信号稳定性优异。酸度为 8.0%食醋样品(VGE4 组)中己二酸二丁酯的 RT 为 10.7 min，样品中检测出实际 m/z 为 259.19086，质量偏差小于 5 ppm，确保其存在己二酸二丁酯(图 1A 和图 1B)。深入解析己二酸二丁酯在$[M+H]^+$



注：A. 一级色谱图；B. 一级质谱图；C. 二级质谱图。

图 1　己二酸二丁酯的色谱和质谱图

Fig.1　Chromatograms and mass spectra of dibutyladipate

模式下碎裂后的特征裂解规律，发现其二级质谱(MS/MS)碎裂机制主要涉及电荷引发的反应(*α*、*i* 断裂)和重排反应(rH_R、rH_B 与 rH_C)等，匹配到 *m/z* 83.04914 ($C_5H_7O^+$)、*m/z* 101.05971 ($C_5H_9O_2^+$)、*m/z* 111.04406 ($C_6H_7O_2^+$)、*m/z* 147.06519 ($C_6H_{11}O_4^+$)和 *m/z* 203.12779 ($C_{10}H_{19}O_4^+$)等理论特征碎片离子，样品中检测到的这些碎片离子质量偏差小于 5 ppm(图 1C 和图 2)。这些化合物的碎裂片段与标准品的 MS/MS 谱图片段高度一致，进一步验证了食醋-冰乙酸样品中实验 MS/MS 光谱中候选分子 *m/z* 259.19039 是代谢产物己二酸二丁酯，证实分析系统稳定性满足代谢组学要求。

