

核磁共振波谱在分析化学领域应用的新进展

王桂芳^{a,b} 马廷灿^{a,b} 刘买利^{*,c}^(a) 中国科学院国家科学图书馆武汉分馆 武汉 430071)^(b) 中国科学院武汉文献情报中心 武汉 430071)^(c) 中国科学院武汉物理与数学研究所 波谱与原子分子物理国家重点实验室 武汉磁共振中心 武汉 430071)

摘要 发展检测物质的化学组成、结构及其变化的新方法、新技术是分析化学的核心科学问题之一。波谱分析(光谱、质谱及核磁共振)是分析化学中常用的主要仪器分析手段。核磁共振能在液态、固态和气态条件下提供复杂体系中分子组成、原子分辨的三维结构、相互作用和动态过程等丰富信息,在生物分析中发挥着越来越重要的作用。本文将综合阐述核磁共振技术在生物大分子体系、复杂体系以及与其他分析手段联用的进展情况。

关键词 核磁共振; 分析化学; 复杂体系; 生物大分子

Recent Progress in the Nuclear Magnetic Resonance Applications in Analytical Chemistry

Wang, Guifang^{a,b} Ma, Tingcan^{a,b} Liu, Maili^{*,c}^(a) Wuhan Branch of the National Science Library, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)^(b) Wuhan Documentation and Information Center, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)^(c) State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Center for Magnetic Resonance, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract Development of new and effective methods for measuring chemical composition, molecular structures, interactions and dynamics is one of the major issues of analytical chemistry. Spectral analysis (spectroscopy, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance) is the most commonly used analytical tool to address these issues. Nuclear magnetic resonance is capable to determine structure for small molecules, macromolecules and complicated biological systems, and it is considered as the most powerful tool in analytical chemistry. This paper reviewed recent progress of nuclear magnetic resonance in biological macromolecules system, complex system and the hyphenated method applications in analytical chemistry. In the first part, we gave a brief introduction of nuclear magnetic resonance technology and its applications in analytical chemistry field. The detailed application descriptions of nuclear magnetic resonance technology have been summarized from part two to part four. In the second part, we summarized the applications of nuclear magnetic resonance technology in biological macromolecules system, including the main nuclear magnetic resonance technology development in three dimensional protein structural analysis field and its applications; the related methods and applications in the dynamic study of protein complex, the in-cell nuclear magnetic resonance labeling methods development history and its applications, and also the methods of nuclear magnetic resonance technologies in studying the interactions of protein and drugs. In the third part, the qualitative and quantitative analysis of nuclear magnetic resonance technologies in complex systems has been summarized, including the applications in the metabolomics and the applications in the field of food quality and safety. In the fourth part, we briefly introduced the joint applications of magnetic resonance technologies and other separation methods such as chromatography and spectroscopic ways. The conclusions of nuclear magnetic resonance technology applications and the suggestions of future developing directions were stated in the last part.

Keywords nuclear magnetic resonance; analytical chemistry; complex system; biomacromolecules

1 引言

核磁共振技术作为分析物质的化学组成、结构及其变化的重要手段之一,可深入探测物质内部而不破坏样品,并具有准确、快速和对复杂样品不需预处理就能进行分析等特点。经过60多年的发展,核磁共振技术形成

了两个主要学科分支,即核磁共振波谱(NMR)和磁共振成像(MRI)。随着磁场强度的提高,信号检测(硬件和信号处理)、脉冲实验、自旋标记等技术的进步,困扰核磁共振的低灵敏度的问题已大大改善。现今,核磁共振已广泛应用于化学、生物学、医学、食品以及材料科学等

* E-mail: ml.liu@wipm.ac.cn; Tel: 0086-027-87197305

Received June 25, 2012; published August 10, 2012.

Project supported by the Major Special Project of Scientific and Technological: Major Creation of New Drugs (No. 2010ZX09401-305-07) and the National Natural Science Foundation of China (No. 21175127).

项目受“重大新药创新”科技重大专项(No. 2010ZX09401-305-07)和国家自然科学基金(No. 21175127)资助。

诸多学科领域,成为在这些领域开展研究工作的有力工具,成为一种不可或缺的分析与测量手段.本文主要涉及 NMR 波谱部分,综述了其在分析化学领域方面的最新进展,包括应用于生物大分子体系,复杂体系的定性与定量分析,与其他分离手段(色谱)手段的联用,并提出结论及对未来的展望.

2 NMR 技术在生物大分子体系的应用

2.1 蛋白质三维结构解析

蛋白质的分子结构是蛋白质执行生物功能的基础,解析蛋白质的三维结构有助于在原子分子水平上认识生命活动的本质.目前蛋白质的结构测定方法主要是 X 射线晶体衍射和 NMR 技术. NMR 技术在液态环境下测定蛋白质的结构,可以对蛋白质所处环境的 pH 值、盐浓度、温度等进行灵活调控,因而比 X 射线晶体衍射更接近于生理环境.

Wüthrich 教授研究组最早把 NMR 用于蛋白质结构的测定,发展了一系列结构测定方法,并于 1985 年获得了首个液态中蛋白质的三维结构^[1]. Wüthrich 教授因为对蛋白质结构的 NMR 研究的贡献而获得 2002 年诺贝尔化学奖.蛋白质结构的 NMR 测定包括三个步骤:第一,通过蛋白质表达、自旋(¹³C, ¹⁵N)标记、分离与纯化技术获得适合结构测定的蛋白质样品;第二,通过 NMR 实验收集一系列多核多维 NMR 谱,并在此基础上进行蛋白质主链与侧链基团中的 ¹H/¹³C/¹⁵N 核归属,确定信号与蛋白质分子各个核之间的对应关系,得到蛋白质的二级结构.进而从 NMR 谱中提取核间 Overhauser 效应 (NOE)、自旋-自旋耦合常数(*J*)、残余偶极-偶极耦合常数(RDC)等几何约束参数;第三,以这些约束条件为基础,采用分子动力学模拟优化,得到蛋白质的三维结构.

