

## 基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度测定方法研究

赵雅梦<sup>1,2,3</sup>, 徐增益<sup>1,2</sup>, 范若宁<sup>1,2</sup>, 解龙<sup>1,2</sup>, 侯静华<sup>1</sup>, 李良君<sup>1</sup>, 刘建军<sup>3</sup>, 雷雯<sup>\*1,2</sup>

(1.上海化工研究院有限公司, 上海 200062; 2.上海市稳定同位素检测及应用研发专业技术服务平台, 上海 200062; 3.上海交通大学医学院附属仁济医院 核医学科, 上海 200127)

**摘要:**近年来, 稳定同位素标记化合物, 尤其是同位素标记氨基酸在合成生物学、蛋白质组学、代谢组学等前沿科学研究中发挥着越来越重要的作用。建立了一种基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度检测方法, 以<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N-甘氨酸为例, 考察了样品浓度、质谱扫描张数等影响因素对同位素丰度计算结果的影响, 结果表明该方法具有良好的准确性和稳定性, 所需样品用量少, 操作简单, 有望成为一种简便、通用的同位素试剂质控方法; 也将为代谢组学、海洋学等同位素示踪技术应用研究提供数据支持。

**关键词:** 双标记氨基酸; 同位素丰度; 高分辨液质联用仪; 质量控制; <sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N-甘氨酸

**中图分类号:** O65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0083-06

**DOI:** 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0664

**Analysis of Isotope Abundance for Double-labelled Amino Acid with Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometer** ZHAO Ya-meng<sup>1,2,3</sup>, XU Zeng-yi<sup>1,2</sup>, FAN Ruo-ning<sup>1,2</sup>, XIE Long<sup>1,2</sup>, HOU Jing-hua<sup>1</sup>, LI Liang-jun<sup>1</sup>, LIU Jian-jun<sup>3</sup>, LEI Wen<sup>\*1,2</sup> (1. Shanghai Research Institution of Chemical Industry Co. Ltd., Shanghai 200062, China; 2. Shanghai Professional Technology Service Platform on Detection and Application Development for Stable Isotope, Shanghai 200062, China; 3. Department of Nuclear Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China)

**Abstract:** In recent years, stable isotope-labeled compounds, especially isotope-labeled amino acids are widely used in frontier scientific research such as synthetic biology, proteomics and metabolomics. An analytical method for the isotopic abundance calculation of <sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N double-labeled amino acids was established based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometer (LC-HRMS). Application conditions, sample concentration and the number of scanned mass spectra were investigated. Results showed that the method had good accuracy and stability, required less sample and was easy to operate. It is expected to be a simple and generalized method for quality control of isotope reagents, and also to support frontier scientific research such as fermentation engineering and metabolomics.

**Key words:** double-labelled amino acid; isotope abundance; liquid chromatography-high resolution mass spectrometer; quality control; <sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N-glycine

随着生命科学领域的迅速发展, 稳定同位素试剂尤其是同位素标记氨基酸在蛋白质组学、代谢组学等前沿科学研究中发挥着越来越重要的作用<sup>[1,2]</sup>。以稳定同位素标记氨基酸如<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-赖氨酸等为核心试剂的 SILAC 技术是蛋白质定量的重要手段, 广泛应用于分子标志物筛选、蛋白质翻译后修饰等研究<sup>[3-5]</sup>; 以<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-谷氨酰胺、<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-天冬氨酸等为示踪剂的代谢流分析技术可动态监测代谢物转化过程, 是近年来代谢机理研究的重要工具<sup>[6-8]</sup>。

同位素分布及丰度除了用于同位素试剂质量评价外, 其作为一个重要参数在代谢组学、发酵工程等科学研究中发挥的作用也愈发重要<sup>[9-12]</sup>。静电轨道阱、离子淌度等质谱新技术和 Python、R 语言等编程语言的发展使得同位素分布及丰度的分