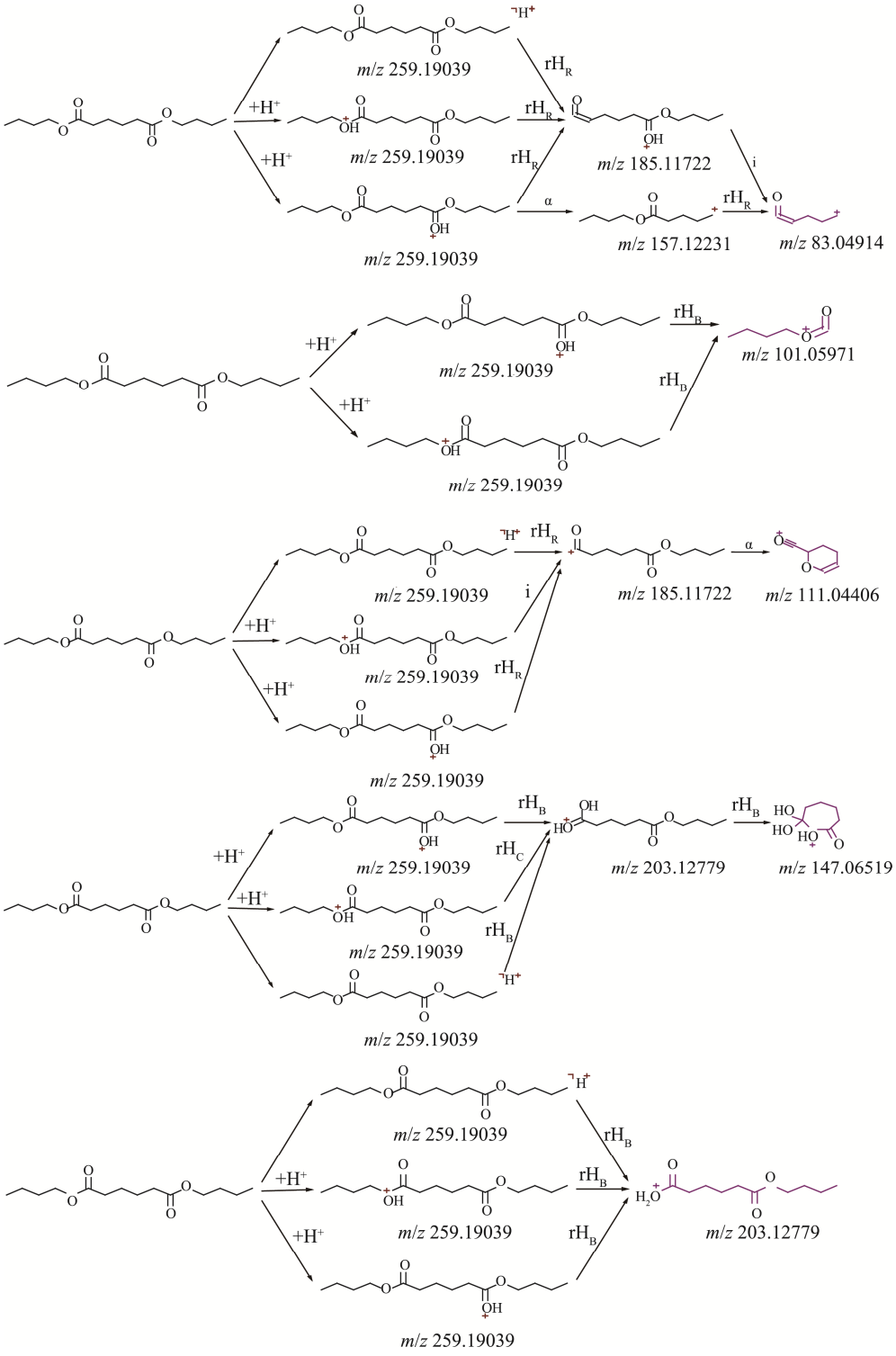


图 2 己二酸二丁酯的质谱破碎路径

Fig.2 Mass spectrometry fragmentation pathway of dibutyladipate

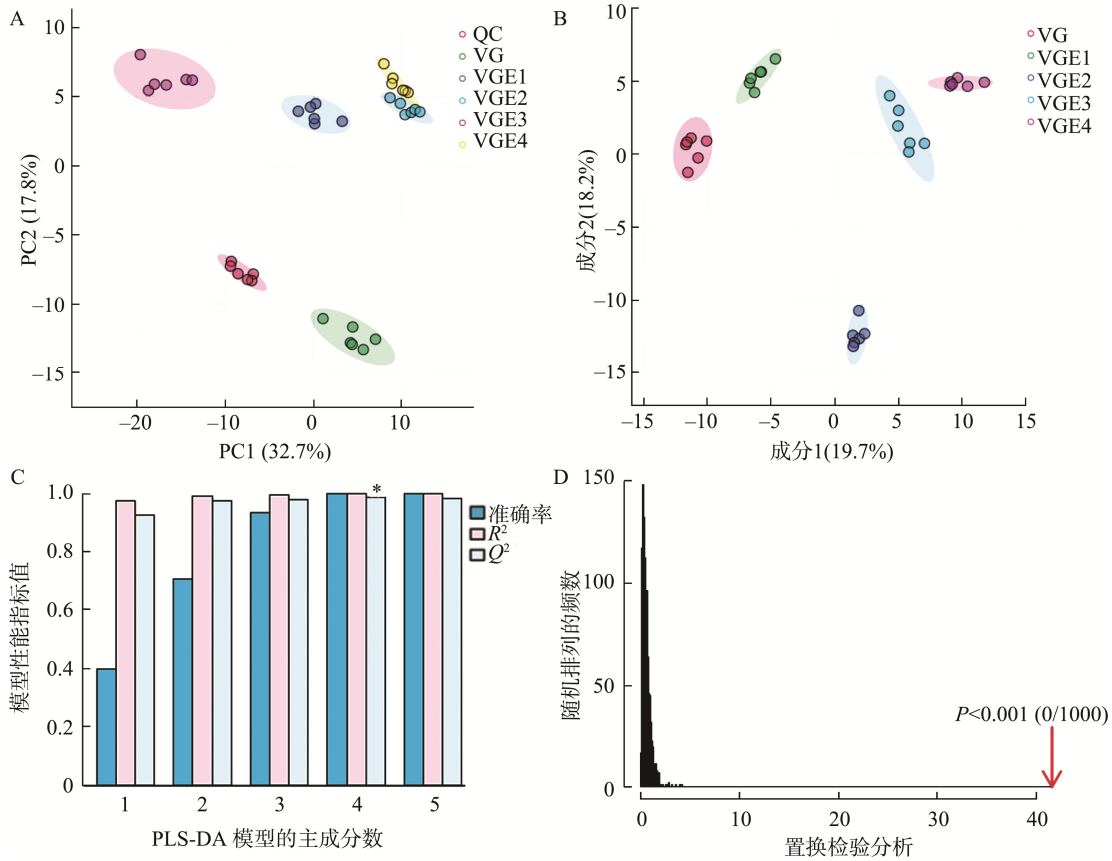
2.2　高通量代谢组学数据的化学计量学分析

为了降低数据维度并揭示样本间差异，首先采用主成分分析(principal component analysis, PCA)观察食醋-冰乙酸样品聚类和分布趋势。PCA 得分图如图 3A 所示，PC1 和 PC2 分别解释了总方差的 32.7%和 17.8%，传统酿造食醋样本和配制食醋样本区分明显，表明掺入冰乙酸导致食醋代谢物组成发生显著变化。此外，PCA 模型中 QC 样本聚类效果良好，表明 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 分析系统具有良好的信号稳定性和可靠性[22]。

为进一步分析不同酸度食醋-冰乙酸样品的质量标识差异物，采用偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)对食醋-冰乙酸样品进行差异性分析[23]。结果显示(图 3B)，不同酸度的食醋-冰乙酸样本聚类明显，表明与不同浓度冰乙酸相关的代谢物发生了显著变化(成分 1, 19.7%；成分 2, 18.2%)。对所构建的 PLS-DA 模型进行交叉验证，通过解释变量 R^2 和可预测变量 Q^2 衡量 PLS-DA 模型的解释和预测能力，其 R^2 和 Q^2 分别为 0.998 和 0.987，说明模型可靠(图 3C)。此外，利用 1000 次迭代排列检验对模型的稳健性和预测能力进行进一步评估，结果表明 PLS-DA 模型具有良好的稳健性和预测性，没有出现过拟合现象，可靠性较好(P<0.001)(图 3D)。

