

人体尿液代谢组 NMR 分析

杨为进^{①*}, 王亚韡^①, 周群芳^①, 唐惠儒^②

① 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085;

② 中国科学院武汉物理与数学研究所, 武汉 430071

* 联系人, E-mail: wjyang@cashq.ac.cn

收稿日期: 2007-07-02; 接受日期: 2007-08-23

中国科学院创新项目(批准号: KZCX2-YW-420-21)、国家 863 项目(批准号: 2006AA06Z424)、国家自然科学基金重大项目(批准号: 40590392)和国家自然科学基金(批准号: 20575074)资助

摘要 利用固相萃取分离和核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)对人体尿液中的代谢物进行了较为系统的研究. 通过对人体尿液样品固相萃取后分离得到的五个组分 ^1H NMR, 同核二维氢谱(correlation spectroscopy, COSY)和全相关谱(total correlation spectroscopy, TOCSY), 异核相关光谱(heteronuclear single quantum correlation, HSQC 和 Heteronuclear multiple bond correlation, HMBC), J-分解谱(J-resolved spectroscopic, J-RES)的谱图分析, 解析出了 74 种化合物的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移, 并对一维 ^1H 谱的多数谱峰进行了有效指认.

关键词

代谢物
核磁共振技术
尿液

代谢组学是后基因时代的一门新兴学科, 与基因组学、转录组学和蛋白组学比较, 具有以下优点: 基因和蛋白表达的微小变化会在代谢物水平上得到放大, 从而使检测更容易; 代谢组学的研究不需建立全基因组测序及大量表达序列标签(EST)的数据库; 代谢物的种类要远小于基因和蛋白的数目; 生物体液的代谢物分析可反映机体系统的生理和病理状态^[1]. 目前对其理论、概念、方法尚在研究和完善中^[2-6].

代谢物分析一直是生命科学研究和代谢组学研究中的重要组成部分. 传统的代谢物分析包括繁杂的样品准备和处理步骤, 但是往往得到的只是有限的几个化合物分析结果. 代谢组学的快速发展, 主要得益于分析技术的发展使得对大量样品和大量代谢物的快速定量测定成为可能. 目前, 可用于代谢组学研究的分析测试技术较多, 但是, 最为重要的是核磁共振技术(NMR)^[7,8] 和质谱技术(MS)^[9].

NMR 是化学和分子生物学领域广泛使用的一门

分析技术, 主要用于分子结构、构象、动态和反应等的分析测试, 其检测没有偏向性, 经常使用的 ^1H NMR 谱对所有含氢化合物的灵敏度是一样的, 单次检测可以得到所有含量在 NMR 检测限以上物质的特征 NMR 谱, 谱图中谱峰的位置对应于样品中不同化合物分子, 峰强度(如面积)反映相应的化合物分子的相对含量, 因此图谱能够有效表达代谢物组成及含量信息, 可以直接作为代谢指纹图谱进行分析研究. NMR 样品的前处理简单, 一般为非损伤性, 不会破坏样品的结构和性质, 可在接近生理条件下进行实验. NMR 测试手段包括液体高分辨 NMR、高分辨魔角旋转(HR-MAS)NMR 和活体核磁共振波谱(MRS). 目前已经有不少将此方法用于肝脏, 脑组织, 前列腺等组织的研究报道^[10,11]以及其他代谢研究^[12,13].

尿液是代谢组学研究中最常用的生物体液之一. 尿样中包含大量的有机酸、碱、单糖、多糖、杂环、多元醇、氨基酸、低分子量的蛋白质和多肽以及各种

无机盐 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 等, 这些化合物的变化情况直接反映了生物体内各种化学变化过程. 由于尿液组分的复杂性, 尿液用于代谢研究过程的其中一个非常困难的问题就是谱图的指认解析, 即一张 ^1H NMR 谱图中数百个谱峰的归属问题. 也可以将尿样中化合物逐个分离后测得其 NMR 谱, 然后与整个尿样 ^1H NMR 谱进行比对, 逐步解析整个尿样 ^1H NMR 谱图, 但这种方法由于其复杂性和介入性而趋向于不再使用. 目前经常使用的代谢物指认方法是二维核磁共振谱学方法以及标准物质加入法的结合. 即使如此, 目前能对尿样中予以指认的代谢物也不到检测到代谢物总数的一半. 本文拟通过尿样固相萃取预处理(solid phase extraction, SPE), 结合多种 NMR 方法, 对尿样中代谢物质进行分析鉴别, 解析尿样的 ^1H NMR 谱图.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

固相萃取柱选取英国 IST(International Sorbent Technology)公司的 0.5 g(6 mL)和 2 g(12 mL)两种不同规格 C18 萃取柱. 洗脱溶剂为 $\text{pH} = 2.8$ 的甲酸-甲酸氨水溶液中加入不同比例的 CH_3CN , 甲酸和甲酸氨均购自 Fisons Scientific U.K. Limited, 纯度分别为 98%和 99.3%, CH_3CN 购自 BDH Laboratory Supplies, 纯度为 99.9%. D_2O : 99.9% 购自 Goss Scientific Instruments Ltd, TSP: 纯度 98% 购自 Cambridge Isotope Laboratory, Inc.