析方法日益简便<sup>[13-15]</sup>。有机质谱法是同位素分布及丰度分析的重要工具<sup>[16-18]</sup>, 它是利用化合物同位素质量数的差异, 通过“质量簇”等算法完成同位素丰度的计算。郑波等<sup>[19]</sup>首次提出对质谱数据进行“质量簇”法归类处理, 计算得到了<sup>13</sup>C

收稿日期: 2023-10-17; 网络首发日期: 2024-04-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFF0701900); 上海市普陀区加快发展研发服务产业专项资金项目(202210-B01-05)。

作者简介: 赵雅梦(1994-), 女, 河南新乡人, 博士, 工程师, 主要研究方向为同位素分析及检测技术研究。

通讯作者: 雷雯, E-mail: leiwensrici@163.com。

引用本文: 赵雅梦, 徐增益, 范若宁, 等. 基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度测定方法研究[J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 83-88。

标记的美沙西汀同位素丰度,随后基于“质量簇法”的有机质谱法发展成为同位素丰度分析的主要方法。雷雯等<sup>[17]</sup>在此基础上,结合气质联用技术开发了针对血液等生物样品中氨基酸  $^{15}\text{N}$  同位素丰度的计算方法。盛立彦等<sup>[20]</sup>通过将“质量簇”法中的复杂计算步骤简化为线性方程式,建立了一种基于液相色谱-质谱联用仪的同位素丰度快速测定计算方法,在样品浓度 0.1 g/L 以上时,检测方法偏差  $\leq 0.2\%$  atom% D(与标准方法比),重现性  $\text{RSD} \leq 0.1\%$ 。高分辨质谱具有超高分辨率,可实现多种同位素标记模式峰的分离,近年来在同位素丰度计算方面的优势逐渐显现<sup>[21]</sup>。田甜等<sup>[22]</sup>建立了基于四级杆轨道阱高分辨质谱仪的氘标记化合物同位素分布与丰度检测方法,能够快速检测氘标记同位素分布和丰度,且所需试剂和分析物用量少。近年来随着前沿科学的发展,双标记化合物尤其是双标记氨基酸得以广泛应用。但目前国内双标记同位素试剂产品较少,缺乏相关的同位素丰度分析检测方法和质量评价方法。

以  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸( $^{13}\text{C}_2\text{H}_5^{15}\text{NO}_2$ )为例,考察样品浓度、质谱扫描次数等对同位素丰度测定的影响,建立了稳定、准确的同位素丰度计算方法,实现了  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$  同位素丰度的同时测定。此外,还将其应用于标记形式更为复杂的  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸的同位素丰度计算,结果表明此方法具有较高的准确性和稳定性,为双标记同位素试剂的质量控制提供了一种准确、简便的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Orbitrap Exploris 120 型高分辨液质联用仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);METTLER-XPE 型电子天平(瑞士梅特勒托利多集团);Vortex-5 型涡旋仪(中国其林贝尔仪器制造有限公司);Merck-Milipore Simolcity™型超纯水系统(德国默克公司)。

$^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸(同位素丰度:99%)、 $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸(同位素丰度:99.2%)(美国剑桥实验室);甲醇、甲酸(LC-MS 级,美国 Thermo Fisher 科技有限公司)。

### 1.2 标准溶液配制

准确称取 1.0 mg 氨基酸样品,加入 1 mL 50%甲醇水溶液,涡旋 30 s 充分混匀,配成浓度为

1.0 mg/mL 的储备液。准确移取适量储备液,用 50%甲醇水溶液稀释成 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$  的工作标准溶液。储备液和工作标准溶液均保存于 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.3 实验条件

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil GOLD VANQUISH 型色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.9  $\mu\text{m}$ );流动相:流动相 A 为甲醇,流动相 B 为含 0.1%甲酸的水溶液;洗脱条件:90% B 等度洗脱 5 min;流速:0.3 mL/min;进样量:1  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.3.2 质谱条件

