

基于核磁共振技术的人体肺功能障碍疾病血样的代谢组特征

何则皓¹, 王桂芳², 陈文学³

1. 复旦大学物理学系, 上海 200433; 2. 复旦大学附属华山医院呼吸科, 上海 200040; 3. 复旦大学化学系, 上海 200433

【摘要】慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)的临床诊断方法主要为肺功能检查和胸部影像学检查(如MRI和CT等),但它们检测的灵敏性和重复性较差。本研究拟通过应用核磁共振氢谱技术检测50例健康者和42例COPD患者血液中一些代谢物的变化,以期在分子水平寻求诊断COPD的生物标志物,以帮助COPD患者进行早期筛查。研究结果发现,在牛磺酸区(δ 3.34~3.30)、谷氨酸区(δ 2.50~2.26)和脂类区(δ 0.90~0.86)等5区域代谢物浓度,以及牛磺酸和谷氨酸区与葡萄糖浓度比值在健康组和COPD组间有显著性差异,此将为COPD诊断标志物的研究提供帮助。

【关键词】慢性阻塞性肺病;核磁共振;统计分析;生物标志物

【中图分类号】R318;O657

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2020)10-1312-05

Metabonomic characteristics of blood serum from patients with chronic obstructive pulmonary disease based on nuclear magnetic resonance

HE Zehao¹, WANG Guifang², CHEN Wenxue³

1. Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Respiration, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China; 3. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is mainly diagnosed by lung function test and chest imaging such as MRI and CT, etc. However, the sensitivities and repeatabilities of these diagnostic techniques for COPD diagnosis were unsatisfactory. Herein nuclear magnetic resonance spectroscopy technique is used to analyze the metabonomic differences of serum samples from 50 healthy controls and 42 patients with COPD in order to find the biomarkers for COPD diagnosis at the molecular level, thereby realizing the early screening for COPD in patients. The results showed that there were significant differences between healthy control group and COPD group in the concentrations of some metabolites such as taurine (δ 3.34-3.30), glutamate (δ 2.50-2.26) and lipid (δ 0.90-0.86), and the concentration ratios of taurine and glutamate over glucose, which suggests that the study can provide some reference for the further research on the potential biomarkers for the diagnosis of COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; nuclear magnetic resonance; statistical analysis; biomarker

前言

慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)是一种肺功能障碍性疾病,它严重威胁着人类的健康。据统计,COPD在全球呈高发态势,全球的发病病例每年超过2.1亿,死亡病例每年达300万以上,并且40岁以上处于疾病高发期^[1]。据

相关报道,在国外如美国,目前其发病率和死亡率均居疾病第4位^[2],而在国内,目前其发病率和死亡率仅次于恶性肿瘤和心、脑血管疾病,位居第4位^[3]。因此,发展和探寻新的更准确地诊断COPD及早期筛查技术就显得尤为重要。

目前,对于COPD的临床诊断方法主要有肺功能检查^[4]和胸部影像学检查(如MRI^[5]和CT^[6]等)等。如肺功能检查的优势是检查过程操作简单且对患者几乎无创伤,整个检测过程只需要患者对着仪器用力吹气就可判断该患者是否患有COPD以及患病程度,但美中不足的是它灵敏性和重复性较差。而胸部影像学检查,与前者相比,它明显优势是具有较高的灵敏性和特异性,但不足表现有以下几点:第一,

【收稿日期】2020-03-12

【基金项目】国家自然科学基金(81673917)

【作者简介】何则皓,学士,研究方向:波谱分析,E-mail: 16307110008@fudan.edu.cn

【通信作者】王桂芳,E-mail: gfwang@fudan.edu.cn;陈文学,E-mail: wxchen@fudan.edu.cn

患者在检测过程中不断自主呼吸会干扰和影响胸部成像的结果;第二,仪器本身所使用的具有放射性的检测光源对人体有一定的伤害;第三,影像学检查对于COPD的分级效果较差。

众所周知,核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)技术是目前唯一可以无创研究活体器官和组织代谢变化的非侵入性技术^[7]。它最明显的优势是:其一,由于检测的样本一般是离体状态,因而对受检人体无损伤,对样本也无破坏性;其二,标本处理简单,结果分析快速且高通量(通常检测一个样本只需要大约15 min)。因此,它和质谱(MS)和色谱(LC)等^[8-9]分析技术一样,已逐渐成为当今社会最重要的常规分析检测手段。