NMR 技术最初主要用于分子量较小的水溶性蛋白质结构测定^[1-9].其主要原因是随着蛋白质分子量的增大,除谱线数目急剧增多归属难度增加之外,蛋白质分子整体运动性能减慢,谱线增宽,导致分辨率和灵敏度同时降低.提高磁场强度是提高灵敏度和分辨率的最有效途径.因此,生物 NMR,特别是蛋白质 NMR 研究的需求,不断促进高稳定性、高均匀性和高强度的磁体技术的发展.目前,质子(¹H)共振频率高达 1 GHz 的 NMR 谱仪已经市场化.近年来高灵敏的探头技术也取得了长足发展,比如低温探头可使灵敏度提高 2~4 倍,已经成为高磁场 NMR 谱仪的标准配置.

除上述硬件技术的快速发展外,新型脉冲实验方法和数据法处理分析方法,以及基于生物工程的选择性和非选择性蛋白质自旋(同位素)标记技术也取得了快速发展.1997 年蛋白质 NMR 研究技术有两个突出进展.其一是 Wüthrich 研究组建立的横向弛豫优化谱(TROSY)二维实验方法.该方法能窄化谱线、提高 NMR 技术的分辨率与灵敏度^[10],使得 NMR 技术在研究大分子量蛋

白质方面迈出了重要的一步,显著提高了 NMR 图谱的质量.目前, TROSY 技术已被整合到 NOESY 等实验中^[11,12].在 TROSY 基础上发展起来的交叉弛豫极化转移增强(CRINEPT)^[13],交叉饱和转移(CST)^[14]等一系列技术有助于提高信号灵敏度.其二是 Bax 研究组发展的残余偶极耦合(RDC)技术^[15,16].RDC 能够提供蛋白质分子中 HN—H、C—H 等化学键(矢量)相对于外磁场的取向,也包括不同蛋白质分子间的相对取向,为蛋白质结构提供了 NOE 外的另一种约束参数,提高了溶液 NMR 蛋白质结构的分辨率.

顺磁弛豫增强(PRE)技术是近年来蛋白质 NMR 方法学研究的又一重大突破^[17-19].PRE-NMR 可用于测定 1.5~2.4 nm 的远程结构信息,以及蛋白质瞬态结构和瞬态相互作用信息.最近, Chou 等^[20]发展了以化学位移(CS)、RDC 和 PRE 约束为基础,结合分子碎片重排算法(MFR),测定蛋白质三维结构的新方法,并成功解析了分子量为 34 kDa 的线粒体非偶联膜蛋白(UCP2)主链的三维结构.

由于氘原子(²H)具有很小的旋磁比和很低的弛豫效率,能够有效提高分辨率.因此,蛋白质中氢原子的氘代技术是蛋白质 NMR 研究的热点领域.加拿大 Kay 等^[21]发展的 Val, Leu, Ile 甲基质子化的高度氘代蛋白质制备技术、日本 Kainosho 等^[22]发展的侧链质子选择性氘代技术近年来受到广泛关注,已成功的用于大分子量蛋白质的解析.如 Kay 研究组利用这些新的蛋白质标记技术与脉冲程序解析了分子量为 82 kDa 的苹果酸合酶 G 的溶液结构^[21,23].目前,在常规的结构生物学实验室,都可以完成分子量约 20 kDa 的蛋白质结构测定.在有强力 NMR 技术支撑的实验室,可以对更大分子量的蛋白质及其复合物进行溶液结构的研究^[24-26],甚至研究分子量大于 900 kDa 的蛋白复合物中的部分结构^[27].

对于某些蛋白质的二聚体、多聚体、可溶于表面活性剂中的膜蛋白以及蛋白质-核酸复合物等,由于它们的氨基酸残基数目不大,谱峰重叠现象不严重,在应用 NMR 技术来进行结构解析时通常只需要解决横向弛豫的问题.氘代技术、特殊标记结合 TROSY 脉冲技术,可以较好的解决此类问题,实现大分子量蛋白质化学位移的归属和结构简析^[21].Wüthrich 研究组结合这些技术解析了大肠杆菌外膜蛋白 OmpX 与 DHPC 结合后形成的分子量为 60 kDa 的蛋白质的整体折叠状态^[28].他们首先利用 ²H, ¹³C, ¹⁵N 标记技术制备蛋白质样品,然后采集 TROSY 类型的 3D 谱图,得到主链化学位移的归属,并结合 ¹⁵N-NOESY-HSQC 谱图计算出了该蛋白质的整体折叠状态.在上述研究的基础上,该研究组制备了 ²H, ¹³C, ¹⁵N 整体标记背景下选择性氘代 Ile- δ^1 , Leu- $\delta^{1,2}$, 和 Val- $\gamma^{1,2}$ 甲基基团的 OmpX 样品^[24],并整合 TROSY 技术与传统的 H(CC)(CO)NH-TOCSY 和 (H)CC(CO)NH-TOCSY 实验,得到了这几个特殊标记的甲基基团的归

属^[29]; 随后应用 ^{13}C 标记得到末端甲基 Val 和 Leu 的立体异构归属^[30]; 基于 3D ^{13}C -NOESY-HSQC 和 ^{15}N -NOESY-HSQC 实验中得到有关甲基与甲基, 酰胺与酰胺以及甲基与酰胺之间的 NOE 距离约束, 结合二面角等约束, 得到了该蛋白的高分辨三维结构^[31].

虽然以上方法为 NMR 技术在蛋白质结构解析方面带来了突破性的进展, 但氘代与特殊标记技术成本比较昂贵, 样品制备困难. 针对这一情况, Yang 等提出了一种非氘代蛋白质样品制备技术, 仅需使用 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记就可以通过四维 NOESY 实验和相应的数据处理方法, 解析单体分子量达到 42 kDa, 选择性标记多聚体分子量达到 65 kDa 的蛋白质结构^[32-34]. 另外, NMR 技术还能与 X 射线晶体衍射结合使用, 在筛选结晶条件及解析复杂的蛋白质三维结构方面具有独特的优势. Zhang 等利用这种技术解析了多个蛋白质复合物结构^[35].