离子源:ESI;电喷雾电压(Ion Spray Voltage):3 500 V;鞘气(Sheath Gas):5.34 L/min;辅助气(Aux Gas):9.35 L/min;离子传输管温度:320  $^{\circ}\text{C}$ ;扫描模式:全扫描(Full Scan)模式下正离子扫描;分辨率:12 000;扫描质荷比范围: $m/z$  70~500。

## 2 结果与讨论

### 2.1 双标记氨基酸同位素丰度计算

在使用高分辨液质联用仪进行同位素丰度计算前,首先需先确定仪器分辨率(式(1))是否满足分离各种标记形式质谱峰的需求。对于  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  标记化合物,其质量差值最小为 1 个  $^{13}\text{C}$  和 1 个  $^{15}\text{N}$  的精确质量数差(0.006 3 Da),所需的最大分辨率约为 32 K(按分子量最大的氨基酸色氨酸计算)。采用相同的计算方法对 C、D 标记及 N、D 标记氨基酸进行分辨率计算,所需最大分辨率分别为 70 K 和 2.2 K,小于仪器实际分辨率(120 K),可以实现所有标记形式的分子离子峰分离,满足同位素丰度计算的首要条件。

$$R = [(m1 + m2)/2]/(m1 - m2) \quad (1)$$

式中, $m1, m2$  分别代表对应化合物的质荷比。

此外,仪器质量轴偏差对于同位素丰度计算结果也具有较大影响。只有当仪器质量轴偏差小于各同位素异数体的相对同位素偏差时<sup>[14]</sup>,才能确保相邻峰之间无干扰,仪器质量轴偏差(IMD)和相对同位素偏差(ID)的计算如式(2)所示。

$$\text{IMD} = [ |M_{\text{theor}} - M_{\text{max}}| / M_{\text{theor}} ] \times 10^6 \quad (2)$$

式中, $M_{\text{max}}$  为重复进样 6~8 针中实测值与理论值偏差最大的质荷比; $M_{\text{theor}}$  为待测化合物的理论质荷比。

$$\text{ID} = [ ([MA_m B_n + H]^+ - [MA_{m-1} B_{n+1} + H]^+) / [MA_m B_n + H]^+ ] \times 10^6 \quad (3)$$

式中, A 和 B 分别代表被标记的两种元素;  $m, n$  代表同位素标记个数;  $[MA_m B_n + H]^+$  和  $[MA_{m-1} B_{n+1} + H]^+$  即为化合物中质量数最相近的两种同位素标记形式的质荷比。

根据式(3)计算可知对于  $^{13}C, ^{15}N$  标记、C、D 标记及 N、D 标记氨基酸, 其最大同位素偏差分别为 30、10 和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 满足偏差小于仪器质量轴偏差 ( $<5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的要求, 可参照 HG/T 5942—2021 标准<sup>[21]</sup>, 直接根据双标记氨基酸各同位素的信号强度进行丰度计算, 如式(4)所示。

$$E = \sum (n \cdot x_n) / n \quad (4)$$

式中,  $n$  为标记化合物同位素标记个数;  $x_n$  为标记化合物中对应标记个数的同位素分布百分比。

尽管如此, 在每次进样前仍需使用校正液对质量轴进行校正, 确保仪器质量轴稳定且仪器偏差小于各同位素异数体的相对同位素偏差。

## 2.2 同位素丰度分析方法研究

以  $^{13}C_2, ^{15}N$ -甘氨酸为例, 分别对样品浓度, 质谱扫描张数等可能影响同位素丰度检测结果的因素进行考察, 确定同位素标记氨基酸样品的最佳检测条件; 通过多次进样分析等对方法的准确性和稳定性进行考察。