目前,国内外有几个课题组已经利用NMR技术对COPD的诊断进行了相关研究。例如,在2010年,Mcclay等^[10]通过NMR技术探讨了患有COPD和无COPD症状(即正常对照)人群中尿液的代谢物变化情况,结果发现在尿液中有3个代谢物(葫芦巴碱、马尿酸盐和甲酸盐)具有明显诊断特征。在2012年,Ubhi等^[11]再次以NMR技术分析了COPD患者血样中代谢物的变化情况,结果发现与正常对照组相比,在COPD样本中脂蛋白和N,N-二甲基甘氨酸(俗称维生素B16)含量减少,而谷氨酰胺、苯丙氨酸、3-甲基组氨酸和酮体等代谢物浓度增加。随后,Wang等^[12]通过NMR技术详细分析了32例COPD患者和21例健康者尿样和血样中代谢物的变化,结果发现与健康对照组相比,在COPD患者组血样中如丙氨酸、甘油磷酸胆碱和脂肪酸等5种代谢物浓度,以及尿液中如乳酸、肌肽和肌酸肝等近十种代谢物浓度均展现出显著性差别。然而,上述报道其研究对象,不是集中在COPD分期较高(如III和IV期)就是集中在年龄较高的老年人群(均值约65~70岁),而很少讨论COPD分期较低(如<II)或年龄较小(如<40岁)人群。

本研究主要利用液体核磁共振氢谱(¹H NMR)技术分析了42例COPD分期低(<II期)患者和50例健康志愿者的血液样品中一些代谢物的变化,并通过样本中一些代谢物的变化特征和生化信息,从分子水平能快速寻找到诊断COPD的生物标志物,从而为COPD早期筛查和诊断标志物的研究提供帮助。

1 材料与方法

1.1 受检者血液标本收集

本研究中92例受检者的血液样品取材于健康体检人群(上海市闸北区中心医院)。其中50例为健康

志愿者的血液样品,男22例,女28例;而42例为COPD(<II期)患者的血液样品,男23例,女19例。

对每一位受检者,首先取2 mL的血液样品作为检测标本,然后在4 °C下,以转速为12 000 r/min的离心机进行离心15 min左右,随后取上层血清,并转移到冻存管存放,最后放入-85 °C的超低温冰箱保存直至¹H NMR分析,每个样品预处理过程时间一般不超过20 min。本研究已得到医院伦理委员会批准,本研究中的受检者均被告知样本的研究目的,且签署了知情同意书。

1.2 血液样本的¹H NMR

所有样品的¹H NMR谱图均是在复旦大学化学系一台400 MHz Bruker Avance II谱仪上进行检测得到。每个样本的NMR数据采集使用的脉冲序列是预饱和压水的Noesypr1D,其采样参数分别为:数据点为32 k,谱宽为8 kHz,采样延迟为3 s,采样累加次数为128次,混合时间为90 ms。

对上述采集得到的FID数据分别用0.3 Hz的窗函数先进行傅里叶变换,然后用Topspin 1.3b(Bruker, Germany)软件对所有波谱进行自动相位和基线校正处理,以得到每个血液样本的高分辨¹H NMR,最后用乳酸甲基峰的化学位移值(δ 1.33)进行定标。

1.3 数据处理和统计学方法

由于组织萃取液的波谱在芳香区(δ 5.0~10.0)的信号较少、较弱,所以只选取化学位移值在(δ 0.50~4.50)的区间段波谱进行分析。即首先用等值的0.02 ppm分段积分区间将每个谱分成200段,然后将每个谱的所有积分值进行归一化。最后,以一些信号峰所在区域的分段归一化的积分值作为该信号区对应代谢物的相对浓度进行相关的统计分析。此研究中所有样本的数据统计分析主要是利用SPSS 17.0统计软件进行分析,组间采用独立 t 检验方法进行处理和分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受检者年龄分析

对50例健康志愿者而言,该组样本的年龄是19~59岁,均值是33.3岁,标准偏差是9.0岁,年龄超过50岁的只有4例,占本组总人数的8%;而对于COPD组来说,该组的年龄是23~60岁,均值是40.2岁,标准偏差是12.3岁,超过50岁的有14例,占该组人数的33%。如表1所示,两组间人群的年龄差异有统计学意义($P=0.003$),显然,50岁以上依然是COPD高风险人群,但该研究也显示COPD患者年龄有减小趋势(如<40岁,占比26%,24/92)。

表1 受检者年龄数据的统计分析

Tab.1 Statistical analysis of the age of subjects

| 年龄/岁 | 健康组(n=50) | | COPD组(n=42) | | P值 |
|-------|-----------|----------|-------------|-----------|-------|
| | 样本数/% | 均值±标准差 | 样本数/% | 均值±标准差 | |
| 19-60 | 50 | 33.3±9.0 | 42 | 40.2±12.3 | 0.003 |
| ≤29 | 18(36.0%) | 25.0±3.3 | 12(28.6%) | 26.1±2.2 | |
| 30-39 | 21(42.0%) | 33.3±2.2 | 12(28.6%) | 35.8±2.8 | |
| 40-49 | 7(14.0%) | 41.4±1.5 | 4(9.5%) | 41.5±1.7 | |
| ≥50 | 4(8.0%) | 55.0±4.1 | 14(33.3%) | 55.6±2.6 | |

