

高效液相色谱-同位素稀释质谱法 准确定量牛乳中 β -乳球蛋白

陈燕秋^{1,2}, 徐增益¹, 喻静兰¹, 李良君¹, 徐仲杰¹, 雷雯¹

(1. 上海化工研究院有限公司, 国家同位素工程技术研究中心上海分中心, 上海市稳定同位素检测
与应用研发专业技术服务平台, 上海 200062; 2. 成都市食品检验研究院, 四川 成都 611130)

摘要: β -乳球蛋白(β -LG)是牛乳的主要致敏蛋白之一, 亟需开发一种准确且可追溯的准确定量分析方法。本研究利用胰蛋白酶酶解 β -LG 后, 采用同位素稀释质谱(IDMS)法对特定多肽进行定量分析。同时考察氘标记特征多肽 IDAL * NENK(D_6 -Leu)及碳氮双标记特征多肽 IDAL * NENK($^{13}C_6$, ^{15}N -Leu)作为内标对色谱行为和检测结果的影响, 并进行方法学验证。结果表明, 本方法的回收率为 90.1%~102.7%, 变异系数(CVs) < 8.0%。分析来自国内市场的 5 个样本, CVs < 6.5%, 合成成本较低的氘标记多肽在蛋白质定量中可作为 ^{13}C 、 ^{15}N 标记多肽的可靠替代。本方法抗干扰能力强、灵敏度高、准确度高、重现性好, 有助于提高 β -LG 定量结果在不同实验室之间的可比性。

关键词: 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS); β -乳球蛋白(β -LG); 同位素稀释质谱(IDMS); 特征多肽

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2023)03-0436-06

doi: 10.7538/zpxb.2022.0078

Accurate Quantification of β -Lactoglobulin in Bovine Milk by HPLC-IDMS

CHEN Yan-qiu^{1,2}, XU Zeng-yi¹, YU Jing-lan¹, LI Liang-jun¹, XU Zhong-jie¹, LEI Wen¹

(1. Shanghai Stable Isotope Detection and Application R&D Professional Technical Service Platform,
National Isotope Engineering Technology Research Center,

Shanghai Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd, Shanghai 200062, China;

2. Chengdu Institute of Food Inspection, Chengdu 611130, China)

Abstract: Milk is one of the most common and widespread allergenic foods. Milk allergy is an adverse immunological reaction to milk proteins of different mammalian species. β -Lactoglobulin (β -LG) is one of the main allergenic proteins of cow's milk. There is an urgent need to develop an accurate and traceable method to accurately quantify β -LG. Based on the known β -lactoglobulin sequence, the Skyline tool was used to simulate the β -lactoglobulin digestion process. After digestion of β -LG with trypsin, the tryptic peptides in the samples were detected selectively by MS/MS. In short, the peptides were searched with MS full scan of respective digested milk protein. Three characteristic peptides of β -lactoglobulin were screened by primary local sequence search tool (basic local

alignment search tool, BLAST) and Uniprot database. Finally, one of the characteristic peptides with the highest response intensity and the best stability was selected for further verification by HPLC-MS/MS and quantitative studied by multiple reaction monitoring (MRM). In this work, the specific peptides were quantified by isotope dilution mass spectrometry (IDMS) after trypsin digestion of β -LG. At the same time, the effects of deuterium-labeled characteristic peptide IDAL * NENK(D_6 -Leu) and carbon-nitrogen dual-labeled characteristic peptide IDAL * NENK($^{13}C_6$, ^{15}N -Leu) as internal standards on chromatographic behavior and detection results were investigated, and the methodology was verified. The method showed a good linear relationship within its own range. The limits of detection and limits of quantification were 0.001 9-0.002 2 g/L and 0.006 4-0.007 4 g/L, respectively. The recoveries ranged from 90.1% to 102.7%, and the coefficients of variation (CVs) were less than 8.0%. Analysis of 5 samples from the domestic market showed CVs were less than 6.5%. Deuterium-labeled peptides with lower synthetic cost could be used as reliable substitutes for ^{13}C and ^{15}N -labeled peptides in protein quantification. The established quantitative method of isotope dilution mass spectrometry had strong anti-interference ability, high sensitivity, high accuracy and good reproducibility. It is expected that the comparability of β -LG quantitative results between different laboratories will be improved. In addition, the combination of new ultrasensitive mass spectrometry with stable-isotope labelling techniques has advanced to a point that some studies with radioactive isotopes can now be readily replaced by stable-isotope techniques. This trend is expected to continue and this isotope method will be a key component of the design of new clinical studies currently under way. At the same time, with the widespread use of stable isotope markers in food allergy, metabolomics, proteomics, clinical pharmacology and other fields, the demand for stable isotope labeled compounds is expected to further increase.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); β -lactoglobulin (β -LG); isotope dilution mass spectrometry (IDMS); signature peptides