2.3　勾兑外源合成冰乙酸前后食醋样品中差异性成分识别及质谱碎裂片段验证

基于两组间倍数变化(fold change, FC, >2.0 或<0.5)及显著性差异阈值(P<0.05)初步筛选差异代谢物。相较于传统酿造食醋(VG)，酸度 6.5% (VGE1)样品中分别有 194 和 292 个上调和下调代谢物，酸度 7.0% (VGE2)样品中分别有 192 和 239 个上调和下调代谢物，酸度 7.5% (VGE3)样品中分别有 834 和 804 个上调和下调代谢物，酸度 8.0% (VGE4)样品中分别有 92 和 185 个上调和下调代谢物(图 4)。为确定勾兑冰乙酸食醋样品中的关键生物标志物，结合 PLS-DA 模型中变量重要性投影(variable importance in projection, VIP>1)分析对火山图筛选结果进一步筛选。最终基于前体离子的精确 m/z、强度、RT 和碎片离子信息，鉴定出 5 种在配制食醋中具有显著差异的标志物，这些物质包括油酸酰胺、N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、单棕榈酸甘油和己二酸二丁酯。所有检出差异标志物均与标准品比对后进行确证，表明筛查结果准确可靠。



注：A. PCA 得分图；B. PLS-DA 得分图；C. PLS-DA 模型的交叉验证；D. 1000 次迭代排列检验。*为经统计学检验差异显著的关键标志物。

图 3　不同酸度食醋样品的化学计量学分析

Fig.3　Chemometric analysis of vinegar samples with different acidity levels

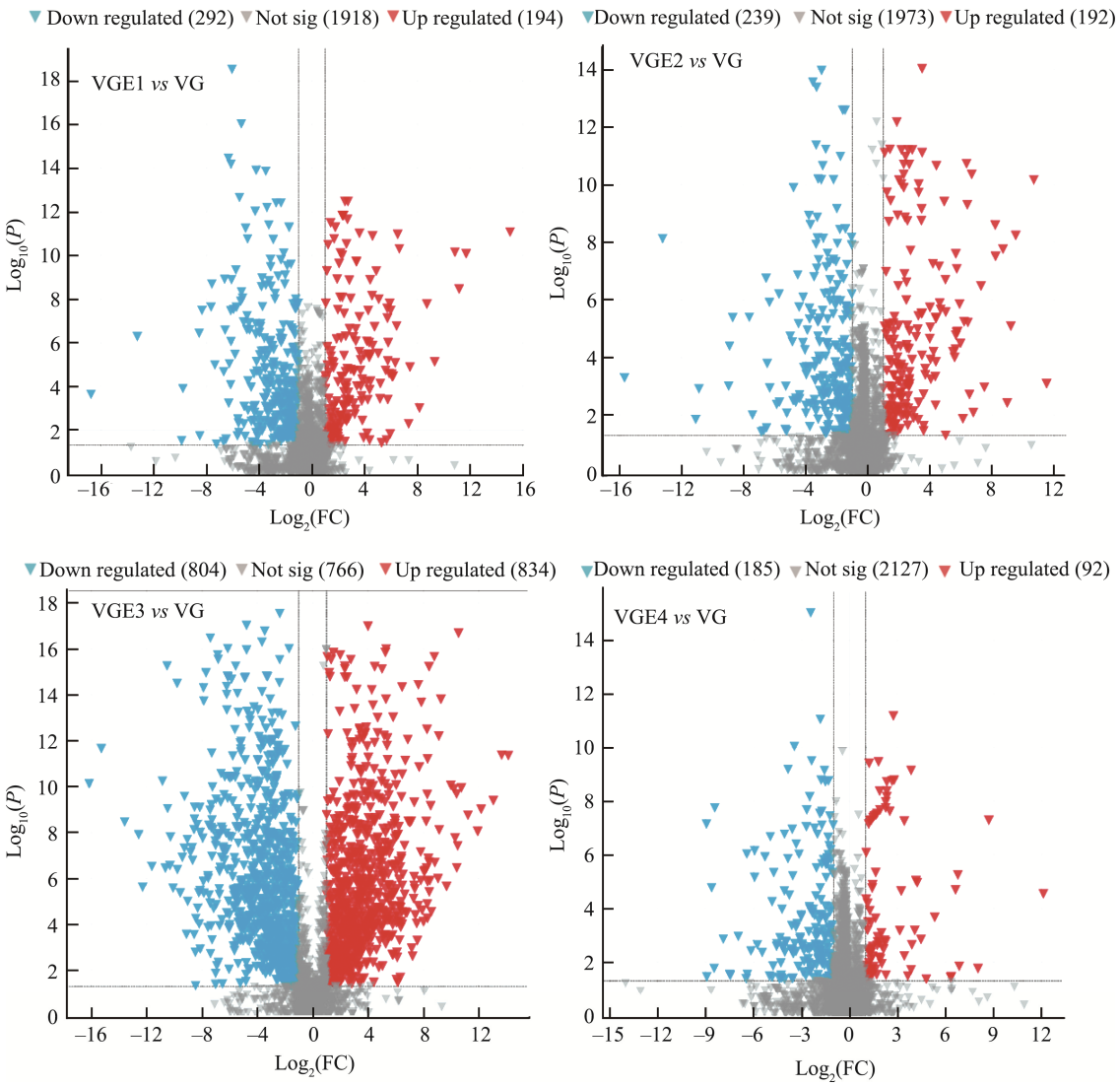
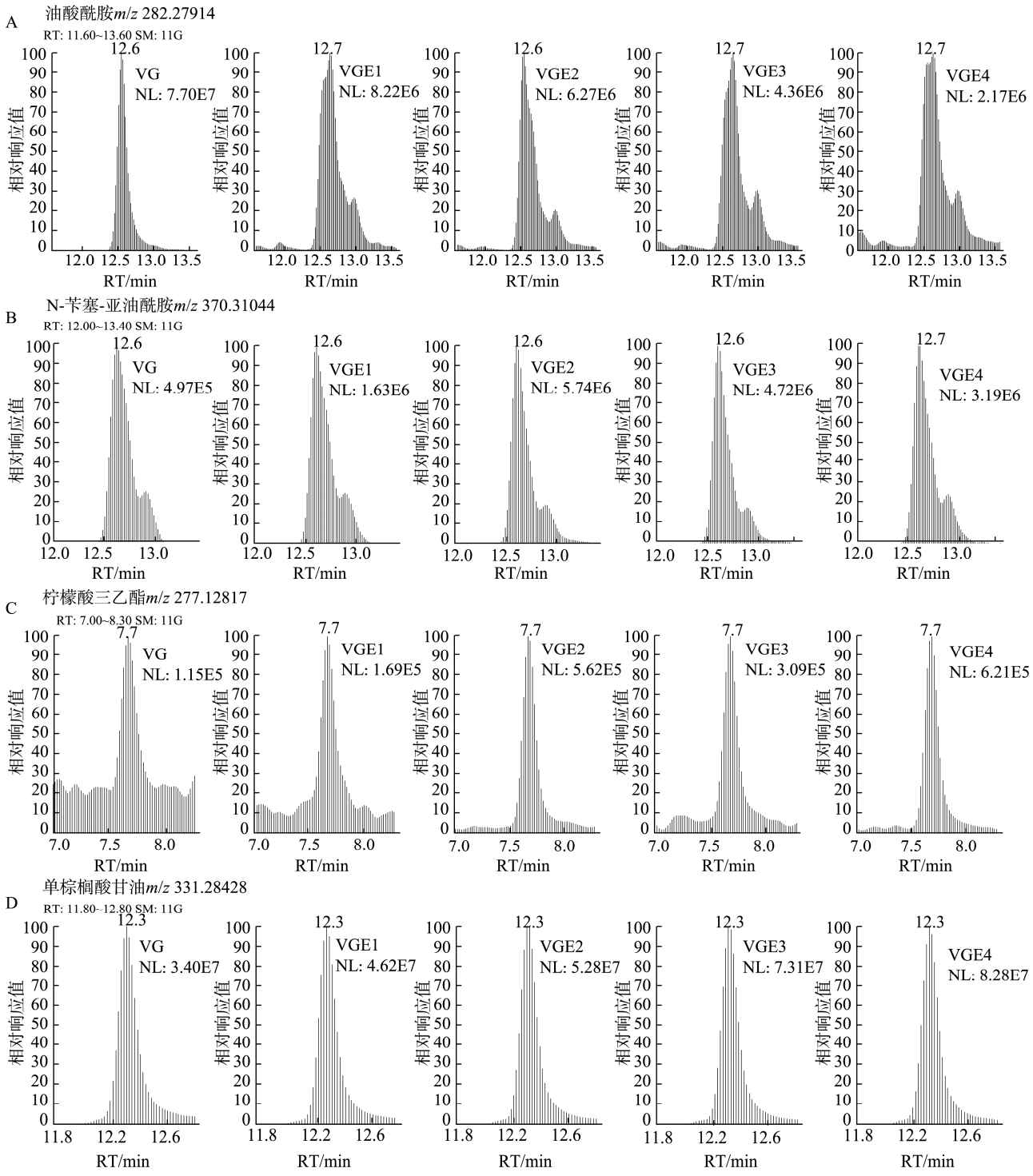