NMR 硬件、标记方法、实验方法以及数据处理方法等的综合发展(如图 1 所示), 极大的提高了实验灵敏度, 拓宽了 NMR 技术的应用领域.

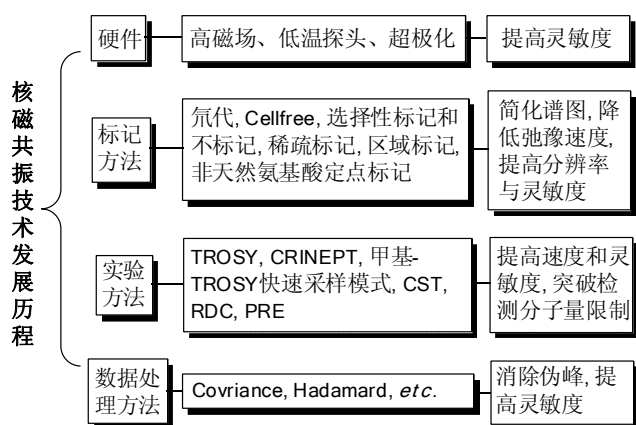


图 1 NMR 技术的发展历程

Figure 1 The development of NMR technology

The figure described the development of NMR technology on equipment, label methods, experimental methods, and data analysis methods

2.2 蛋白质复合物的动力学研究

蛋白质往往是与其他蛋白质或生物分子形成蛋白质复合物而执行功能的. 蛋白复合物执行功能的过程中, 经历一个相互接触、结构变化、然后相互分离的过程. 在这个过程中, 瞬态弱相互作用非常普遍, 结构域之间的相互作用非常复杂, 其结构难以用一般的方法来测定. NMR 特别适合研究瞬时存在、不稳定的复合物, 对于溶液中蛋白复合物的研究具有独特的优势, 能很好的描述蛋白质肽链的动力学特征.

蛋白质复合物结构解析中最重要的是确定它们之间的相互作用界面. ^1H - ^{15}N -HSQC 滴定实验可以在接近生理条件下确定蛋白质相互作用界面, 该方法十分灵敏, 能检测到非常弱的蛋白质之间的相互作用. 两维

NOE 特别适合蛋白质与肽之间的相互作用研究, 但是该方法为了实现 Overhauser 效应的转移, 一般只适合分子量大于 50 kDa 的蛋白质的研究. TROSY、CRINEPT、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 过滤技术^[36,37]、残余偶极耦合技术(RDC)^[15]、顺磁弛豫增强技术^[19]、NMR 弛豫弥散技术^[37,38]等都已用到了复合物的研究中.

NMR 弛豫弥散技术(relaxation dispersion)是蛋白质动力学研究的重要手段之一, 该技术是 Kay 等发展起来的, 可用于蛋白质折叠过程中间体的测定^[37], 通过测定物质之间的化学交换快慢来研究蛋白质的结构与动力学过程^[37,38]. 2010 年, Kay 研究组用弛豫弥散技术观测到脂肪酸结合蛋白 FBP11 的 FF 结构域在折叠过程中先瞬间形成中间态, 然后再过渡到稳定态结构^[39]. Mittermaier 研究组利用弛豫弥散技术测定了 PBX-HD 的折叠行为^[40]. 应用顺磁弛豫增强(PRE)技术不仅能获得远程结构信息, 也能获得蛋白质的动态结构变化来揭示蛋白质分子之间的瞬态相互作用^[17-19]. 顺磁弛豫增强技术测定动力学过程的时间尺度为纳秒到微秒量级, 与弛豫弥散技术测定的时间尺度微秒至毫秒量级互为补充, 是研究蛋白质复合物及其动力学的主要方法.

2.3 In-cell NMR

细胞内环境非常复杂, 大分子的浓度超过 300 g/L^[41], 与通常研究的理想稀溶液之间存在巨大的差别. 然而, 直到最近, 大多数蛋白质的研究仍旧是在体外稀溶液中进行的, 虽然能得到很好的数据, 但由于研究条件与实际生理条件差别很大, 实验结果难以反映真实的生理环境下的情况. In-cell NMR 为在生理条件下研究蛋白质提供了一种可能^[42].

细胞内的蛋白质核磁共振信号在 40 年前就被首次观察到^[43], 但是直到近 10 年来, 由于同位素富集与标记技术的发展使得我们能够比较容易的把蛋白质从其它细胞组分中区别开来, In-cell NMR 才引起广泛的关注^[44,45]. 在原核细胞中获得这些蛋白质的最广泛使用的方法是直接在大肠杆菌等细胞中超量表达这些蛋白^[46-52]. 然而, 蛋白质在真核细胞中的表达水平太低, 难以达到 NMR 实验对样品量的要求, 针对这种情况, 通常采用易位^[53]或显微注射^[54-56]的方法把同位素标记的蛋白输送到真核细胞中. 但显微注射通常只适合于比较大的细胞如卵母细胞(细胞直径约为 1 mm)等^[57]. 虽然 In-cell NMR 近年来有较大的发展, 但在所有报道的液体 in-cell NMR 研究中, 其中目的蛋白质的 NMR 线宽 (^1H , ^{13}C , ^{15}N)都是窄到足以让传统的高分辨率液体核磁共振能检测到其信号. 而这样的蛋白质屈指可数, 目前报道的只有 GB1, NmerA 和 TTHA 三个分子量小于 10 kDa 的蛋白质, 绝大部分蛋白质, 包括很多分子量同样小于 10 kDa 的蛋白质不能用传统的核磁共振方法获得高分辨谱^[49,50,58,59]. In-cell NMR 目前还处于起步阶段, 需要大力发展新的标记方法, 脉冲序列和快速采样及信

号处理方法以克服灵敏度低和背景信号干扰等问题. In-cell NMR 技术的发展历程概述如下(如图 2 所示). In-cell ^{19}F 标记技术具有灵敏度高和基本无背景信号干扰的优点. 对于小分子量蛋白, 可以采用氟代的氨基酸类似物的标记方法, 而对于分子量较大的蛋白质, 则可采用氟代的非天然氨基酸的定点标记方法^[50].