### 2.2.1 LC-HRMS 谱图分析

在正离子模式下对  $^{13}C_2, ^{15}N$ -甘氨酸进行液质联用分析, 质谱图如图 1 所示, 由于双标记化合物可能存在未完全标记的情况, 因此在 ESI<sup>+</sup> 质谱图中可能存在  $[^{13}C_2H_5^{15}NO_2 + H]^+$ 、 $[^{13}CCH_5^{15}NO_2 + H]^+$ 、 $[^{13}C_2H_5NO_2 + H]^+$ 、 $[^{13}CCH_5NO_2 + H]^+$ 、 $[C_2H_5^{15}NO_2 + H]^+$ 、 $[C_2H_5NO_2 + H]^+$  这 6 种分子离子峰, 其精确质荷比可通过软件或原子精确质量计算。根据化合物的质谱图, 结合同位素丰度的计算方法即可完成同位素丰度的计算。

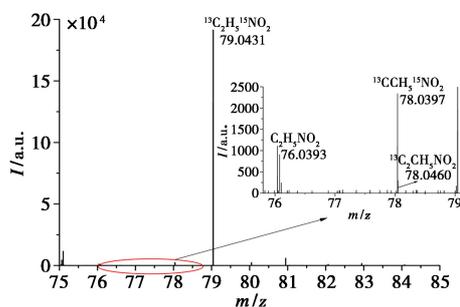


图 1  $^{13}C_2, ^{15}N$ -甘氨酸质谱图

Fig.1 Mass spectrum of  $^{13}C_2, ^{15}N$ -glycine

### 2.2.2 峰面积/峰强度计算对比

由式(4)可知同位素丰度是由同位素分布百分比和标记个数计算得到的, 峰面积和峰强度均可代表化合物的质谱响应, 进而得到不同同位素

标记模式分子离子峰的百分比用于同位素丰度的计算, 不同方式的计算结果可能存在较大差异, 因此考察了峰面积和峰强度两种不同标记形式百分比计算形式下双标记甘氨酸的同位素丰度, 重复测量 3 次考察计算方法的稳定性。

表 1 以峰面积和峰强度计算  $^{13}C_2, ^{15}N$ -甘氨酸同位素丰度的结果对比

Tab.1 Comparison of  $^{13}C_2, ^{15}N$ -glycine isotope abundances calculated as peak area and peak intensity

检测次数	计算依据	
	峰强度	峰面积
1	98.93	99.04
2	99.07	99.18
3	99.26	98.99
同位素丰度/(atom%)	99.08	99.07
相对标准偏差( $n=3$ )/%	0.14	0.08

结果如表 1 所示, 以峰强度计算得到的同位素丰度为 99.08%, 相对标准偏差为 0.14%, 以峰面积计算得到的同位素丰度为 99.07%, 相对标准偏差为 0.08%。两种计算方式得到的结果基本一致, 相对标准偏差均小于 0.2%, 说明稳定性良好。以峰强度计算简单便捷, 不需要对不同形式的分子离子峰进行提取、积分等步骤。因此, 后续实验中同位素丰度计算以峰强度为计算依据。

### 2.2.3 样品浓度

样品浓度是影响同位素丰度检测准确性和稳定性的关键因素, 选择合适的样品浓度十分重要。当样品浓度较低时, 部分标记形式的分子离子峰可能达不到检测阈值, 从而导致同位素丰度计算结果偏低; 而过高的样品浓度则容易造成质谱污染, 影响后续样品检测。分别对 0.1、0.2、0.5、0.8、1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $^{13}C_2, ^{15}N$ -甘氨酸进行液质联用分析, 重复测量 3 次, 根据同位素丰度值及相对标准偏差确定样品的最佳分析浓度。

如图 2 和表 2 所示, 当  $^{13}C_2, ^{15}N$ -甘氨酸浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 计算得到的同位素丰度值为 98.21%, 相对标准偏差为 0.28%, 这可能是由于样品浓度较低时, 含量较低的未完全标记化合物可能存在检测不到的情况, 从而影响同位素丰度的准确计算; 随着样品浓度增加, 同位素丰度计算值也随之增加; 当浓度增加至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 同位素丰度计算值趋于稳定 (99.03%), 相对标准偏差小 (0.01%), 且与试剂标示值 (同位素丰度: 99%) 基本一致。因此后续实验选择样品浓度为