图 4 乙醇发酵法冰乙酸处理食醋样品中差异代谢物的筛选

Fig.4 Screening of differential metabolites in vinegar samples treated with glacial acetic acid by ethanol fermentation method

分析了油酸酰胺、N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯和单棕榈酸甘油的一级色谱图(图 5)和质谱图(图 6)。未添加冰乙酸的食醋样品中检测到油酸酰胺($C_{18}H_{35}NO$, *m/z* 282.27914)的 RT 为 12.5 min, 匹配了 *m/z* 86.06004, $C_4H_8NO^+$、*m/z* 95.08553, $C_7H_{11}^+$、*m/z* 97.10118, $C_7H_{13}^+$、*m/z* 100.07569, $C_5H_{10}NO^+$、*m/z* 116.10699, $C_6H_{14}NO^+$和 *m/z* 125.09609, $C_8H_{13}O^+$ 6 个理论碎裂片段(图 6A)。油酸酰胺标准物质(12.4 min, RT)检测到理论碎片离子 *m/z* 86.06004, $C_4H_8NO^+$、95.08553, $C_7H_{11}^+$、*m/z* 97.10118, $C_7H_{13}^+$、*m/z* 100.07569, $C_5H_{10}NO^+$和 *m/z* 125.09609, $C_8H_{13}O^+$。样品中 N-苄基-亚油酰胺($C_{25}H_{39}NO$, *m/z* 370.31044, RT 12.6 min)的 MS/MS 谱图中匹配到主要理论碎片离子为 *m/z* 88.07639, $C_4H_{10}NO^+$、*m/z* 95.08553, $C_7H_{11}^+$、*m/z* 97.10118, $C_7H_{13}^+$、*m/z* 100.07569, $C_5H_{10}NO^+$和 *m/z* 108.06044, $C_7H_{10}N^+$(图 6B)。N-苄基-亚油酰胺标准物质(RT 12.1 min)匹配到主要理论碎片离子为 *m/z* 95.08553, $C_7H_{11}^+$、*m/z* 97.10118, $C_7H_{13}^+$、*m/z* 100.07569, $C_5H_{10}NO^+$、*m/z* 106.06513, $C_7H_8N^+$、*m/z* 137.13248, $C_{10}H_{17}^+$。标准物质油酸酰胺和 N-苄基-亚油酰胺的次级碎裂片段和样品中的碎裂片段匹配良好, 与理论碎片质量偏差小于 5 ppm, 再次确认了配制不同比例冰乙酸的食醋样品中的候选化合物 *m/z* 282.27914 和 *m/z* 370.31044 是标志物油酸酰胺和 N-苄基-亚油酰胺。其 MS/MS 谱图与 Mass Frontier version 8.0 软件的理论预测结果匹配良好。此外, 对乙醇发酵法冰乙酸样品进行靶向检测, 未出现与 5 种标志物对应的特征色谱峰。