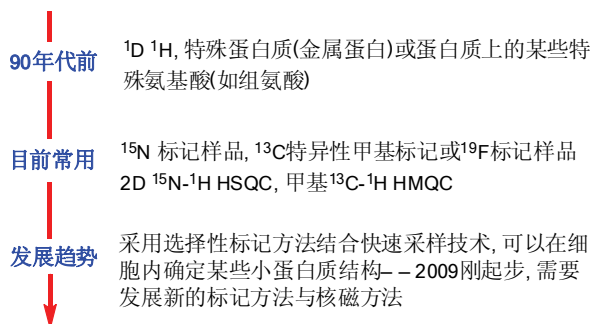


图 2 In-cell NMR 的发展历程

Figure 2 The development of in-cell NMR methods

2.4 蛋白质与药物之间的相互作用研究

当蛋白质与药物发生作用时, 化学位移、弛豫速率、NOE 效应等参数都会发生变化, NMR 技术通过检测这些参数的变化来确定蛋白质与药物之间的相互作用. 用 NMR 技术来研究蛋白质与药物之间的相互作用能探测很广的离解常数(K_D)范围(大于 $100 \mu\text{mol/L}$), 尤其适合分子间的弱相互作用研究. 而且与其它方法相比, NMR 技术可以确定蛋白质与药物分子的结合位点.

用 NMR 研究蛋白质与药物的相互作用方法灵活多变, 但就其检测对象而言, 可简单的划分为药物检测与蛋白质检测.

在以蛋白质为检测对象的研究中, 可以通过比较药物加入前后蛋白质的 NMR 参数变化来判断蛋白质与药物的相互作用情况. 1996 年, Abbott^[60]实验室提出的 SAR-by-NMR 方法, 通过比较加入药物前后的谱图变化, 来确定蛋白质与小分子是否存在相互作用以及相互作用的强度. 该方法可广泛用于药物筛选^[61], 这种高通量筛选可以找到大量药物与靶蛋白相结合的结构片段, 结合其他手段对药物进行改造, 对药物的设计和药物库的选择具有很好的指导作用. 同时, 这种方法还能观察到药物与蛋白质之间的 NOE 效应, 确定蛋白质与药物相互作用的界面以及它们的空间结构变化, 进一步指导药物的设计. 但这种方法需要同位素标记以及毫克级高纯度蛋白样品来获得 NMR 信号, 成本高、周期长, 并且对蛋白质的分子量也有限制.

在以药物为检测对象的研究中, 可以通过比较蛋白质加入前后药物的 NMR 参数变化来判断蛋白质与药物的相互作用情况. 药物小分子与蛋白质结合以后, 化学位移、纵向和横向弛豫速率、信号半峰宽等都会产生显著的变化. 这种方法不需要了解蛋白质的结构信息, 不需要同位素标记, 成本相对较低, 并且能对分子量较大

的蛋白质进行研究. 常用的 NMR 检测方法包括 NOE 法、Water-LOGSY 法^[62]以及饱和转移差谱(STD)法^[63,64]等. STD 是最为普遍且行之有效的方法之一, 它结合 NOE 效应和选择性脉冲, 通过 ^1H 差谱来研究蛋白质与药物的相互作用. 近年来, 已得到广泛应用. STD 技术已用于检测了药物与人源鼻病毒蛋白的相互作用^[65]以及 RNA 与药物的相互作用^[66]; STD 技术与魔角旋转技术相结合, 还可用于固体麦胚凝絮素与多糖的结合^[67].

3 复杂体系的定性与定量分析

3.1 在代谢组学方面的应用

1999 年, Nicholson 在其近 20 年的生物代谢复杂系统研究的基础上提出了代谢组学的概念, 指出代谢组学就是生物体系因刺激或基因改变而导致的代谢产物随时间的变化^[68]. 基于 NMR 技术的代谢组学研究主要包含以下几个步骤: 首先针对要解决的问题, 设计实验方案, 采集足够数量的样本; 然后进行核磁共振波谱数据采集和对系列 NMR 谱进行统计分析, 从而提取不同组别之间代谢物种类和含量的相对变化信息. 代谢组学研究主要采用一维核磁共振谱、横向时间加权谱以及扩散加权谱来选择性的检测代谢物的信号^[69], 信号经过谱图处理、分段积分以及数据归一化等步骤后, 再通过主成分分析^[70]以及聚类分析^[71]等, 建立数据模型, 然后进行交叉验证, 并归属变化的代谢物.

NMR 分析生物体液等混合物样品时, 样品的前期处理简单, NMR 技术检测速度快, 本身不会破坏样品, 而且 NMR 谱图能提供丰富的分子结构与动力学信息, 因而在代谢组学各个领域(如药物开发、毒理学、病理学、营养代谢组学以及功能基因组等)的研究中得到了广泛的应用^[72-75].

在药物开发过程中, 代谢组学能进行早期活体毒理测试, 为药物分子筛选提供依据. Nicholson 研究组将体液的 NMR 谱分解成了一系列与特定的器官毒性相对应的“生物标记物窗口”, 可以通过简单的 $1\text{D } ^1\text{H}$ NMR 谱图获取毒理信息^[76]. 在病理学的研究方面, Wang 等研究了血吸虫病对啮齿动物尿液代谢的影响, 结果发现血吸虫不仅扰乱了体内三羧酸循环等代谢过程, 对肠道菌群的代谢也产生了很大的影响^[77]. 在营养代谢组学方面, Solanky 等对食用含有(结合态或非结合态)大豆异黄酮食物的女性的尿液进行了检测, 结果发现, 大豆异黄酮的摄入者尿液中的氧化三甲胺升高^[78]. Wang 等对持续饮用欧洲黄菊的志愿者的尿液进行了分析, 研究结果表明, 菊花的抗菌作用对人体肠道菌群产生了一定的影响, 导致了马尿酸和苯乙酰基谷酰胺含量增加了, 而菊花的抗氧化作用则导致了尿液中的肌酸酐的下降^[79].