1.2 样品前处理

尿液处理: 健康成年男子上午和下午尿样各 6 mL, 用甲酸调节至 $\text{pH} = 3$ 左右后, 各加入 0.12 mL 的 CH_3CN , 得到含有 2% CH_3CN $\text{pH}=3$ 的尿样.

柱前处理: 2 g C18 柱中加入 24 mL CH_3CN , 流出速率 6 mL/min, 用 25 mL 上述缓冲液冲洗, 冲洗速率为 6 mL/min.

萃取分离: 将 $\text{pH} = 3$ 的上午尿样加入 C18 柱中, 收集洗脱液. 15 mL 2% CH_3CN 的甲酸-甲酸铵缓冲液冲洗, 作为馏分 1(Fraction1); 用 15% CH_3CN 15 mL 的甲酸-甲酸铵缓冲液继续冲洗萃取柱作为馏分 2;

用 35% CH_3CN 15 mL 的甲酸-甲酸铵缓冲液冲洗萃取柱作为馏分 3; 用 50% CH_3CN 15 mL 的甲酸-甲酸铵缓冲液冲洗萃取柱作为馏分 4; 用 75% CH_3CN 20 mL 的甲酸-甲酸铵缓冲液冲洗萃取柱作为馏分 5. 然后将上述获得的馏分放置在通风柜中挥发掉 CH_3CN 后进行冷冻干燥, 每个馏分中加入适量重水溶解, 离心除去沉淀后, 进行 NMR 实验.

1.3 SPE 馏分的一维 ^1H NMR 实验

本实验及后续的二维实验均采用英国帝国理工学院生物医药系生物化学部配备超低温探头的 Bruker avance 600M HPLC-NMR 谱仪. ^1H NMR 实验脉冲序列为标准 noesypr1d 序列:

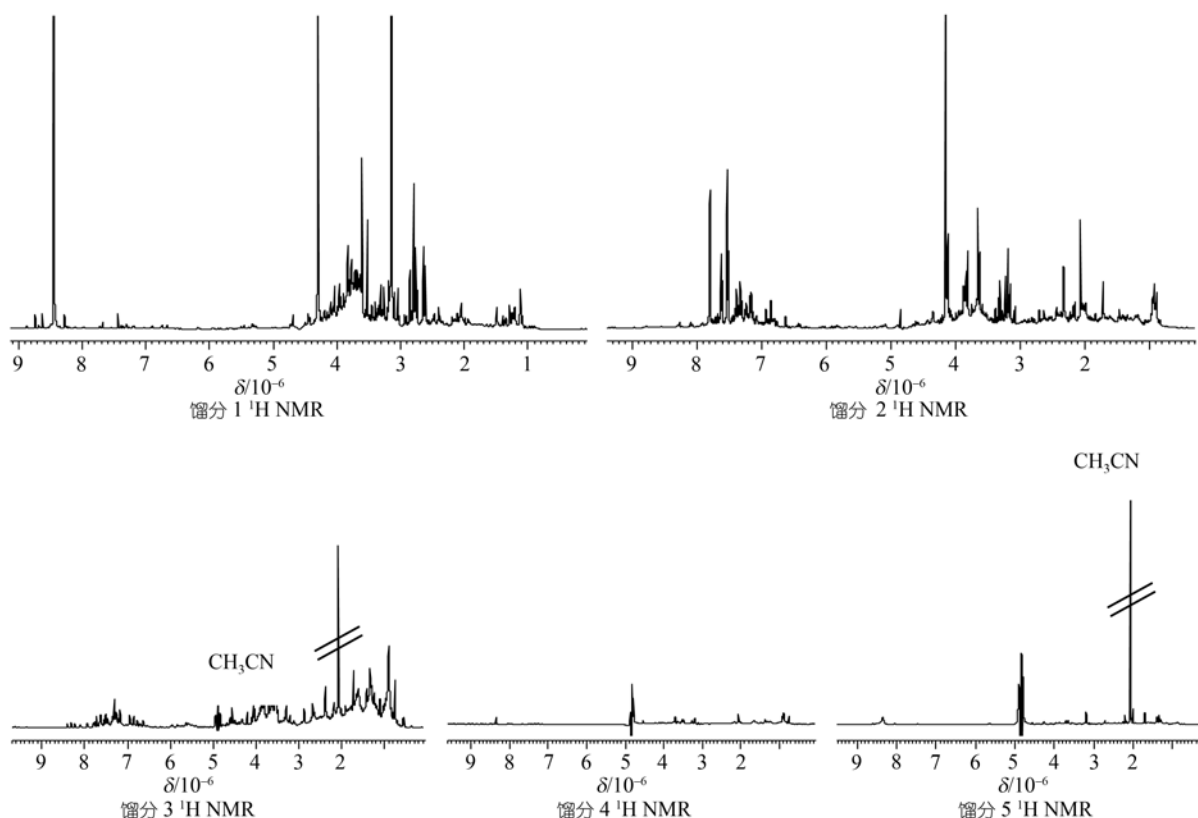
RD - 90° - t_1 - 90° - t_m - 90° - acquire FID.