2.2 受检者血液样本谱图

图1是健康组C4010001号样本和COPD患者组S4010263号样本的¹H NMR谱图。这里,首先仅凭肉眼从这两个样本的NMR谱图中就能粗略地发现有些2、3处峰值(如 δ 3.72、3.32、2.36等)有明显区别,但在那些较微小的信号峰区域,有时仅凭肉眼是很难进行直观的比较。另一方面,由于每个样本之间均存在个体性差异,那么当检测的样本数增加时,刚刚在前面谱图中发现具有明显差别的信号区是否依然存在同样的差别?这往往让我们难以判断。因此,借用相应的统计分析软件(如SPSS 17.0)进行全面精确的分析是十分必要的。

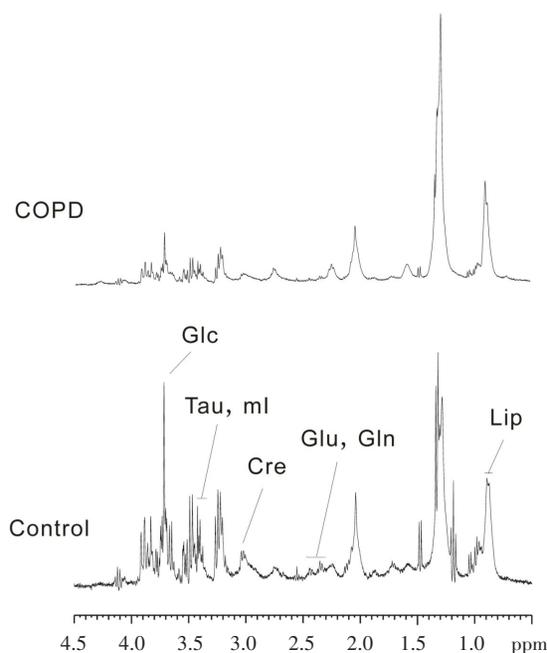


图1 健康志愿者C4010001样本与COPD患者S4010263样本的¹H NMR谱图

Fig.1 The ¹H NMR spectra of C4010001 sample in healthy control group and S4010263 sample in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) group

Glc: 葡萄糖; Tau: 牛磺酸; ml: 肌醇; Cre: 肌酸; Glu: 谷氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Lip: 脂类

2.3 受检者血液样本统计分析

将92例受检者的NMR数据导入SPSS 17.0软件进行组间各变量的统计分析,结果汇总如表2所示,即具有生物统计意义($P<0.05$)对应的代谢物信号区域如图1所示的信号区(如Glc、Tau和Cre等峰)。

如表2所示,根据已有的文献[7, 12-13]报道和我们的2D NMR波谱(数据未展示)对代谢物的归属情况,我们发现化学位移在3.74~3.70区域主要为代谢物葡萄糖(δ 3.72)的信号区,如与健康对照组相比,在COPD组血液中的葡萄糖浓度显著下降($P<0.05$)。同样,出现显著下降的还有肌酸(δ 3.02)和脂类(δ 0.88)区域信号;而在牛磺酸和肌醇(δ 3.32)以及谷氨类(δ 2.36、2.44)物质对应的代谢物区域,其COPD患者在血液中的浓度则相应出现显著升高($P<0.05$)。

此外,为了消去因个别代谢物出现极值而影响统计分析的结果,在这里,我们利用代谢物与代谢物之间的浓度比值再进行了一次统计分析,其结果总结在表3。

由表3可知,只有2个代谢物区域与葡萄糖的浓度比值(即牛磺酸区/葡萄糖和谷氨类区/葡萄糖)在组间具有显著差别($P<0.05$)。比如,在谷氨类物质(δ 2.50~2.26)区域,健康组和COPD组的谷氨类物质(包含谷氨酸和谷氨酰胺)与葡萄糖的浓度比值分别为 0.21 ± 0.15 和 0.30 ± 0.17 ,显然,与健康组相比,在COPD组该比值出现显著性升高。