3.2 NMR 在食品质量与安全方面的应用

随着生活水平的提高, 无论是生产者还是消费者,

对食品性价比与稳定性要求也越来越高,因而需要寻求好的技术手段来测定与评价食品的质量.食品体系往往是复杂而不均匀的,很多方法都不能很好的用于食品检测中.NMR技术穿透能力强,不受样品厚度的影响,是一种无损、安全、有效的检测方法,在食品质量与安全检测中有良好的应用前景.目前,在食品检测中,NMR技术主要用于常量成分的检测,如水分含量、淀粉、脂类物质以及其他成分的分析;NMR技术也可以用来测定食品成分的分子结构,如糖、蛋白质与氨基酸的结构测定等;NMR技术还可以实施对水果品质的无损检测.

水分的含量高低及结合状态对食品的品质与稳定性有非常重要的影响,是食品加工需要考虑的重要因素.NMR技术能通过测定食品中的水分子氢核的纵向弛豫时间 T_1 与横向弛豫时间 T_2 来推测食品的相关特性,游离水流动性较好,具有较大的 T_2 ,而当水与底物结合时,流动性变差, T_2 降低.Bertam等运用低脉冲场NMR技术研究了DFD肉和PSE肉在10个月冻藏过程中水分活度和分布的变化情况,实验结果表明,随着冷冻时间的增加,猪肉中自由水的含量增加^[80].Lucas等测定了面包在预冻和冰冻两个过程中水含量与冰含量的变化情况,研究结果发现,局部冰含量在冻结过程中成比例的减少^[81].Kuo等用NMR技术测定了在常温下贮藏了10 d的,分别由生面团与熟面团制成的干酪的水分活度,结果表明,两者的水分活度都增加了,但是熟面团干酪的水分活度小于生面团干酪^[82].蛋白质的变性和结构变化与水分活度变化密切相关,NMR技术对食品贮藏过程引发的结构变化而导致的水分迁移非常敏感,可广泛用于食品的存储过程中的质量检测.

在脂肪分析中,NMR技术是唯一能取代固体脂肪指数(SFI)分析,有潜在用途的分析方法.目前已经形成国际标准,在国外应用得较为广泛.Rudi等利用NMR技术对焦糖进行了复合弛豫分析,在同一时间测定了 T_1 和 T_2 ,一步确定了焦糖生产过程中的油水含量^[83].Kokias等利用NMR和静光散射技术测量了经过加热、酸化和固蛋白处理的水包油乳化体系中的液滴尺寸^[84],研究结果表明,该技术能广泛用于多种乳制品的液态油的测量.Bertram等用NMR,测定了两种含不同量长链脂肪酸的奶酪在冷却过程中的弛豫时间,结果发现在脂肪的结晶峰值17~22 °C时,两种奶酪的 T_2 都发生了明显的变化^[85].研究表明, ^1H NMR技术可用于测定奶酪的相转变.

聚合物(面包、脆点心、麦芽糖糊等)由玻璃态转变为橡胶态时,质子基团的运动频率增加,引起弛豫时间 T_1 和 T_2 的改变,因而通过NMR技术来测定 T_1 , T_2 的变化,从而确定转变温度(T_g)是一种非常有效的方法.而且NMR的测量精度高、对样品的破坏性小,比差示扫描量热法(DSC)、热机械法(TMA)等常用的测量 T_g 的方法具有更大的优势.Ruan等利用NMR技术测定了无定

型麦芽糖的玻璃化温度,研究结果发现 T_1 温度曲线和 T_2 温度曲线的交点即为相转变点所对应的温度 T_g ^[86].Pitombo等研究了新鲜大西洋马鲛鱼的玻璃化转变温度,他们利用 T_2 与温度的关系发现了两个温度转折点,即冻结自由水与结合水融点^[87].

在淀粉分析中,NMR技术主要用来研究淀粉的颗粒结构、糊化特性和动力学、分子迁移以及变性淀粉取代度等.由于淀粉的无定型区与结晶区的化学位移与弛豫时间不同,因而可以通过NMR技术对其进行研究.Atichokudomachai等利用NMR技术和X射线检测了木薯淀粉酸化后的双螺旋结构变化,结果发现,随着水解时间的增加,双螺旋结构增加^[88].在淀粉糊化过程中,水分子的移动性降低, T_1 与 T_2 变短,易于用NMR技术来进行检测.Tananuwong等通过测定普通玉米、蜡质玉米、豌豆与土豆的 T_2 ,结果发现,糊化过程中出现两个不同的 T_2 值,并认为糊化过程中水存在“自由”与“结合”两种状态^[89].利用NMR技术,还可以测定不同化学基团的特征波峰,从而确定变性淀粉的取代度.Elo-maa等利用 ^1H NMR表征了醋酸酐改性后的淀粉的结构变化^[90].目前,利用 ^1H NMR测定变性淀粉中羟丙基的含量,已经成为一种国际通用标准.

目前,NMR技术在食品品质鉴定方面也得到了广泛应用.如利用NMR技术可以鉴别酒类、肉类以及油脂类食品的品质优劣.王乐等^[91]利用NMR技术测定了地沟油、泔水油、花生油、菜籽油以及大豆油在不同温度下的固体脂肪含量(SFC),结果发现,食用油的SFC值几乎为零,而杂油的SFC值很高,这一方法可以用于鉴别食用植物油的掺伪现象以及废油脂的掺入量.韩兴林等^[92]应用NMR技术分析不同工艺香型白酒以及食用酒精勾兑的白酒,结果发现,各种白酒的甲基峰与亚甲基峰等微观结构存在差别,这种方法可用于鉴定酒的品质.目前,世界各国也已开发出通过测定酒精中的氘(^2H)元素的丰度从而推测葡萄酒原产地的方法,并能结合其它方法对葡萄酒的组分进行全面的分析,对其品质进行鉴定.

4 与其他分离手段(色谱)和光谱手段的连用技术研究

NMR技术是获得物质结构的有力手段,能够检测不同分子结构上的细微差别.但NMR技术要求分析的样品是纯物质,因此对混合样品如天然产物等进行分析时,要先对混合物样品进行分离.很多分离手段能与NMR技术联用,实现样品的分离与分析,如高效液相色谱-核磁共振联用(HPLC-NMR)、液相色谱-质谱-磁共振波谱(HPLC-MS-NMR)联用、超临界流体萃取-核磁共振(SFE-NMR)联用等.目前NMR技术与高效液相色谱联用(HPLC-NMR)在复杂样品的分离与分析中已得到了广泛的应用,将在本文主要讨论.