参数 t_1 设置为 3 μs , 混合时间 $t_m=100$ ms, 谱宽 16×10^{-6} , 累加次数为 64, 在弛豫等待(RD)以及混合期(t_m)中采用在水的共振频率附近选择性射频辐照方式压制水峰, 数据处理采用指数窗函数, 展宽因子 $\text{LB} = 0.3$, 变换点数为 64k.

2 结果与讨论

2.1 SPE 的 5 个组分 ^1H NMR 谱图

采用上述实验参数, 获得了每个尿样 5 个 SPE 馏分的高质量 ^1H NMR 谱图. 如图 1 所示, 5 个谱图差异非常明显, 去除污染物杂峰(如 CH_3CN), 谱图的信号强度随着馏分 1 至馏分 5 依次减弱, 最强的馏分 1 的 NMR 信号多分布于 $\delta(2.5\sim 4.5) \times 10^{-6}$ 之间, 属于各种糖类和氨基酸谱 $\alpha^1\text{H}$ 化学位移区, 馏分 2 出现了 $\delta(6.5\sim 8) \times 10^{-6}$ 较强的芳香区的信号, 馏分 3 信号强度较弱, $\delta(0.7\sim 2) \times 10^{-6}$ 的长链脂肪酸信号相对较强, 馏分 4 和馏分 5 的 ^1H NMR 谱图内信号(谱峰)强度非常弱, 说明这两个馏分内的代谢物质浓度已经非常小. 由 SPE 过程可以看出, 首先出来的馏分应是水溶性好、极性较大的代谢物质, 依次类推, 最后出来的馏分是亲油性较高的代谢物质. 5 个馏分的 ^1H NMR 谱图比较进一步表明, 正常人尿样中的代谢物质多以极性大、水溶性好的化合物为主, 亲油性高的代谢物质含量极少.

图 1 尿样五个馏分的 ^1H NMR 谱图(上午尿液)

2.2 SPE 馏分的二维 NMR 实验

二维 NMR 实验是 20 世纪 70 年代末 80 年代初发展起来的 NMR 实验技术, 二维 NMR 谱除了提供一维 NMR 谱更为丰富的信息外, 还将一维 NMR 谱中重叠的信号在二维频率轴上展开, 有助于复杂的 NMR 的解析, 因此, 二维 MMR 是化合物确认和结构解析强有力的手段。

2.2.1 同核二维氢谱和全相关谱实验

Correlation spectroscopy(COSY)属于同核二维氢谱实验, 是利用同核 ^1H — ^1H 之间的 3J 耦合建立核与核之间联系的 NMR 实验, COSY 谱可直接给出通过双键、三键连接的质子间的交叉峰, 进一步传递可以获得分子中所有相邻氢原子之间的关联。Total correlation spectroscopy(TOCSY)为全相关谱, 可以提供所有具有“J-耦合”关系的氢核间的关联, 直接给出自旋体系所有质子间的交叉峰。TOCSY 作为 COSY 实验的补充, 与 COSY 实验一起可以确认尿样固相萃取后

馏分代谢物分子中氢核的结构关系。

为了节约文章篇幅, 本文仅给出 SPE 其中一个馏分二维谱图。图 2 分别为下午尿样 SPE1 馏分的 COSY 和 TOCSY 实验结果。两类实验, 尤其是 COSY 实验的灵敏度非常高, 在 5 个馏分 COSY 谱中, 馏分 1 和馏分 2 的 COSY 谱存在较强的 t_1 噪声(经过处理后, 对谱图解析影响不大), 其余谱图的质量较好, TOCSY 实验则在馏分 4 和馏分 5 中水峰的压制不够理想, 但是由于这两个馏分中化合物的化学位移靠近水峰的并不多, 所以对代谢物解析影响不大。5 个馏分的 COSY 和 TOCSY 谱图均能够分辨出对应一维 ^1H NMR 谱图难以分辨的许多谱峰的位置。将同一馏分的 TOCSY 和 COSY 谱进行对照, 调整谱图的强度以及缩放尺度, 可以逐步解析出同一馏分中各化合物分子 ^1H 的化学位移中除了单峰以外的其余各峰之间的相互关联, 从而推知分子中 ^1H 的相互靠近关系, 为解析化合物提供非常重要的帮助, 部分常见的化合物可以直接依靠这种 ^1H 与 ^1H 之间的关系得到确认。