食品过敏是指由于摄入某些食品蛋白质后诱发人体出现不良免疫反应的现象,这种导致人体出现不良症状的抗原物质称为过敏原^[1-3]。过敏原问题是食品安全领域的重要问题之一^[4]。食品过敏原本质上是蛋白质,部分过敏人群的过敏原为乳品,且发病率呈上升趋势。 β -乳球蛋白(β -LG)是牛乳中具有较强致敏性的一种蛋白质^[5-7],致敏风险远超过牛乳中其他蛋白质。因此,对乳制品中主要过敏原 β -LG 的准确定量意义重大。

目前,乳品蛋白的检测方法主要包括酶联免疫吸附(ELISA)法^[8]、聚合酶链式反应(PCR)^[9]和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[10-12]。其中,ELISA 操作简便,但易受复杂基质成分的干扰,出现交叉反应现象;PCR 法

特异性强,但检测结果偏差较大;LC-MS/MS 法将色谱的高分离能力与质谱的高灵敏度相结合^[13],在定性和定量方面具有显著优势,但其测定乳品蛋白时存在较强的基质效应^[14]。同位素稀释质谱法(IDMS)是一种特殊的内标法,国际计量组织规定 IDMS 可作为基准方法或绝对方法,能够极大地避免前处理操作、基质效应等对结果造成的影响,实现测量结果的高准确性。利用 IDMS 法能够有效消除基质效应,因此,建立 LC-MS/MS-IDMS 方法结合多反应监测模式(MRM)有助于准确定量分析牛奶中的 β -LG。在 IDMS 中,同位素内标是检测的关键,目前多为 ^{13}C 和 ^{15}N 标记化合物,其合成步骤多、价格昂贵、实验成本较高。近年来,氘标记的化合物应用快速发展^[15-18],其中氘标

记氨基酸的价格仅为其他稳定同位素(如 ^{13}C 、 ^{15}N 等)标记氨基酸的三分之一。利用氘标记氨基酸合成的多肽能有效降低同位素稀释质谱法定量蛋白质的成本,但目前尚未有研究对比氘标记的多肽和 ^{13}C 、 ^{15}N 标记的多肽作为内标在定量分析牛奶中 β -LG的色谱行为和对检测结果的影响。

本研究建立2种不同内标 D_6 -IDAL * NENK(D_6 -IK8)和 $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -IDAL * NENK($^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -IK8)的同位素稀释质谱法,用于测定不同市售牛奶中 β -LG的含量,同时探究氘标特征多肽作为其他稳定核素多肽替代的可行性。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

TSQ Quantum-Accela 型液质联用仪:美国 Thermo Fisher 公司产品;Milli-Q 型纯水机:德国 Merck 公司产品;XP205 称量天平:瑞士梅特勒公司产品;TGL-16aR 冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂产品;热鼓风恒温仪:上海一恒科学仪器有限公司产品;津腾溶剂过滤器:天津市津腾实验设备有限公司产品。

1.2 材料与试剂

碳酸氢铵、碘乙酰胺(IAM)、二硫苏糖醇(DTT)、胰蛋白酶和 β -LG:纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司产品;甲酸、乙腈:HPLC 级,中国 CNW 公司产品;骆驼奶粉:卡漠迪拜 Camelait 公司产品;多肽 IDALNENK(IK8,纯度 $>98\%$)、多肽 D_6 -IDAL * NENK(D_6 -IK8,纯度 $>98\%$,丰度 $>98\text{atom}\%$)、多肽 $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -IDAL * NENK($^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -IK8,纯度 $>98\%$,丰度 $>98\text{atom}\%$):由上海化工研究院有限公司提供。