HPLC-NMR 技术至今已有 30 多年的历史^[93-95], 随着谱仪场强不断升高, 超低温探头的出现, 以及分离技术的不断发展^[95-98], HPLC-NMR 技术应用越来越广泛. 但由于受传统的傅立叶变换核磁共振波谱(FT-NMR)实验相位编码模式的影响, 在线 HPLC-NMR 分析难以实现. 近 10 年来, 由于快速采样 NMR 方法的相继出现^[99-103], 可以在不到 1 s 的短时间内采集到高分辨的二维 NMR 谱, 为 HPLC-NMR 在线联用提供了条件. HPLC-NMR 联用技术实现了在线分离和结构解析于一体, 简化了分析过程, 在药物检测^[104-106]、天然产物分析^[97,107,108]、环境分析、新药合成以及组合化学^[108-110]等领域有着广泛的应用前景.

首次尝试基于快速 NMR 采样方法的 HPLC-NMR 的是 Frydman 研究组^[111], 他们结合单扫描二维 NMR 方法, 对 HPLC 连续洗脱的组分进行了检测. 但该方法使用了非常规色谱分离条件, 且对硬件配置要求很高, 难以在商品 HPLC-NMR 仪器上得到广泛应用. 针对上述情况, 刘买利研究组将基于 Hadamard 频率编码的快速采样方法应用到了 HPLC-NMR 实验中^[112], 实现了复杂样品的在线 HPLC-NMR 联用分离分析. 该方法能在短时间内获得大量待测物的结构信息, 对于高浓度的组分, 只需要 14~23 s 就能记录到高分辨的 2D TOCSY 谱. 对低浓度组分复杂样品, 在切换到离线操作模式下, 几分钟内能记录到高分辨二维 HPLC-NMR 谱. 该方法为复杂样品体系的高通量检测提供了新的途径.

5 结论与展望

NMR 技术作为物质分析的手段, 在分析化学领域得到了广泛应用, 已广泛用于小分子、大分子及其复杂体系结构分析, 是物质结构分析中使用最广泛、功能最强大的武器.

NMR 技术近年来发展迅速, 新方法与新技术层出不穷, 研究领域不断扩展, 已经从最初的物理学领域逐步渗透到化学、生物、医疗等领域. 在蛋白质结构解析中, 已从溶液结构测定发展到膜蛋白和活细胞中的蛋白质结构研究. 在代谢组学研究方面也具有广泛的前景. 随着食品消费者与生产者对高性价比与高稳定性食品的期望值不断增加, 对评价食品质量的技术手段的需求日益迫切. NMR 技术由于穿透力强, 不受样品厚度的影响, 且无损、无辐射, 在食品检测与食品品质控制方面有广泛的应用前景.

尽管近年来核磁共振的硬件不断改进, 新的脉冲方法不断出现, 其应用范围越来越广, 但灵敏度仍然是制约核磁共振应用的瓶颈. 发展灵敏度增强的各种核磁共振方法, 发展与其它分析方法联用技术及快速和灵敏度增强的数据处理技术仍将是核磁共振方法的研究重点. 可以预见, 随着核磁共振新技术的发展, 必将扩大核磁共振在分析化学中的应用范围.

References

- [1] Williamson, M. P.; Havel, T. F.; Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295.
- [2] Arseniev, A. S.; Wider, G.; Joubert, F. J.; Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1982**, *159*, 323.
- [3] Billeter, M.; Braun, W.; Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 321.
- [4] Wagner, G.; Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 347.
- [5] Wider, G.; Lee, K. H.; Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 367.
- [6] Wuthrich, K. *Biochem. Soc. Symp.* **1982**, 17.
- [7] Wuthrich, K. *S. Afr. J. Sci.* **1982**, *78*, 381.
- [8] Wuthrich, K. *Umschau Das Wissenschaftsmagazin* **1982**, *82*, 684.
- [9] Wuthrich, K.; Wider, G.; Wagner, G.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 311.
- [10] Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wuthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 12366.
- [11] Salzmann, M.; Pervushin, K.; Wider, G.; Senn, H.; Wuthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 13585.
- [12] Zhu, G.; Yao, X. *J. Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2008**, *52*, 49.
- [13] Riek, R.; Wider, G.; Pervushin, K.; Wuthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 4918.
- [14] Takahashi, H.; Nakanishi, T.; Kami, K.; Arata, Y.; Shimada, I. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 220.
- [15] Tjandra, N.; Bax, A. *Science* **1997**, *278*, 1697.
- [16] Tolman, J. R.; Flanagan, J. M.; Kennedy, M. A.; Prestegard, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 9279.
- [17] Barbieri, R.; Luchinat, C.; Parigi, G. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 797.
- [18] Bertini, I.; Luchinat, C.; Piccioli, M. In *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules, Pt. B*, Vol. 339, Eds.: James, T. L.; Dotsch V.; Schmitz U., Academic Press, San Diego, **2001**, p. 314.
- [19] Tang, C.; Schwieters, C. D.; Clore, G. M. *Nature* **2007**, *449*, 1078.
- [20] Berardi, M. J.; Shih, W. M.; Harrison, S. C.; Chou, J. *J. Nature* **2011**, *476*, 109.
- [21] Tugarinov, V.; Kay, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13868.
- [22] Kainosho, M.; Torizawa, T.; Iwashita, Y.; Terauchi, T.; Ono, A. M.; Guntert, P. *Nature* **2006**, *440*, 52.
- [23] Tugarinov, V.; Choy, W. Y.; Orekhov, V. Y.; Kay, L. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 622.
- [24] Goto, N. K.; Gardner, K. H.; Mueller, G. A.; Willis, R. C.; Kay, L. E. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 369.
- [25] Foster, P.; McElroy, A.; Amero, C. D. *Biochemistry-US* **2007**, *46*, 331.
- [26] Fernandez, C.; Wuthrich, K. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 144.
- [27] Fiaux, J.; Bertelsen, E. B.; Horwich, A. L.; Wuthrich, K. *Nature* **2002**, *418*, 207.
- [28] Fernandez, C.; Adeishvili, K.; Wuthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 2358.
- [29] Hilty, C.; Fernandez, C.; Wider, G.; Wuthrich, K. *J. Biomol. NMR* **2002**, *23*, 289.
- [30] Hilty, C.; Wider, G.; Fernandez, C.; Wuthrich, K. *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 377.
- [31] Fernandez, C.; Hilty, C.; Wider, G.; Guntert, P.; Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 1211.
- [32] Xu, Y. Q.; Lin, Z.; Ho, C.; Yang, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11920.
- [33] Xu, Y. Q.; Zheng, Y.; Fan, J. S.; Yang, D. W. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 931.
- [34] Snyder, D. A.; Xu, Y. Q.; Yang, D. W.; Bruschiweiler, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14126.
- [35] Feng, W.; Pan, L.; Zhang, M. *Sci. Chin. Life Sci.* **2011**, *54*, 101.
- [36] Ikura, M.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2433.
- [37] Korzhnev, D. M.; Salvatella, X.; Vendruscolo, M.; Di Nardo, A. A.; Davidson, A. R.; Dobson, C. M.; Kay, L. E. *Nature* **2004**, *430*, 586.
- [38] Sugase, K.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Nature* **2007**, *447*, 1021.
- [39] Korzhnev, D. M.; Religa, T. L.; Banachewicz, W.; Fersht, A. R.; Kay, L. E. *Science* **2010**, *329*, 1312.
- [40] Farber, P.; Darmawan, H.; Sprules, T.; Mittermaier, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6214.
- [41] Zimmerman, S. B.; Trach, S. O. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599.
- [42] Serber, Z.; Dotsch, V. *Biochemistry-US* **2001**, *40*, 14317.
- [43] Llinas, M.; Wuthrich, K.; Schwotzer, W.; Philipsborn, W. V. *Nature* **1975**, *257*, 817.
- [44] Reckel, S.; Hansel, R.; Lohr, F.; Dotsch, V. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2007**, *51*, 91.