此外, 柠檬酸三乙酯($C_{12}H_{20}O_7$, RT 7.7 min,)理论 *m/z* 277.12817, 样品中匹配到理论碎片离子主要为 *m/z* 87.04406, $C_4H_7O_2^+$、*m/z* 99.04406, $C_5H_7O_2^+$、*m/z* 115.03897, $C_5H_7O_3^+$、*m/z* 133.04980, $C_5H_9O_4^+$和 *m/z* 157.04954, $C_7H_9O_4^+$(图 6C)。



注: NL. 响应强度(normalized level)。

图 5　显著差异标志物的色谱图

Fig.5　Chromatogram of significantly different markers

样品中匹配到的理论碎片 *m/z* 115.03897, $C_5H_7O_3^+$、*m/z* 133.04980, $C_5H_9O_4^+$和 *m/z* 157.04954, $C_7H_9O_4^+$与标准物质碎片一致。单棕榈酸甘油($C_{19}H_{38}O_4$, RT 12.3 min)理论 *m/z* 331.28428, 样品中匹配了 *m/z* 113.13248, $C_8H_{17}^+$、*m/z* 125.13248, $C_9H_{17}^+$、*m/z* 127.14813, $C_9H_{19}^+$、*m/z* 137.13248, $C_{10}H_{17}^+$和 *m/z* 139.14813, $C_{10}H_{19}^+$等理论碎片离子(图 6D)。其中 *m/z* 125.13248, $C_9H_{17}^+$和 *m/z* 137.13248, $C_{10}H_{17}^+$与标准物质碎片一致。这些化合物在样品中的主要碎片离子与其商业标准物质及 Mass Frontier 软件的理论预测结果相匹配, 确证了它们在配制食醋样品中的存在及鉴定准确性。

2.4 食醋勾兑外源合成冰乙酸前后差异标志物含量的动态演变

对鉴定出的 5 个显著差异标志物进行分析(表 1), 发现配制食醋样品中 N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯和单棕榈酸甘油含量显著高于传统酿造食醋(VG), 而油酸酰胺含量则显著降低。

油酸酰胺是食醋原料发酵过程中形成的内源性长链脂肪酸酰胺, 其含量可以作为衡量食醋品质的一项重要指标[33–34]。油酸酰胺含量随着勾兑乙醇发酵法冰乙酸的增多而减少, 在酸度为 6.5%、7.0%、7.5%、8.0%的食醋-冰乙