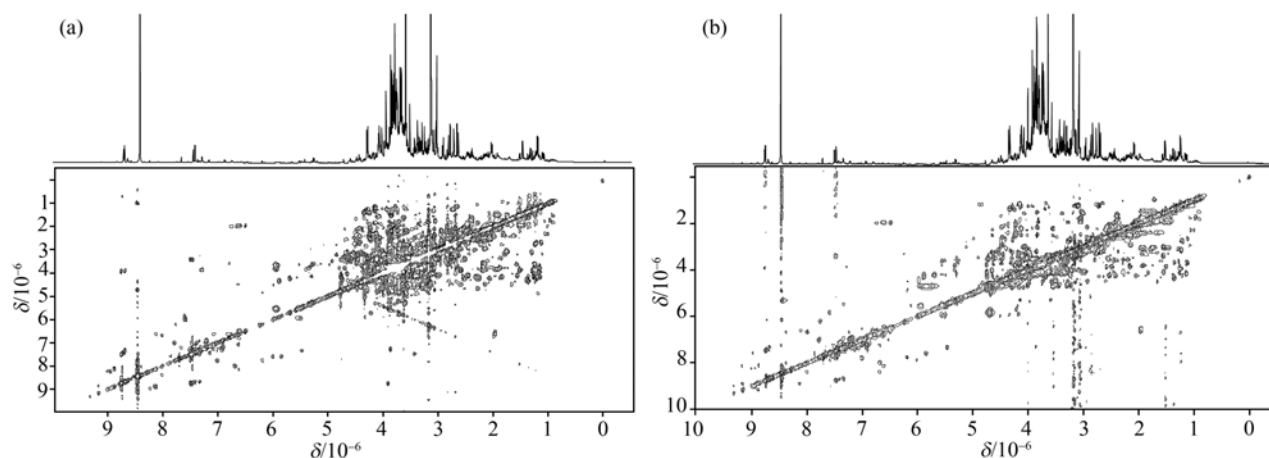


图2 固相萃取馏分1的二维COSY谱(a)和TOCSY谱(b)(下午尿液)

2.2.2 异核相关谱实验

COSY 和 TOCSY 实验后, 样品中各代谢物分子内邻近氢原子之间的化学位移及相互关系可以得到有效的确认, 但是在尿样馏分这种复杂混合物中仅依靠分子中氢原子之间的信息远不足以解析代谢物分子. Heteronuclear single quantum correlation(HSQC)和 heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)是异核相关谱, 是通过 ^1H 间接检测 ^{13}C 谱以极大提高 ^{13}C 检测灵敏度的反向实验方法. HSQC 和 HMBC 的 F2 维代表检测样品的 ^1H 的化学位移, F1 维代表间接检测到的 ^{13}C 的化学位移. HSQC 提供分子中与 ^1H 直接相连的 ^{13}C 的化学位移, 因此, HSQC 谱图不仅可以提供 ^1H 和 ^{13}C 的化学位移值, 而且还将 ^1H 和 ^{13}C 每个峰准确地对应出来. 同时对于一些含有环状结构的或某些具有手性 C 原子的代谢物, 连在同一碳上的两个氢原子, 由于所处的化学环境并不相同, 其化学位移也不相同, 通过 HSQC 我们可以清楚地看到两个峰, 他们在谱图中 ^1H 的化学位移不同, 但 ^{13}C 的化学位移相同, 这是在 ^1H NMR 以及 COSY 和 TOCSY 中很难辨认的. HMBC 表示异核的远程相关谱. HMBC 的谱图提供与 ^1H 原子相隔 2~4 个化学键相连的 ^{13}C 的化学位移, 根据 HMBC 谱所给出的 H, C 之间的关系, 结合 HSQC 的谱图, 我们就能够解决 C 原子的连接顺序问题并确定代谢物的骨架结构.

馏分 1 的异核相关谱图结果如图 3 所示. 5 个馏分均获得了高质量的 HSQC 和 HMBC 谱图, 同一馏

分的两类谱图相比, HSQC 比 HMBC 具有更高的灵敏度, HMBC 却比 HSQC 包含了更多的代谢物的结构信息. 比较 5 个馏分同类谱图, 可以发现沿馏分 1 至馏分 5, HSQC 和 HMBC 谱图的信号强度逐步减弱, 尤其是 HMBC 谱, 馏分 4 和馏分 5 的谱图已经很难保证关联信号的完整性, 使谱图解析难度加大. 逐步调整各馏分的 HMBC 谱图信号强度及缩放尺度, 既得到了每一馏分中各代谢物分子中碳原子与碳原子之间相互连接关系又获得氢原子与氢原子之间的相互靠近关系, 与 COSY 和 TOCSY 获得的结果相互引证、相互补充, 再加上 HSQC 中所表达的碳原子与氢原子直接关联, 尿样馏分中一些重要的代谢物质结构得到了较为完整的解析, 部分在 COSY 和 TOCSY 实验过程指认的代谢物在此也得到了真正的确认.

2.2.3 J-分解谱实验

由于氢谱的化学位移范围较窄, 而 ^1H - ^1H 间的耦合广泛存在, 导致谱图重叠现象仍十分严重, 给辨认带来很大困难. J-分解谱(J-resolved spectroscopic, J-RES)实验可以将化学位移与 J 耦合分开, 使一维谱上过分拥挤的谱分散在平面上, 给上述一维和二维谱图的解析提供有效的补充. J-RES 谱图中的 F2 维代表是 ^1H 的化学位移, F1 维代表的是耦合常数的大小, 代谢物分子单重峰直接位于 F1 中心轴, 多重峰则沿中心轴向两端作对称分布. 由于多数代谢物 ^1H 的化学位移经常随溶液环境发生变化, 而分子中的耦合常数变化却不是很大, 因此 J-RES 经常是代谢组学研究中用于复杂样品环境代谢物解析的重要参照.