- [45] Sharaf, N. G.; Barnes, C. O.; Charlton, L. M.; Young, G. B.; Pielak, G. J. *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 140.
- [46] Augustus, A. M.; Reardon, P. N.; Spicer, L. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 5065.
- [47] Banci, L.; Barbieri, L.; Bertini, I.; Cantini, F.; Luchinat, E. *Plos One* **2011**, *6*.
- [48] Barnes, C. O.; Monteith, W. B.; Pielak, G. J. *Chembiochem* **2011**, *12*, 390.
- [49] Bertini, I.; Felli, I. C.; Gonnelli, L.; Kumar, M. V. V.; Pierattelli, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2339.
- [50] Li, C. G.; Wang, G. F.; Wang, Y. Q.; Creager-Allen, R.; Lutz, E. A.; Scrone, H.; Slade, K. M.; Ruf, R. A. S.; Mehl, R. A.; Pielak, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 321.
- [51] Wang, G. F.; Li, C. G.; Pielak, G. J. *Protein Sci.* **2010**, *19*, 1686.
- [52] Sakakibara, D.; Sasaki, A.; Ikeya, T.; Hamatsu, J.; Hanashima, T.; Mishima, M.; Yoshimasu, M.; Hayashi, N.; Mikawa, T.; Walchli, M.; Smith, B. O.; Shirakawa, M.; Guntert, P.; Ito, Y. *Nature* **2009**, *458*, 102.
- [53] Inomata, K.; Ohno, A.; Tochio, H.; Isogai, S.; Tenno, T.; Nakase, I.; Takeuchi, T.; Futaki, S.; Ito, Y.; Hiroaki, H.; Shirakawa, M. *Nature* **2009**, *458*, 106.
- [54] Selenko, P.; Serber, Z.; Gade, B.; Ruderman, J.; Wagner, G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 11904.
- [55] Bodart, J. F.; Wieruszkeski, J. M.; Amniai, L.; Leroy, A.; Landrieu, I.; Rousseau-Lescuyer, A.; Vilain, J. P.; Lippens, G. *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 252.
- [56] Smet, C.; Leroy, A.; Sillen, A.; Wieruszkeski, J. M.; Landrieu, I.; Lippens, G. *Chembiochem* **2004**, *5*, 1639.
- [57] Charlton, L. M.; Pielak, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 11817.
- [58] Crowley, P. B.; Chow, E.; Papkovskaia, T. *Chembiochem* **2011**, *12*, 1043.
- [59] Wang, Q. H.; Zhuravleva, A.; Gierasch, L. M. *Biochemistry-US* **2011**, *50*, 9225.
- [60] Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. *Science* **1996**, *274*, 1531.
- [61] Peng, J. W.; Moore, J.; Abdul-Manan, N. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2004**, *44*, 225.
- [62] Dalvit, C.; Pevarello, P.; Tato, M.; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Sundstrom, M. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65.
- [63] Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784.
- [64] Ji, Z. S.; Yao, Z. X.; Liu, M. L. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 380.
- [65] Benie, A. J.; Moser, R.; Bauml, E.; Blaas, D.; Peters, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14.
- [66] Mayer, M.; James, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13376.
- [67] Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336.
- [68] Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. *Xenobiotica* **1999**, *29*, 1181.
- [69] Liu, M.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Sanderson, P. N.; Tranter, G. E. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 865.
- [70] Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **1987**, *2*, 37.
- [71] Castellani, F.; van Rossum, B.; Diehl, A.; Schubert, M.; Rehbein, K.; Oschkinat, H. *Nature* **2002**, *420*, 98.
- [72] Li, M.; Wang, B. H.; Zhang, M. H.; Rantalainen, M.; Wang, S. Y.; Zhou, H. K.; Zhang, Y.; Shen, J.; Pang, X. Y.; Zhang, M. L.; Wei, H.; Chen, Y.; Lu, H. F.; Zuo, J.; Su, M. M.; Qiu, Y. P.; Jia, W.; Xiao, C. N.; Smith, L. M.; Yang, S. L.; Holmes, E.; Tang, H. R.; Zhao, G. P.; Nicholson, J. K.; Li, L. J.; Zhao, L. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 2117.
- [73] Clayton, T. A.; Lindon, J. C.; Cloarec, O.; Antti, H.; Charuel, C.; Hanton, G.; Provost, J. P.; Le Net, J. L.; Baker, D.; Walley, R. J.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K. *Nature* **2006**, *440*, 1073.
- [74] Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Wilson, I. D. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 431.
- [75] Holmes, E.; Loo, R. L.; Stampler, J.; Bictash, M.; Yap, I. K. S.; Chan, Q.; Ebbels, T.; De Iorio, M.; Brown, I. J.; Veselkov, K. A.; Davignus, M. L.; Kesteloot, H.; Ueshima, H.; Zhao, L. C.; Nicholson, J. K.; Elliott, P. *Nature* **2008**, *453*, 396.
- [76] Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 153.
- [77] Wang, Y. L.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Cloarec, O.; Chollet, J.; Tanner, M.; Singer, B. H.; Utzinger, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 12676.