5 种牛奶样品:购自当地超市。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 储备标准溶液 精确称取适量的(精确至 0.01 mg) β -LG 特征多肽固体,用超纯水溶解,配制成 5.00 g/L β -LG 特征多肽标准储备溶液,于 -20°C 保存。

1.3.2 内标储备液 精确称取适量的(精确至 0.01 mg) β -LG 特征氘标多肽固体,用超纯水溶解,配制成 5.10 g/L 内标多肽 D_6 -IK8 标准储备溶液,于 -20°C 保存。

精确称取适量(精确至 0.01 mg) β -LG 特

征双标多肽固体,用超纯水溶解,配制成 5.07 g/L 内标多肽 $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -IK8 标准储备溶液,于 -20°C 保存。

1.3.3 工作标准溶液 精密量取适量的储备标准溶液,用骆驼奶粉空白基质(10 g/L)梯度稀释,配制成 0.25、0.50、1.00、1.50、2.50、4.00 和 5.00 g/L 系列标准工作溶液,每个浓度加入一定量的内标储备液,现用现配。

1.4 样品处理

量取约 2 mL 牛奶样品至 100 mL 容量瓶中,用 0.05 mol/L 碳酸氢铵定容至刻度线,置于涡旋混合器上充分溶解,备用。用移液枪准确移取 200 μL 上述样液于 1.5 mL 液相瓶中,随后加入 50 μL 0.1 mol/L DTT 溶液,于 55°C 恒温仪中反应 60 min,待反应温度降至室温后,加入 100 μL 0.1 mol/L IAM 溶液,于 30°C 避光反应 30 min;然后加入 100 μL 1 g/L 胰蛋白酶溶液,于 37°C 过夜反应(16 h);最后加入 100 μL 10% 甲酸水溶液,室温静置 30 min 终止反应。终止反应后,在 4°C 下将样品以 5 500 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 滤膜后转移至新的液相瓶中,待 HPLC-MS/MS 分析。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Shimadzu C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液;流速 1.0 mL/min;梯度洗脱程序:0~3.0 min (10%B),3.0~13.0 min (10%~30%B),13.0~14.0 min (30%~90%B),14.0~18.0 min (90%B);柱温 35°C ;进样量 10 μL 。

1.5.2 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源,毛细管电压 3.5 kV,鞘气流速 13 mL/min,离子传输管温度 275°C ,碰撞电压(CE)20 eV;多反应监测模式;特征多肽 IK-8 的 m/z 459 $\rightarrow$ 803,内标肽 D_6 -IK8 的 m/z 462 $\rightarrow$ 809,内标肽 $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -IK8 的 m/z 462.5 $\rightarrow$ 810。

2 结果与讨论

2.1 多肽的选择

采用不同方法的组合选择适合乳品 β -LG 定量的特征多肽。利用局部比对搜索工具 BLAST 与 NCBI 数据库中的多肽条目,对比这些多肽与其他食品中的蛋白质。用胰酶消化

β-LG,以便使用以下标准选择定量多肽:多肽长度7~15;在肽序列中不存在Met、Cys、Trp氨基酸残基以及几乎没有已知的翻译后修饰。

预选潜在的定量多肽后,用胰蛋白酶消化β-LG,进行LC-MS/MS分析,鉴定并选择能够较好离子化的IDALNENK作为定量多肽,另外2条潜在的多肽VLVLDTDYK和TPEVD-DEALEK作为定性多肽。

2.2 空白基质的选择

通过向空白基质中加入纯品β-LG可以很好地模拟样品中目标蛋白的实际酶解过程和基质影响。根据蛋白质序列的物种同源性,发现所选择的标志多肽IDALNENK与骆驼奶、马奶和驴奶无任何同源性。根据可获得性,选择骆驼奶粉作为空白基质,并通过质谱进一步确认骆驼奶粉不含β-LG,不会对检测结果造成干扰,且骆驼奶的成分与牛奶较接近。