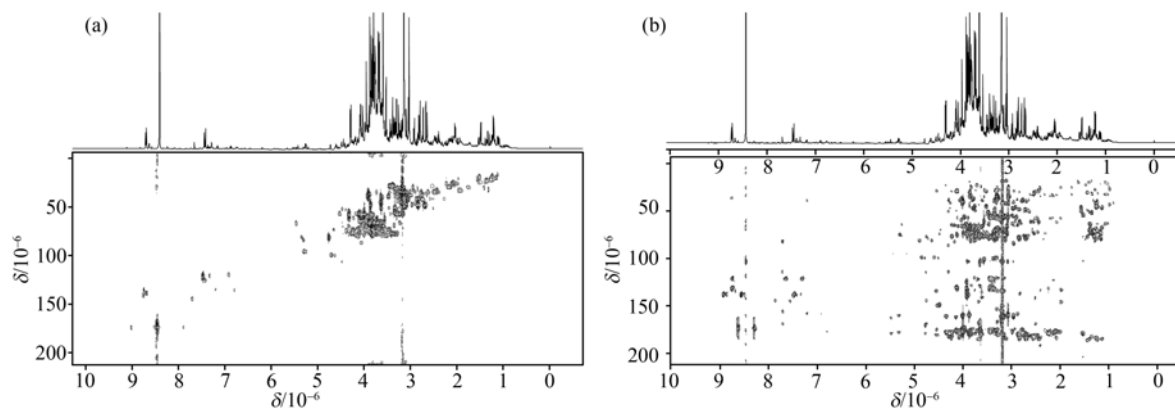


图3 固相萃取馏分1的二维HSQC谱(a)和HMBC谱(b)(下午尿液)

图4是馏分1的J-RES实验结果,可以看出该谱图具有较强的 t_1 噪声,但是由于这种噪声主要发生在强度较大的谱峰位置,对实验结果分析影响较小,所以该谱图仍然对代谢物的解析产生较大的帮助。

图4右图为馏分1的 ^1H NMR和J-RES谱在 $\delta(1.7\text{--}1.1)\times 10^{-6}$ 区间的放大图,上方一维谱图清晰地出现多个双峰,在J-RES谱中得到确认(10个双峰,2个单峰);图4(b)为 $\delta(4.01\text{--}3.76)\times 10^{-6}$ 区间的放大图,上方一维谱图中1, 2, 3, 4看起来像是两个双峰或四个单峰,在J-RES上可以清晰地确认是一个dd多重峰,5和6看起来像2个双峰,实际上也是一个dd多重峰,7和8看起来像两个单峰,实际上是一个双峰(峰8可能与其他峰重叠而显偏高)。这种峰的分离及多重性的确认对化合物的解析具有重要意义。

2.3 尿样代谢物解析结果

对上述5种二维NMR谱图进行对照分析,从尿样组分中共解析出了74种化合物的 ^1H 和 ^{13}C 化学位

移,这是目前报道直接从生物体液解析出来最多的化合物,说明经过简单的浓缩和分离后,尿样中许多代谢物质可以直接利用多种二维NMR实验联合分析的方法进行解析,与目前多数从事代谢组学研究的实验室采用测量标准化合物谱图解析生物体液NMR谱图相比,该方法除可节省大量时间及标准样品的消耗外,有可能直接获得以前很少见到的代谢物质。

在74种代谢物中,有49种直接从馏分1中解析得到,18种从馏分2中得到。馏分3至馏分5三个馏分仅解析出了7个代谢物,其原因一方面是这三个馏分中代谢物浓度较低,另一方面代谢物结构更加复杂,给解析带来了困难。

从馏分1中解析出来代谢物质最多的为各种非芳香组氨基酸及其衍生物,如组氨酸、3-甲基组氨酸、1-甲基组氨酸、 β -丙氨酰-1-甲基组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天门冬酰胺、缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、甘氨酸、 N,N -二甲基甘氨酸、肌氨酸、肌氨酸酐、 β -氨基异丁酸、谷氨酸、苏氨酸、3-甲胺基丙氨酸、焦谷氨酸、