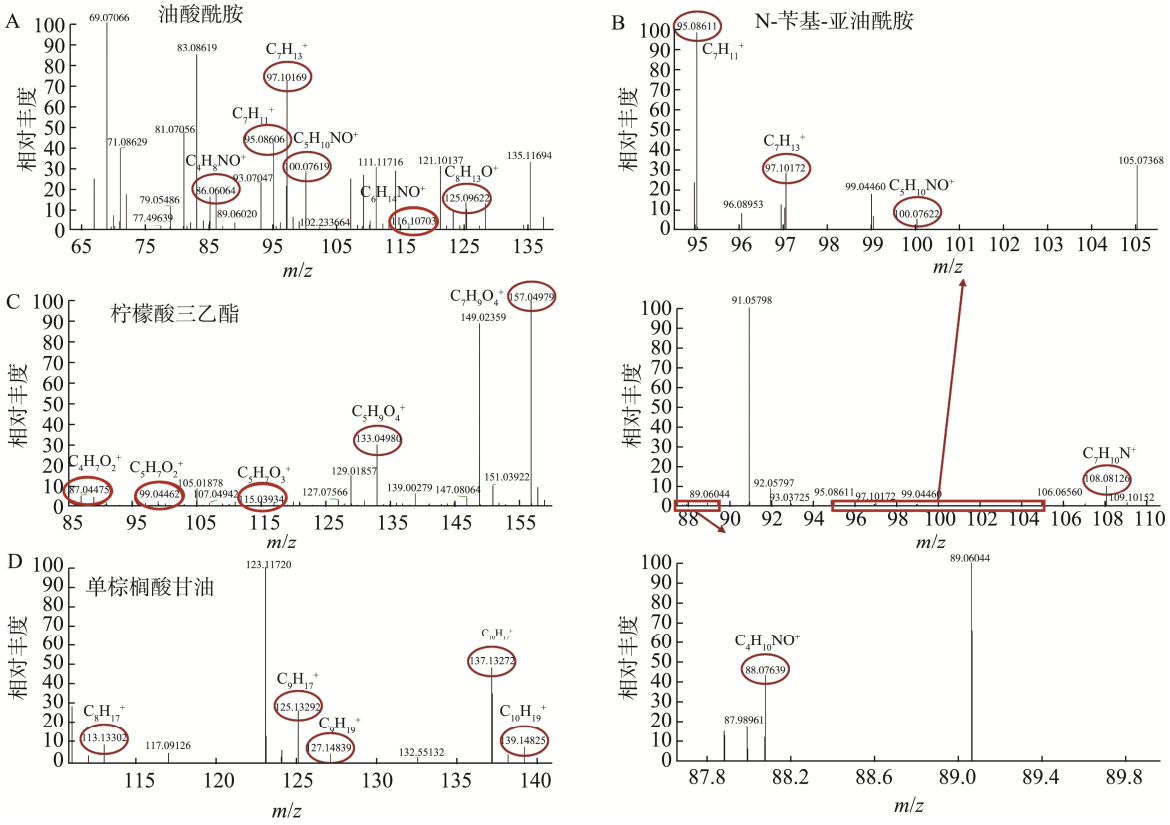


图 6 样品中显著差异标志物的质谱碎裂片段

Fig.6 Mass spectrometry fragmentation fragments of significantly different markers in the sample

表 1 不同酸度食醋样品中的显著差异标志物

Table 1 Significant difference markers in vinegar samples with different acidities

化合物		油酸酰胺 [a]	N-苄基-亚油酰胺 [a]	柠檬酸三乙酯 [a]	己二酸二丁酯 [a]	单棕榈酸甘油 [b]
分子式		$C_{18}H_{35}NO$	$C_{25}H_{39}NO$	$C_{12}H_{20}O_7$	$C_{14}H_{26}O_4$	$C_{19}H_{38}O_4$
RTs/min		12.5	12.6	7.7	10.7	12.3
理论 m/z $(M+H)^+$		282.27914	370.31044	277.12817	259.19039	331.28428
浓度	VG	479.99	0.92	0.89	10.82	56.56
	VGE1	147.85	3.12	1.19	18.89	73.38
	VGE2	94.75	9.50	3.57	15.79	83.72
	VGE3	74.53	7.78	2.11	18.40	112.06
	VGE4	39.40	5.75	4.22	27.66	129.26
比值	VGE1/VG	0.31	3.41	1.34	1.74	1.30
	VGE2/VG	0.20	10.38	4.02	1.46	1.48
	VGE3/VG	0.16	8.50	2.37	1.70	1.98
	VGE4/VG	0.08	6.29	4.75	2.56	2.29

注: [a]浓度单位为 μg/kg; [b]浓度单位为 mg/kg。

酸样品(VGE1~VGE4 组)中含量分别约为 147.85、94.75、74.53 和 39.40 μg/kg, 是传统酿造食醋中含量(479.99 μg/kg)的 0.31、0.20、0.16 和 0.08 倍。此外, 油酸酰胺作为一种脂肪酰胺, 在酸类催化剂存在下易水解, 水解后又生成油酸和氨, 可能导致油酸酰胺含量下降。N-苄基-亚油酰胺含量在酸度为 7.0%的冰乙酸-食醋样品(VGE2 组)达到最高, 约为 9.50 μg/kg, 是传统酿造食醋(0.92 μg/kg)中含量的 10.38 倍之多。柠檬酸三乙酯具有果香气味, 其在配制食醋中含量普遍高于传统酿造食醋(0.89 μg/kg), 柠檬酸三乙酯在酸度为 8.0% (VGE4 组)的冰乙酸-食醋样品含量最高, 约 4.22 μg/kg, 是传统酿造食醋中含量的 4.75 倍左右。单棕榈酸甘油和己二酸二丁酯含量变化与冰乙酸浓度呈正相关, 随着冰乙酸含量增多而升高。检测到传统酿造食醋中单棕榈酸甘油含量约为 56.56 mg/kg, 随着冰乙酸浓度的升高, 在酸度为 8.0% (VGE4 组)的食醋-冰乙酸样品中含量增加了 2.29 倍, 达到 129.26 mg/kg。己二酸二丁酯在酸度为 8.0%的食醋-冰乙酸样品中含量是传统酿造食醋(10.82 μg/kg)的 2.56 倍, 增加到 27.66 μg/kg。酸性环境可能加速酯类等增塑剂从包装材料向食品基质的迁移过程[35–36]。结果表明, 掺入乙醇发酵法冰乙酸后导致食醋中这 5 种物质含量发生显著变化, 当油酸酰胺测定值显著低于 479.99 μg/kg, 同时 N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯、单棕榈酸甘油含量超出传统酿造食醋本底水平(分别为 0.92 μg/kg、0.89 μg/kg、10.82 μg/kg、56.56 mg/kg)时, 可作为区分传统酿造食醋与配制食醋的关键生物标志物。