2.3 内标多肽的选择

氘标记氨基酸的合成成本低于其他稳定同位素(如¹³C、¹⁵N等)标记的氨基酸。目前,同位素标记定制多肽的合成关键在于标记原料氨基酸的获取,使用氘标记氨基酸合成的多肽作为内标能有效降低同位素稀释质谱法定量分析蛋白质的成本。因此,对比内标肽D₆-IK8和¹³C₆,¹⁵N-IK8作为同位素内标试剂的效果,本实验分别从两者作为内标方法学的拟合曲线的线性关系、精密度、准确度、检出限和定量限进行考察。

2.3.1 线性关系 将系列标准工作溶液按照浓度从低到高依次进样,以浓度为横坐标,分别以特征多肽D₆-IK8和¹³C₆,¹⁵N-IK8的峰面积为纵坐标,建立线性关系。结果表明,内标肽D₆-IK8的回归方程为 $y=0.020\ 2x-0.008\ 3$ ($R^2=0.999$),内标肽¹³C₆,¹⁵N-IK8的回归方程为 $y=0.036\ 3x-0.045\ 1$ ($R^2=0.999$),在0.25~5.00 g/L浓度范围内均具有良好的线性关系,可以满足乳品定量分析要求。

2.3.2 检出限和定量限 向骆驼奶粉空白基质溶液中加入0.1 mg β-LG标准品,按1.4节方法处理样液并测定,以峰峰比计算信噪比(S/N),以S/N=10为定量限(LOQ),S/N=3为检出限(LOD)。结果表明,以D₆-IK8为内标的LOQ为0.006 4 g/L,LOD为0.001 9 g/L;以¹³C₆,¹⁵N-IK8为内标的LOQ为0.007 4 g/L,LOD为0.002 2 g/L。

2.3.3 精密度 称取11份市售牛奶样品,按1.4节方法处理并测定,以D₆-IK8、¹³C₆,¹⁵N-IK8为内标的方法日内相对标准偏差(RSD)分别为5.3%、4.7%;用同一方法连续测定5天,方法日间RSD分别为7.1%、6.5%。

2.3.4 准确度 通过向牛奶中添加β-LG标准品考察同位素内标法的准确度,理论添加量分别为1、10和100 g/L。涡旋混合后按1.4节方法处理,分别将以D₆-IK8、¹³C₆,¹⁵N-IK8为内标设为A、B组。进样分析得到各添加水平的回收率列于表1。

表 1 加标回收率实验结果(n=5)
Table 1 Investigation test of recovery rate (n=5)

化合物 Chemical compound	添加水平 Additive content/(g/L)	A 组回收率 Group A recovery rate/%	A 组 RSD Group A RSD/%	B 组回收率 Group B recovery rate/%	B 组 RSD Group B RSD/%
本底值	—	—	5.3	—	6.5
β-乳球蛋白	1.0	92.6	6.2	95.6	7.1
	10.0	94.4	4.8	90.1	5.3
	100.0	101.1	2.5	102.7	3.7

进一步研究发现,氘标记多肽D₆-IK8的色谱行为存在同位素效应,即氘标记多肽D₆-IK8和天然多肽IK8之间存在出峰时间的微小差异(约0.02 s),而双标多肽¹³C₆,¹⁵N-IK8与天

然多肽IK8的保留时间完全一致,均为8.19 min,示于图1。因此,在一些权威的国际比对中,仍建议使用¹³C或¹⁵N标记的氨基酸和多肽。虽然氘标多肽有微小的同位素效应,但近年来,质谱

的快速发展使氘标记肽的应用显著增加。如在药物代谢研究阶段,需使用大量标记肽段药物用于实验动物或人体等复杂系统中寻找新的代谢途径或代谢产物,使用价格较低廉的氘标氨基酸或多肽替代其他核素。

2.4 实际样品的定量

取 5 种不同品牌的市售牛奶,分别利用建立的以 D₆-IK8 和 ¹³C₆, ¹⁵N-IK8 为内标的同位素稀释质谱法,在多肽水平对 β-LG 进行准确定量分析,结果列于表 2。可以发现,虽然不同品牌牛奶中 β-LG 含量有差别,但相差不大;对比 2 种不同内标对同一牛奶样品的定量结果,二者仅相差 0.01~0.11 g/L,以 D₆-IK8 和 ¹³C₆, ¹⁵N-IK8 为内标定量奶品的 RSD 分别为 3.2%~6.5%、2.9%~5.8%。使用 ¹³C₆, ¹⁵N-IK8和D₆-IK8作为内标对实际奶品的定量