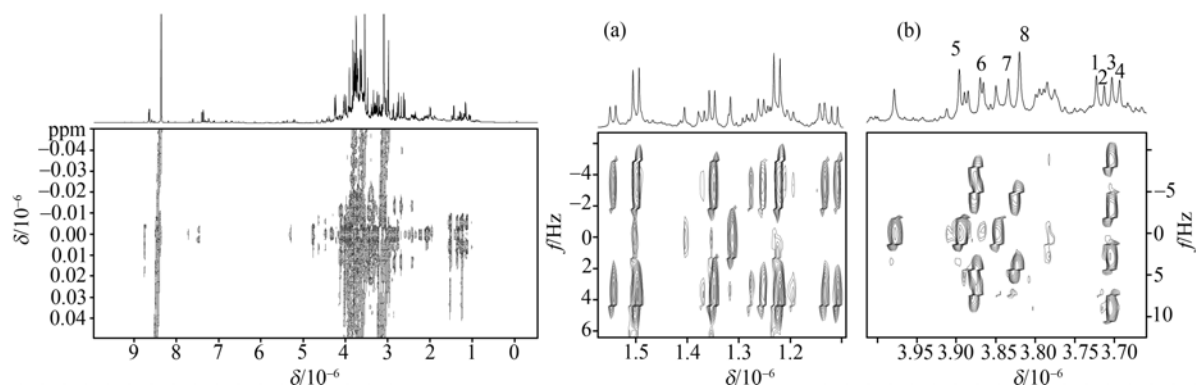


图 4 固相萃取馏分 1 的二维 J-RES 谱和局部放大图(下午尿液)

等. 其次为包含短链脂肪酸在内的各种有机酸, 如甲酸、乙酸、丙酮酸、柠檬酸、丙二酸、 α -羟基异丁酸、 β -羟基异丁酸、反-乌头酸、尿囊酸、羟基乙酸、牛

黄酸等. 另外还有各种有机碱及其衍生物, 如三甲胺、二甲胺、氧化三甲胺、胆碱、三甲胺乙内酯、尿嘧啶等, 单糖如 β -葡萄糖、 α -葡萄糖和甘露醇等, 以

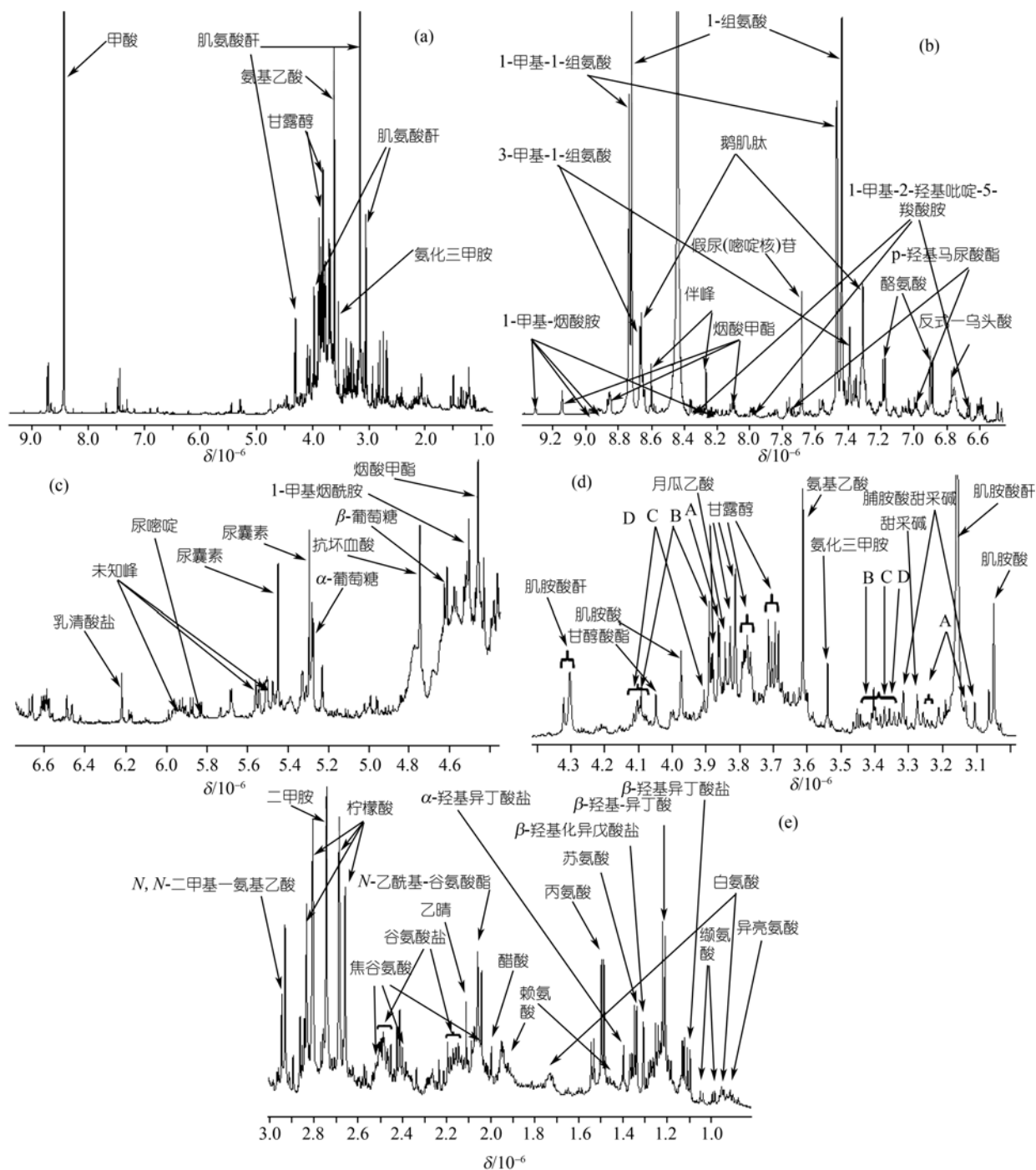


图 5 固相萃取馏分 1 的 NMR 1D-H 谱(下午尿样)