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

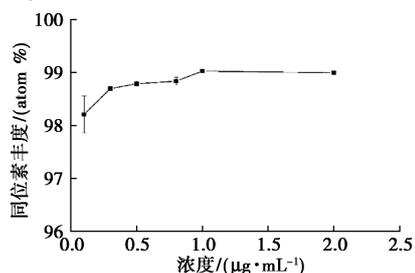


图 2 不同浓度下  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸同位素丰度

Fig.2 Isotope abundance of  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -glycine under different concentration

表 2 不同浓度下  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸同位素丰度值及其相对标准偏差

Tab.2 Isotopic abundance and RSD of  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -glycine at different concentration

样品浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	同位素丰度值/ (atom%)	相对标准偏差 ( $n=3$ )/%
0.1	98.21	0.28
0.3	98.70	0.03
0.5	98.79	0.04
0.8	98.84	0.07
1.0	99.03	0.01
2.0	99.00	0.05

### 2.2.4 质谱图扫描张数

质谱图扫描张数对于丰度计算结果准确性也可能存在一定影响,对浓度为  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸进行同位素丰度分析,分别取包含峰顶点在内的不同时间窗口,如图 3 中所标识窗口,质谱图叠加进行同位素丰度计算,结果见表 3,不同时间窗口下同位素丰度计算值相对标准偏差为 0.02%,平均丰度为 99.08%,说明质谱图扫描张数对同位素丰度计算值的影响不大。田甜等<sup>[22]</sup>研究表明,当质谱图分析数量为 10 时,结果的精密度和准确度可满足同位素丰度计算要求。因此本文中,质谱图选取条件为在包含峰顶点在内的时间窗口内随机取 10 张或以上质谱图进行叠加分析。

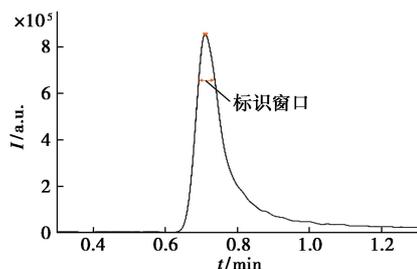


图 3  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸提取离子流图

Fig.3 Extraction ion chromatography of  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -glycine

表 3 不同时间窗口下  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸丰度值

Tab.3 Isotope abundance of  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -glycine within different time windows

时间窗口/min	扫描张数	同位素丰度值/(atom%)	
1	0.74	1	99.06
2	0.73~0.75	5	99.06
3	0.71~0.76	15	99.08
4	0.69~0.78	21	99.11
5	0.70~0.81	26	99.09
平均值/(atom%)		99.08	
相对标准偏差/%		0.02	

### 2.2.5 分子离子峰信号响应

各标记形式化合物的质谱峰强度与同位素丰度计算值的准确性密切相关,而质谱仪的质量歧视效应<sup>[23]</sup>可能会导致某些标记形式化合物的分子离子峰强度降低或未检出,从而影响同位素丰度值计算。由于质量歧视效应客观存在且无法被消除,因此拟通过对  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸天然同位素(即  $M+1$ ,  $M+2$ )分子离子峰的理论峰强度占比和实测值的比较,间接考察了高分辨的质量歧视效应。如表 4 所示,理论同位素峰强度占比和实测值的偏差  $<5\%$ ,间接说明质谱仪器的质量歧视效应较小,对于同位素丰度的计算影响较小<sup>[24]</sup>。因此,在同位素丰度计算时可忽略质量歧视效应,直接利用公式进行丰度计算。

表 4  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸天然同位素峰强度对比

Tab.4 Comparison of natural isotope peak intensities of  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -glycine