3　结　论

本研究建立了基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 的非靶向代谢组学技术, 筛选了 5 种显著性差异标志物, 分别为油酸酰胺、N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯和单棕榈酸甘油。其中油酸酰胺在传统酿造食醋中含量为 479.99 μg/kg, 含量随勾兑程度增加而明显降低, 在酸度为 8.0%的冰乙酸-食醋样品中含量(39.40 μg/kg)约为传统酿造食醋的 0.08 倍。N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯和单棕榈酸甘油在传统酿造食醋中含量分别为 0.92、0.89、10.82 μg/kg 和 56.56 mg/kg。N-苄基-亚油酰胺和柠檬酸三乙酯分别在酸度为 7.0%和 8.0%样品组含量明显升高, 分别达到 9.50 μg/kg 和 4.22 μg/kg。单棕榈酸甘油与己二酸二丁酯随冰乙酸浓度升高而增多, 在酸度为 8.0%的样品中含量分别达到 129.26 mg/kg 和 27.66 μg/kg, 是传统食醋的 2.29 倍和 2.56 倍。这 5 种标志物含量明显差异于传统酿造食醋相比, 当油酸酰胺明显低于或 N-苄基-亚油酰胺、柠檬酸三乙酯、己二酸二丁酯和单棕榈酸甘油含量明显高于传统酿造食醋, 可判定为勾兑食醋。本研究为配制食醋提供了以 5 种物质为核心指标的高特异性鉴别方法, 为完善食醋质量安全监管体系提供了重要的技术支撑。

参考文献

[1] WU JH, ZHAO HB, DU M, *et al*. Dispersive liquid-liquid microextraction for rapid and inexpensive determination of tetramethylpyrazine in vinegar [J]. Food Chemistry, 2019, 286: 141–145.

[2] ZHAO YM, HE ZY, HAO WJ, *et al*. Vinegars but not acetic acid are effective in reducing plasma cholesterol in hamsters fed a high-cholesterol diet [J]. Food & Function, 2020, 11(3): 2163–2172.

[3] HO CW, LAZIM AM, FAZRY S, *et al*. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1621–1630.

[4] FANG CJ, YOU HC, HUANG ZL, *et al*. Simultaneous analysis of the stable carbon isotope ratios of acetoin and acetic acid by GC-C-IRMS for adulteration detection in brewed rice vinegar products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(48): 14252–14260.

[5] 邱皓璞, 李洁莉. 酿造食醋溯源性检测技术研究现状[J]. 现代食品, 2016(3): 62–64.
QIU HP, LI JL. Research status of identification of vinegar traceability methods [J]. Modern Food, 2016(3): 62–64.

[6] YU XH, GU CH, GUO XX, *et al*. Dynamic changes of microbiota and metabolite of traditional Hainan dregs vinegar during fermentation based on metagenomics and metabolomics [J]. Food Chemistry, 2024, 444: 138641.

[7] NIE ZQ, ZHENG Y, XIE SK, *et al*. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 9240.

[8] YANG ZZ, XU H, CHEN XR, *et al*. Development of a method for the determination of alkylpyrazine in traditional vinegar and its formation kinetics [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2024, 131: 106272.

[9] ZHANG GR, LI L, LIU J, *et al*. Comparing the metabolite components of Sichuan Sun vinegar and other kinds of vinegar based on non-targeted metabolomic [J]. LWT, 2022, 164: 113640.

[10] CHOU CH, LIU CW, YANG DJ, *et al*. Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects *in vivo* [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 63–69.

[11] PINU FR, DECARVALHO-SILVA S, TROVATTI UETANABARO AP, *et al*. Vinegar metabolomics: An explorative study of commercial balsamic vinegars using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Metabolites, 2016, 6(3): 22.

[12] ZHANG QY, ZHANG SP, XIE CS, *et al*. Characterization of Chinese vinegars by electronic nose [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 119(2): 538–546.

[13] CAVDAROGLU C, OZEN B. Detection of vinegar adulteration with spirit vinegar and acetic acid using UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2022, 379: 132150.

[14] 张士侠, 魏瑶, 王霖. 酱油、食醋食品安全国家标准实施存在问题和监管对策[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(7): 319–324.
ZHANG SX, WEI Y, WANG L. Probleus and smpervisory comnter ueasmres in the iupleuentation of national food safety standards for soy samce and vinegar [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(7):

319–324.

[15] 朱永红, 赵博, 肖昭竞. 食醋掺假检验方法研究进展[J]. 中国调味品, 2012, 37(4): 94–99.
ZHU YH, ZHAO B, XIAO ZJ. Progress of the study on methods for detecting adulteration of vinegar [J]. China Condiment, 2012, 37(4): 94–99.

[16] HSIEH CW, LI PH, CHENG JY, *et al*. Using SNIF-NMR method to identify the adulteration of molasses spirit vinegar by synthetic acetic acid in rice vinegar [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 50: 904–908.

[17] 郭洁丽, 毛立新, 杨小兰. 同步荧光法结合偏最小二乘法对老陈醋中掺杂食用冰醋酸的定量分析[J]. 食品工程, 2013(3): 48–51.
GUO JL, MAO LX, YANG XL. Synchronous fluorescence spectrometry combined with partial least squares method for quantitative analysis of edible acetic acid in adulterated Shanxi mature vinegar [J]. Food Engineering, 2013(3): 48–51.

[18] RÍOS-REINA R, ELCOROARISTIZABAL S, OCAÑA-GONZÁLEZ JA, *et al*. Characterization and authentication of Spanish PDO wine vinegars using multidimensional fluorescence and chemometrics [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 108–116.