(a) $\delta(0.8\sim 9.5)\times 10^{-6}$; (b) $\delta(6.5\sim 9.4)\times 10^{-6}$; (c) $\delta(4.4\sim 6.5)\times 10^{-6}$; (d) $\delta(3.0\sim 4.4)\times 10^{-6}$ (A: 鹅肌肽, B: 1-甲基-L-组氨酸, C: 3-甲基-L-组氨酸, D:

及几种杂环化合物, 如 1-甲基尼克酰胺、1-甲基尼克酸、尿囊素、假尿苷等.

馏分 2 解析出来最多的是各种芳香组有机酸及其衍生物, 如马尿酸、对羟基马尿酸、对羟基苯乙酸、3-(3-羟基苯)-3-羟基丙酸、苯乙酸、色氨酸、对-甲氧基、1-甲基-2-吡咯酮-5-甲酰胺、3-(3-甲氧基-4-羟基)丙烯酸, 以及 7-甲基脲、乙内酰脲等杂环化合物和 β -羟基异戊酸、巴豆酸、泛酸等有机酸.

馏分 3 至 5 中解析出来有 3-(3-甲氧基-4-羟基)苯丙酸、3-乙酰基吡啶以及长链脂肪酸、癸二酸等疏水性较高的化合物. 另外, 值得注意的是极性大、水溶性好的乳酸出现在馏分 4 中, 乳酸具有较大的水溶性, 疏水性也不大, 可能因为形成了分子内氢键从而增加了疏水性能, 使其没能在馏分 1 或馏分 2 中析出.

为了避免使用缓冲液配置 NMR 实验样品带来离子强度增大, 从而影响 NMR 实验效果, 本次实验均采用将 SPE 馏分冷冻干燥后直接加入重水的方式配置样品溶液, 获得的样品溶液均为酸性, 发现个别化合物 ^1H 化学位移与其在中性或弱碱性环境中的化学位移差距较大, 最明显的为组氨酸及其衍生物 1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸、 β -丙氨酰-1-甲基组氨酸等(见表 1), 在以后代谢组学研究中应特别注意.

图 5 和 6 是馏分 1 和馏分 2 的一维 ^1H 谱的解析结果, 可以看出谱图中多数的谱峰得到了有效指认.

组氨酸); (e) $\delta(0.9\sim 3.0) \times 10^{-6}$

表 1 组氨酸及其衍生物 ^1H 的化学位移随溶液 pH 值变化情况

代谢物名称	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性
	环上 H2		环上 H4		甲基	
鹅肌肽	8.66	7.95	7.32	6.97	3.86	3.72
组氨酸	8.72	7.83	7.44	7.08		
3-甲基组氨酸	8.67	7.63	7.39	7.00	3.91	3.69
1-甲基组氨酸	8.74	7.82	7.47	7.01	3.89	3.69

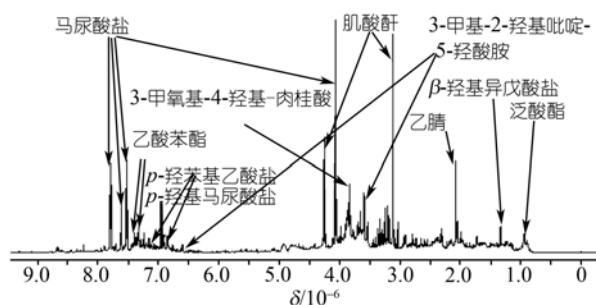


图 6 SPE 馏分 2 的 NMR 1D-H 谱, $\delta(9\sim 0) \times 10^{-6}$ (下午尿样)

2.4 结论

谱图的解析是代谢组学研究中极为重要的一步, 目前多数从事代谢组学研究的实验室多采用测量标准化化合物谱图解析生物体液 NMR 谱图. 本文通过对 SPE 和 HPLC-NMR 等实验方法简单探索, 利用 SPE 加多种二维 NMR 实验技术, 成功对 ^1H NMR 谱图进行了解析, 获得了 74 种化合物在酸性条件下的 ^1H 和 ^{13}C 的化学位移, 与传统方法相比, 该方法简便、快捷, 为我们进一步进行代谢组学的研究奠定了基础.