精确 质量数	理论峰 强度	理论峰强度 占比/%	实测峰 强度	实测峰强度 占比/%	偏差/ %
79.043 1	100	99.10	100	99.14	—
80.048 8	0.62	0.61	0.59	0.59	3.28
81.047 8	0.29	0.29	0.28	0.28	3.45

### 2.2.6 方法精密性

对浓度为  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸重复进样 6 次进行同位素丰度计算考察方法的稳定性。结果如表 5 所示,计算得到  $^{13}\text{C}$  丰度为 98.88%,  $^{15}\text{N}$  丰度为 99.30%, 相对标准偏差 (RSD) 均为 0.06%, 总同位素丰度为 99.02%, RSD 为 0.05%, 说明该方法精密性良好。

## 3 方法应用

为考察方法的普适性,还对标记形式更为复杂的  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸进行丰度计算。如表 6 所示,重复进样 3 次得到  $^{13}\text{C}$  平均丰度为 99.17%,

表 5  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -甘氨酸丰度值计算Tab.5 Isotope abundance of  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -glycine

分析次数	总丰度/ (atom%)	$^{13}\text{C}$ / (atom%)	$^{15}\text{N}$ / (atom%)
1	99.04	98.87	99.36
2	99.05	98.91	99.33
3	99.02	98.89	99.27
4	98.96	98.82	99.23
5	99.10	98.98	99.34
6	98.97	98.83	99.26
丰度平均值/(atom%)	99.02	98.88	99.30
相对标准偏差/%	0.05	0.06	0.06

$^{15}\text{N}$  平均丰度为 99.31%, 总同位素丰度为 99.21%, 与试剂同位素丰度标示值(同位素丰度值>99.2%) 基本一致, 相对标准偏差<0.04%, 进一步说明方法具有较高的准确性和稳定性, 适用于双标记氨基酸的丰度计算, 也将为双标记同位素试剂提供了一种新的质量控制方法。

表 6  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸丰度值计算Tab.6 Isotope abundance of  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Lysine

	总丰度/ (atom%)	$^{13}\text{C}$ / (atom%)	$^{15}\text{N}$ / (atom%)
1	99.20	99.16	99.32
2	99.19	99.17	99.27
3	99.23	99.19	99.34
丰度平均值/(atom%)	99.21	99.17	99.31
相对标准偏差/%	0.02	0.04	0.02

#### 4 结论

本文建立了基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度检测方法;通过考察样品浓度、扫描张数、信号响应等条件,对同位素丰度的分析方法进行了系统研究,结果表明该方法具有良好的准确性和稳定性,适用于双标记氨基酸的丰度测定。此外,该方法所需样品用量少,无需衍生化等前处理,操作简便,可同时得到多种同位素丰度,对于稳定同位素试剂质量控制、同位素示踪技术研究等应用具有一定的指导作用。

#### 参考文献:

[1] LIANG L, SUN F, WANG H, et al. Metabolomics metabolic flux analysis and cancer pharmacology [J]. *Pharmacol. Therapeut.*, 2021, **224**: 107-127.

[2] JANG C, CHEN L, RABINOWITZ J D. Metabolomics and isotope tracing [J]. *Cell*, 2018, **173**(4): 822-837.

[3] MULLEN A R, WHEATON W W, JIN E S, et al. Reduc-

tive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria [J]. *Nature*, 2012, **481**(7381): 385-388.