结果表明,D₆-IK8 和 IK8 之间出峰时间 0.02 s 的差异对实际奶品的定量结果无影响。

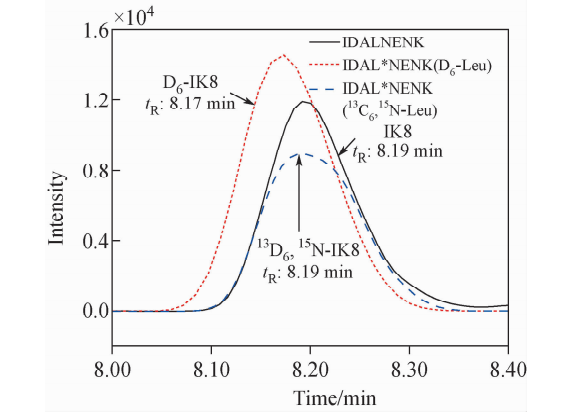


图 1 氘标记多肽的同位素效应图
Fig. 1 Isotope effect diagram of deuterium labeled peptides

表 2 实际样品的检测 (n=6)
Table 2 Detection of actual samples (n=6)

奶品 Milk	内标 Internal standard	β-LG 含量 Content of β-LG/(g/L)	平均值 Average/(g/L)	相对标准偏差 RSD/%
1 [#]	D ₆ -IK ⁸	3.47,3.33,3.58,3.66,3.50,3.49	3.50	3.2
	¹³ C ₆ , ¹⁵ N-IK ⁸	3.59,3.74,3.60,3.61,3.54,3.42	3.58	2.9
2 [#]	D ₆ -IK ⁸	2.91,2.91,2.75,3.13,2.98,3.00	2.95	4.3
	¹³ C ₆ , ¹⁵ N-IK ⁸	3.15,2.88,2.79,3.12,3.04,2.98	2.99	4.6
3 [#]	D ₆ -IK ⁸	3.02,2.85,2.80,3.19,3.14,3.02	3.00	5.1
	¹³ C ₆ , ¹⁵ N-IK ⁸	3.18,3.15,2.93,2.93,3.33,3.15	3.11	5.0
4 [#]	D ₆ -IK ⁸	2.71,2.49,2.38,2.64,2.45,2.57	2.54	4.9
	¹³ C ₆ , ¹⁵ N-IK ⁸	2.82,2.63,2.55,2.71,2.57,2.43	2.62	5.2
5 [#]	D ₆ -IK ⁸	3.20,2.97,3.12,2.64,2.96,3.01	2.98	6.5
	¹³ C ₆ , ¹⁵ N-IK ⁸	2.68,2.94,2.92,3.17,3.03,3.09	2.97	5.8

3 结论

本研究采用靶向蛋白质组学筛选出 β-LG 中具有高度特异性的特征多肽 IK8,并选择合适的空白基质,将 MRM 模式与酶解技术相结合,引入 D₆-IK8 和 ¹³C₆, ¹⁵N-IK8 2 种同位素内标,建立准确定量 β-LG 的同位素稀释质谱法,并进行方法学考察。结果发现,2 种内标的定量效果接近,均能满足各种牛奶中 β-LG 的定性、定量分析要求。

参考文献:

[1] 党慧杰,刘振民,郑远荣. 牛乳主要过敏原及其

检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020,11(3):765-770.
DANG Huijie, LIU Zhenmin, ZHEN Yuanrong. Milk main allergens and detection technology research progress[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2020, 11(3): 765-770(in Chinese).
[2] SPIES J R. Allergens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1974, 22(1): 30-36.
[3] MARZANO V, TILOCCA B, FIOCCHI A G, VERNOCCHI P, MORTERA S L, URBANI A, RONCADA P, PUTIGNANIF L. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-