- [78] Solanky, K. S.; Bailey, N. J.; Beckwith-Hall, B. M.; Bingham, S.; Davis, A.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Cassidy, A. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 236.
- [79] Wang, Y. L.; Tang, H. R.; Nicholson, J. K.; Hylands, P. J.; Sampson, J.; Holmes, E. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 191.
- [80] Bertram, H. C.; Andersen, R. H.; Andersen, H. J. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 128.
- [81] Lucas, T.; Quellec, S.; Le Bail, A.; Davenel, A. J. *Food Eng.* **2005**, *70*, 151.
- [82] Kuo, M. I.; Gunasekaran, S.; Johnson, M.; Chen, C. J. *Dairy Sci.* **2001**, *84*, 1950.
- [83] Rudi, T.; Guthausen, G.; Burk, W.; Reh, C. T.; Isengard, H. D. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1375.
- [84] Kiokias, S.; Reszka, A. A.; Bot, A. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 287.
- [85] Bertram, H. C.; Wiking, L.; Nielsen, J. H.; Andersen, H. J. *Int. Dairy J.* **2005**, *15*, 1056.
- [86] Ruan, R.; Long, Z.; Chen, P.; Huang, V.; Almaer, S.; Taub, I. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 6.
- [87] Pitombo, R. N. M.; Lima, G. A. M. R. *J. Food Eng.* **2003**, *58*, 59.
- [88] Atichokudomchai, N.; Varavinit, S.; Chinachoti, P. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *58*, 383.
- [89] Tananuwong, K.; Reid, D. S. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *58*, 345.
- [90] Elomaa, M.; Asplund, T.; Soiminen, P.; Laatikainen, R.; Peltonen, S.; Hyvarinen, S.; Urtti, A. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 261.
- [91] Wang, L.; Li, Y.; Hu, J. H. *Chin. Oils Fats* **2008**, *75*. (王乐, 黎勇, 胡建华, 中国油脂, **2008**, *75*.)
- [92] Han, X. L.; Zhang, W. J.; Wang, D. L.; Wang, Y. J.; L. H. *Liquor-Making Sci. & Technol.* **2009**, *112*. (韩兴林, 张五九, 王德良, 王异静, 李红, 酿酒科技, **2009**, *112*.)
- [93] Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Wolff, G.; Rindlisbacher, M. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1747.
- [94] Fyfe, C. A.; Cocivera, M.; Damji, S. W. H.; Hostetter, T. A.; Sproat, D.; O'Brien, J. *J. Magn. Reson.* **1976**, *23*, 377.
- [95] Haw, J. F.; Glass, T. E.; Hausler, D. W.; Motell, E.; Dorn, H. C. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1135.
- [96] Benfenati, E.; Pierucci, P.; Fanelli, R.; Preiss, A.; Godejohann, M.; Astratov, M.; Levsen, K.; Barcelo, D. *J. Chromatogr. A* **1999**, *831*, 243.
- [97] Exarchou, V.; Godejohann, M.; van Beek, T. A.; Gerotheranassis, I. P.; Vervoort, J. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6288.
- [98] Godejohann, M.; Tseng, L. H.; Braumann, U.; Fuchser, J.; Spraul, M. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1058*, 191.
- [99] Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 15858.
- [100] Kim, S.; Szyperski, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1385.
- [101] Kupce, E.; Freeman, R. *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 383.
- [102] Schanda, P.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014.
- [103] Szyperski, T.; Yeh, D. C.; Sukumaran, D. K.; Moseley, H. N. B.; Montelione, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 8009.
- [104] Foxall, P. J. D.; Lenz, E. M.; Lindon, J. C.; Neild, G. H.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K. *Ther. Drug Monit.* **1996**, *18*, 498.
- [105] Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Farrant, R. D.; Shockcor, J. P.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1999**, *20*, 865.
- [106] Spraul, M.; Hofmann, M.; Lindon, J. C.; Farrant, R. D.; Seddon, M. J.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D. *NMR Biomed.* **1994**, *7*, 295.
- [107] Xiao, H. B.; Krucker, M.; Putzbach, K.; Albert, K. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 135.
- [108] Harrigan, G. G.; Goetz, G. H. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2005**, *8*, 529.
- [109] Keifer, P. A. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 509.
- [110] Keifer, P. A.; Smallcombe, S. H.; Williams, E. H.; Salomon, K. E.; Mendez, G.; Belletire, J. L.; Moore, C. D. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 151.
- [111] Shapira, B.; Kartan, A.; Aronson, D.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1262.
- [112] Zhou, Z. M.; Zhang, W. L.; Zhang, X.; Ye, C.; Liu, M. L. In *The Abstracts of the 14th National Spectroscopy Conference*, **2006**. (周志明, 张维农, 张许, 叶朝辉, 刘买利, In 第十四届全国波谱学学术会议论文摘要集, **2006**.)

(Yang, X.)