- [4] KIM Y E, KIM E K, SONG M J, et al. SILAC-based quantitative proteomic analysis of oxaliplatin-resistant pancreatic cancer cells [J]. *Cancers*, 2021, **13**(4): 724.
- [5] CHOI S, ENGELKE R, GOSWAMI N, et al. Proteomic profiling of metformin effects in 3T3-L1 adipocytes by SILAC-based quantification [J]. *Proteomics*, 2022, **22**(11/12): 2100-2106.
- [6] KAMPHORST J J, CHUNG M K, FAN J, et al. Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate [J]. *Cancer Metabol.*, 2014, **2**(1): 23.
- [7] POILLET-PEREZ L, XIE X, ZHAN L, et al. Autophagy maintains tumour growth through circulating arginine [J]. *Nature*, 2018, **563**(7732): 569-573.
- [8] LEBOEUF S E, WU W L, KARAKOUSI T R, et al. Activation of oxidative stress response in cancer generates a druggable dependency on exogenous non-essential amino acids [J]. *Cell Metabol.*, 2020, **31**(2): 339-350.
- [9] WANG Y, WONDISFORD F E, SONG C, et al. Metabolic flux analysis-linking isotope labeling and metabolic fluxes [J]. *Metabolites*, 2020, **10**(11): 447-467.
- [10] WANG R, YIN Y, LI J, et al. Global stable-isotope tracing metabolomics reveals system-wide metabolic alternations in aging *Drosophila* [J]. *Nat. Commun.*, 2022, **13**(1): 3518.
- [11] FERNANDEZ-GARCIA J, ALTEA-MANZANO P, PRANZINI E, et al. Stable isotopes for tracing mammalian-cell metabolism in vivo [J]. *Trend. Biochem. Sci.*, 2020, **45**(3): 185-201.
- [12] DUCKER G S, CHEN L, MORSCHER R J, et al. Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway [J]. *Cell Metabol.*, 2016, **23**(6): 1140-1153.
- [13] MILLARD P, DELEPINE B, GUIONNET M, et al. IsoCor: Isotope correction for high-resolution MS labeling experiments [J]. *Bioinformatics*, 2019, **35**(21): 4484-4487.
- [14] KNOLHOFF A M, CALLAHAN J H, CROLEY T R. Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation: Capabilities for non-targeted analyses [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 2014, **25**(7): 1285-1294.
- [15] LLUFRIO E M, CHO K, PATTI G J. Systems-level analysis of isotopic labeling in untargeted metabolomic data

- by X<sup>13</sup> CMS [J]. *Nat. Protocol*, 2019, **14**(7): 1 970-1 990.
- [16] 杜晓宁, 宋明鸣, 赵诚. 质谱检测用同位素 <sup>15</sup>N 标记样品的处理方法[J]. 原子能科学技术, 2009, **43**(z1): 59-63.
- [17] 雷雯, 侯捷, 张维冰, 等. 血液中 <sup>15</sup>N 标记氨基酸同位素丰度[J]. 分析化学, 2015, **43**(10): 1 465-1 471.
- [18] LI J, PANG Z, YANG G M, et al. Million-year-old groundwater revealed by krypton-81 dating in Guanzhong Basin [J]. *Chinese Sci. Bull.*, 2017, **62**(17): 1 181-1 184.
- [19] 郑波, 杜晓宁, 张维冰, 等. 美沙西汀-甲氧基-<sup>13</sup>C 的同位素丰度和化学纯度表征[J]. 山东化工, 2013, **42**(5): 27-31.
- [20] 盛立彦, 李美华, 杜晓宁. 敌百虫-D<sub>6</sub> 同位素丰度的快速测定及计算[J]. 同位素, 2020, **33**(5): 304-311.
- [21] 范若宁, 赵雅梦, 王储尧, 等. 一种基于高分辨液质联用仪的 <sup>13</sup>C 标记葡萄糖同位素丰度检测方法[J]. 化学试剂, 2023, **45**(8): 122-126.
- [22] 田甜, 刘书好, 李双青, 等. 高分辨质谱测定氘标记化合物同位素分布与丰度的方法研究[J]. 分析化学, 2021, **49**(4): 563-570.
- [23] KNOLHOFF A M, CALLAHAN J H, CROLEY T R. Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation; Capabilities for non-targeted analyses [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 2014, **25**(7): 1 285-1 294.
- [24] KIND T, FIEHN O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular obtained by accurate mass spectrometry [J]. *BMC Bioinforma.*, 2007, **8**(105): 1 471-1 491.