- based proteomics[J]. *Journal of Proteomics*, 2020, 215: 103-636.
- [4] 杨若婷,戴智勇,潘丽娜,彭小雨,李欣,陈红兵. 食物过敏原检测标准及标识现状[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(11): 1-10.
- YANG Ruoting, DAI Zhiyong, PAN Lina, PENG Xiaoyu, LI Xin, CHEN Hongbing. Current status of food allergen detection standards and labeling[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(11): 1-10(in Chinese).
- [5] BARTUZI Z, COCCO R R, MURARO A, NOWAK-WEGRZYN A. Contribution of molecular allergen analysis in diagnosis of milk allergy [J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2017, 17(7): 1-9.
- [6] ONDRACEK A S, HEIDEN D, OOSTINGH G J, FUERST E, FAZEKAS-SINGER J, BERGMAYR C, ROHRHOFFER J, JENSEN-JAROLIM E, DUSCHL A, UNTERSMAYR E. Immune effects of the nitrated food allergen β -lactoglobulin in an experimental food allergy model[J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2-463.
- [7] 杨晶晶,赵树静,刘甜甜,李艳艳,李红娟,李洪波. 降低牛乳中 β -乳球蛋白致敏性方法的研究进展[J]. *中国油脂*, 2021, 46(5): 75-81.
- YANG Jingjing, ZHAO Shuojing, LIU Tian-tian, LI Yanyan, LI Hongjuan, LI Hongbo. Research progress on the method of reducing β -lactoglobulin allergenicity in milk[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(5): 75-81(in Chinese).
- [8] KOEBERL M, SHARP M F, TIAN R, BUDHDHADA S, CLARKE D, ROBERTS J. Lupine allergen detecting capability and cross-reactivity of related legumes by ELISA[J]. *Food Chemistry*, 2018, 256: 105-112.
- [9] LINACERO R, SANCHIZ A, BALLESTEROS I, CUADRADO C. Application of real-time PCR for tree nut allergen detection in processed foods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(7): 1-077-1-093.
- [10] CROOTE D, BRASLAVSKY I, QUAKE S R. Addressing complex matrix interference improves multiplex food allergen detection by targeted LC-MS/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9-760-9-769.
- [11] COSTA J, ANSARI P, MAFRA I, OLIVEIRA M B P P, BAUMGARTNER S. Assessing hazelnut allergens by protein-and DNA-based approaches: LC-MS/MS, ELISA and real-time PCR[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(11): 2-581-2-590.
- [12] SEALEY-VOYKSNER J, ZWEIGENBAUM J, VOYKSNER R. Discovery of highly conserved unique peanut and tree nut peptides by LC-MS/MS for multi-allergen detection[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 201-211.
- [13] 陈燕秋,侯捷,雷雯,李良君,徐仲杰,高慧敏. 气相色谱-质谱联用法检测 ^{13}C 标记葡萄糖的同位素丰度[J]. *同位素*, 2020, 33(5): 286-292.
- CHEN Yanqiu, HOU Jie, LEI Wen, LI Liangjun, XU Zhongjie, GAO Huimin. Determination of the isotopic abundance of ^{13}C -labeled glucose by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Isotopes*, 2020, 33(5): 286-292(in Chinese).
- [14] ZHOU W, YANG S, WANG P G. Matrix effects and application of matrix effect factor[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(23): 1-839-1-844.
- [15] 徐仲杰,雷雯,罗勇. 稳定同位素氘标记试剂的研究进展[J]. *化学试剂*, 2019, 41(6): 539-544.
- XU Zhongjie, LEI Wen, LUO Yong. Research progress of stable isotope deuterium labeling reagents[J]. *Chemical Reagents*, 2019, 41(6): 539-544(in Chinese).
- [16] MA S, TURINO G M, HAYASHI T, YANUMA H, USUKI T, LIN Y Y. Stable deuterium internal standard for the isotope-dilution LC-MS/MS analysis of elastin degradation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 440(2): 158-165.
- [17] LI Y, XU H, HE K, XIONG L, ZHANG C, WANG T, ZHANG C, CHEN M. Efficient synthesis of deuterium-labelled Danshensu for quantitative bioanalysis[J]. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2020, 325(1): 167-173.
- [18] 韩世磊,徐银,陈菊玲,杨立凤,张磊. 稳定同位素氘标记的去甲乌药碱的合成与表征[J]. *同位素*, 2021, 34(4): 317-324.
- HAN Shilei, XU Yin, CHEN Juling, YANG Lifeng, ZHANG Lei. Synthesis and characterization of stable isotope deuterium-labelled higenamine[J]. *Journal of Isotopes*, 2021, 34(4): 317-324(in Chinese).