参考文献

- 1 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展. 色谱, 2003, 21: 316—320
- 2 Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica, 1999, 29: 1181—1189[DOI]
- 3 Holmes E, Tang H R, Wang Y L, Seger C. The assessment of plant metabolite profiles by NMR-based methodologies. Plant Med, 2006, 72: 771—785[DOI]
- 4 Tang H R, Wang Y L. Nutrimetabonomics-metabonomics in food science. In: (Farhat I A, Belton P S, Webb G A eds.) Magnetic Resonance in Food Science: From Molecules to Man, London: Roy Soci Chem, 2007
- 5 Pumb R S, Stumpf C L, Gorenstein M V, Castro-Perez J M, Dear G J, Anthony M, Sweathman B C, Connor S C, Haselder J N. Metabonomics: The use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows a potential for the screening of rat urine in drug development. Rap Comm Mass Spectrum, 2002, 16: 1991—1996[DOI]
- 6 Plumb R S, Stumpf C I, Granger J H, Castro Peres J, Haselden J N, Dear G J. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. Rapid Commun Mass Spectrum, 2003, 17: 2632—2638[DOI]

- 7 Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem*, 2003, 75: 384A-391A
- 8 Reo N V. NMR-based metabolomics. *Drug Chem Toxicol*, 2002, 25: 375—382 [\[DOI\]](#)
- 9 Holmes E, Loo R L, Cloarec O, Coen M, Tang H R, Maibaum E, Bruce S, Chan Q, Elliott P, Stamler J, Wilson I D, Lindon J C, Nicholson J K. Detection of urinary drug metabolite (Xenometabolome) signatures in molecular epidemiology studies via statistical total correlation (NMR) spectroscopy. *Anal Chem*, 2007, 79: 2629—2640 [\[DOI\]](#)
- 10 Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E, Everett J R. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn Reson*, 2000, 12: 289—320 [\[DOI\]](#)
- 11 Liu M L, Tang H R, Nicholson J K, Lindon J C. Recovery of underwater resonances by magnetization transferred NMR spectroscopy (RECUR-NMR). *J Magn Reson*, 2001, 153: 133—137 [\[DOI\]](#)
- 12 Liu M L, Tang H R, Nicholson J K, Lindon J C. Use of ^1H NMR determined diffusion coefficients to characterize lipoprotein fractions in human blood plasma. *Magn Reson Chem*, 2002: 83—88
- 13 Brindle J T, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson J K, Bettell H W L, Clarke S, Schofield P M, McKilligan E, Mosedale D E, Grainger D J. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using H-1-NMR-based metabonomics. *Nat Med*, 2002, 8: 1439—1444 [\[DOI\]](#)
- 14 Wang Y L, Holmes E, Tang H R, Lindon J C, Sprenger N, Turini M E, Bergonzelli G, Fay L B, Kochhar S, Nicholson J K. Experimental metabonomic model of dietary variation and stress interactions. *J Proteome Res*, 2006, 5: 1535—1542 [\[DOI\]](#)
- 15 Duarte I F, Stanley E G, Holmes E, Lindon J C, Tang H R, Ferdinand R, McKee C G, Nicholson J K, Vilca-melendze H, Heaton N, Murphy G M. Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic angle spinning H-1 NMR spectroscopy. *Anal Chem*, 2005, 77: 5570—5578 [\[DOI\]](#)
- 16 Wang Y L, Tang H R, Nicholson J K. Metabolomic strategy for the classification and quality control of phytomedicine: A case study of chamomile flower (*Matricaria recutita* L.). *Plant Med*, 2004, 70: 250—255 [\[DOI\]](#)
- 17 李晓晶, 冯江华, 张善荣, 裴奉奎, 陈曦, 聂毓秀. 稀土对大鼠代谢产物影响的核磁共振研究. *分析化学*, 2000, 28: 1472—1475
- 18 Wold S, Trygg J, Berglund A, Antti H. Some recent developments in PLS modeling. *Chemom Intell Lab Syst*, 2001, 58: 131—150 [\[DOI\]](#)
- 19 Wilson I D, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz E M. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *J Chromat Anal Technol Biomed Life Sci*, 2005, 817: 67—76 [\[DOI\]](#)
- 20 Yin P Y, Zhao X J, Li Q R, Wang J S, Li J H, Xu G W. Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). *J Proteom Res*, 2006, 5: 2135—2143 [\[DOI\]](#)
- 21 Yang J, Zhao X J, Liu X L, Wang C, Gao P, Wang J S, Li L J, Gu J R, Yang S L, Xu G W. High performance liquid chromatography-mass spectrometry for metabonomics: Potential biomarkers for acute deterioration of liver function in chronic hepatitis B. *J Proteom Res*, 2006, 5: 554—561 [\[DOI\]](#)
- 22 Qiu Y, Su M, Liu Y, Chen M, Gu J, Zhang J, Jiang W. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling. *Anal Chim Acta*, 2007, 583: 277—283 [\[DOI\]](#)
- 23 朱航, 唐惠儒, 张许, 刘买利. 基于 NMR 的代谢组学研究. *化学通报*, 2006, 69: 1—9
- 24 Tang H R, Wang Y L. Metabonomics: a revolution in progress. *Prog Biochem Biophys*, 2006, 33: 401—417
- 25 刘玮, 林建强, 刘相梅, 林建群. 核磁共振技术在微生物代谢研究中的应用. *微生物学通报*, 2007, 34, 157—160
- 26 邓惠文, 范明霞, 李建奇, 余亦华. 大鼠肝脏纤维化病变的核磁共振研究. *高等学校化学学报*, 2006, 27, 2329—2333