[19] 沈央红, 方金玉, 朱军莉, 等. 代谢组学在食品质量安全领域的应用进展[J]. 食品科学, 2023, 44(5): 282–289.
SHEN YH, FANG JY, ZHU JL, *et al*. Advance in the application of metabonomics in the field of food safety and quality [J]. Food Science, 2023, 44(5): 282–289.

[20] CAVDAROGLU C, OZEN B. Authentication of vinegars with targeted and non-targeted methods [J]. Food Reviews International, 2023, 39(1): 41–58.

[21] CASTRO-PUYANA M, PÉREZ-MÍGUEZ R, MONTERO L, *et al*. Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017, 93: 102–118.

[22] WANG X, JIA W. Bio-based material-edible *rosemary* induced biodegradation of aflatoxin B_1 *via* altering endogenous protective enzymes signatures in animal-derived foods [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 458: 132021.

[23] 李密, 巩志国, 杨丽, 等. 基于非靶向代谢组学的葡萄酒原产地溯源分析[J]. 分析测试学报, 2024, 43(9): 1417–1424.
LI M, GONG ZG, YANG L, *et al*. Origin traceability of wine based on untargeted metabolomics [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(9): 1417–1424.

[24] 俞邱豪, 张九凯, 叶兴乾, 等. 基于代谢组学的食品真实属性鉴别研究进展[J]. 色谱, 2016, 34(7): 657–664.
YU QH, ZHANG JK, YE XQ, *et al*. Progress on metabolomics for authenticity identification of food [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(7): 657–664.

[25] 贾莹莹, 秦宇, 周景丽, 等. 基于 UPLC-MS/MS 分析山西陈醋与恒顺香醋的差异物质[J]. 中国调味品, 2026, 51(1): 212–219, 243.
JIA YY, QIN Y, ZHOU JL, *et al*. Analysis of differential substances between Shanxi mature vinegar and Hengshun aromatic vinegar based on UPLC-MS/MS [J]. China Condiment, 2026, 51(1): 212–219, 243.

[26] 杨晓璇. 基于 GC-IMS 和 UPLC-MS/MS 代谢组学技术分析不同酱油和食醋中的差异[D]. 济南: 山东师范大学, 2020.
YANG XX. Metabonomics Analysis of different soy sauce and vinegar based on GC-IMS and UPLC-MS/MS [D]. Ji'nan: Shandong Normal University, 2020.

[27] SHAH SMZ, ALI A, KHAN MN, *et al*. Sensitive detection of pharmaceutical drugs and metabolites in serum using data-independent acquisition mass spectrometry and open-access data acquisition tools [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(7): 901.

[28] KATCHBORIAN-NETO A, ALVES MF, BUENO PCP, *et al*. Integrative open workflow for confident annotation and molecular networking of metabolomics MSE/DIA data [J]. Briefings in Bioinformatics, 2024, 25(2): bbae013.

[29] TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, *et al*. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. Nature Methods, 2015, 12(6): 523–526.

[30] 何敏, 胡佳栋, 张晨, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术分析党参产地加工前后的化学成分差异[J]. 天津中医药大学学报, 2025, 44(8): 698–707.
HE M, HU JD, ZHANG C, *et al*. A comparative study on chemical constituents diffenrences between fresh and processed samples of *Codonopsis pilosula* [J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2025, 44(8): 698–707.

[31] 黄海英, 康俊丽, 余亚辉, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS 法分析补肺益肾方的化学成分[J]. 分析测试学报, 2019, 38(1): 1–13.
HUANG HY, KANG JL, YU YH, *et al*. Identification of chemical constituents of Bufei Yishen formula by UPLC-Q-Orbitrap MS [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(1): 1–13.

[32] 罗忻, 王振聚, 谢堂堂, 等. 基于高分辨质谱技术的儿童口罩中荧光增白剂非靶向筛查鉴定[J]. 分析化学, 2021, 49(11): 1926–1936.
LUO X, WANG ZJ, XIE TT, *et al*. Non-target screening and identification of fluorescent whitening agents in children masks based on high resolution mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(11): 1926–1936.

[33] 范梦姣, 张守峰, 岳欣冉, 等. 饲粮中添加油酸酰胺对冷处理后肉仔鸡盲肠通透性及盲肠菌群的影响[J]. 中国兽医学报, 2025, 45(12): 2756–2767.
FAN MJ, ZHANG SF, YUE XR, *et al*. Effect of oleamide addition to diet on cecal permeability and cecal microbiota of broilers after cold treatment [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2025, 45(12): 2756–2767.

[34] 晏嫣, 张阳, 姜德玮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品接触材料中油酸酰胺的迁移量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1710–1714.
YAN Y, ZHANG Y, JIANG DW, *et al*. Determination of oleamide migration from food contact materials by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(6): 1710–1714.

[35] GUPTA RK, PIPLIYA S, KARUNANITHI S, *et al*. Migration of chemical compounds from packaging materials into packaged foods: Interaction, mechanism, assessment, and regulations [J]. Foods, 2024, 13(19): 3125.

[36] VACLVIKOVA M, PASEIRO-CERRATO R, VACLAVIK L, *et al*. Target and non-target analysis of migrants from PVC-coated cans using UHPLC-Q-Orbitrap MS: Evaluation of long-term migration testing [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2016, 33(2): 352–363.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)