因此,通过上述分析和比较,这些代谢物区域中的各代谢物浓度或浓度比值可以考虑作为判断是否患有COPD的诊断标志物。

3 讨论

3.1 年龄对于COPD的影响

相关研究可参见已有文献报道,如在2013年, Baty等^[14]就曾调查了瑞士此前近十年约1300多万住院病例,发现其中有约34万病例是与COPD有关(占

表2 血液样品中一些代谢物的相对百分浓度的统计分析

Tab.2 Statistical analysis of relative percentage concentrations of some metabolites in blood samples

| 代谢物缩写(δ) | 化学位移区间(δ) | 代谢物名称 | 健康组均值 \pm 标准偏差 | 患者组均值 \pm 标准偏差 | P值 |
|----------------------|--------------------|--------|------------------|------------------|-------|
| Glc(3.72) | 3.74-3.70 | 葡萄糖 | 2.15 \pm 0.58 | 1.80 \pm 0.58 | 0.005 |
| Tau, ml(3.32) | 3.34-3.30 | 牛磺酸、肌醇 | 0.54 \pm 0.44 | 0.79 \pm 0.51 | 0.015 |
| Cre(3.02) | 3.04-3.00 | 肌酸 | 0.66 \pm 0.15 | 0.60 \pm 0.14 | 0.048 |
| Glu, Gln(2.36, 2.44) | 2.50-2.26 | 谷氨类 | 4.86 \pm 2.01 | 6.18 \pm 2.66 | 0.008 |
| Lip(0.88) | 0.90-0.86 | 脂类 | 2.64 \pm 0.52 | 2.39 \pm 0.54 | 0.026 |

表3 血液样品中一些代谢物与葡萄糖的浓度比值的统计分析

Tab.3 Statistical analysis of the concentration ratios of some metabolites over glucose in blood samples

| 序号 | 代谢物浓度比值 | 健康组均值 \pm 标准偏差 | 患者组均值 \pm 标准偏差 | P值 |
|----|------------|------------------|------------------|-------|
| R1 | 牛磺酸、肌醇/葡萄糖 | 0.11 \pm 0.12 | 0.17 \pm 0.13 | 0.015 |
| R2 | 肌酸/葡萄糖 | 0.32 \pm 0.07 | 0.35 \pm 0.09 | 0.064 |
| R3 | 谷氨类/葡萄糖 | 0.21 \pm 0.15 | 0.30 \pm 0.17 | 0.006 |
| R4 | 脂类/葡萄糖 | 1.31 \pm 0.43 | 1.43 \pm 0.49 | 0.212 |

比约2.6%)。这些COPD病例的年龄分布是64~80岁,均值是73岁。而在2016年,Denguezli等^[15]报道了非吸烟人群COPD占比约4.7%(吸烟人群COPD占比7.1%),他们的年龄均值男性为55岁,女性为52岁,且当年龄为70岁以上时,在吸烟人群中男性COPD发生率一般高于女性,而在非吸烟人群中其结果正好相反,即女性COPD发生率高于男性。

在我们的研究中,健康对照组和COPD组的年龄均值和偏差分别为(33.3 \pm 9.0)、(40.2 \pm 12.3)岁(表1)。尽管总样本数有限,但数据显示:当受检者年龄超过40岁时其患COPD的风险依然会增加(同龄人占比62%,即18/29),而且40岁以上人群在COPD组比例(43%,18/42)也是明显高于健康对照组(22%,11/50),这基本与前面报道一致^[14-15]。此外,本研究显示40岁以下中青年人群患COPD风险也同样存在(占比38%,即24/63),这说明COPD有向年轻化发展趋势。因此,年龄或许是影响COPD一个很重要的参数。

3.2 COPD诊断标志物的早期筛查

对代谢物的浓度而言,我们知道葡萄糖(Glc)和肌酸(Cre)均是提供能量代谢的物质,一般当机体发生病变时它们的含量会下降^[7,16];牛磺酸(Tau)和肌醇(ml)是调节或传递机体正常生理活动的活性物质,如组织发生恶变时其浓度也会升高^[7,17];以谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln)等为代表的谷氨类物质是参与三羧酸循环及侧链代谢的重要物质,通常当机体或组织发生病变时均会升高^[16];而脂类物质(Lip)的

代谢通常与无氧有关,在机体发生癌变时其含量一般是增加的^[7],然Ubhi等^[11]和Wang等^[12]却发现,与正常对照组相比,在COPD患者血样中脂类的浓度是减小的。因此,根据本研究结果(图1和表2),我们观察到在COPD组血样中谷氨类物质的升高和脂类物质的下降与前面的报道^[11-12]基本上是一致的,而且与杨秀云等^[18]报道的COPD急性加重组人群经药物治疗后能提升谷氨类物质的水平也基本吻合。而我们观察到在组间葡萄糖、肌酸和牛磺酸等物质浓度的显著性变化迄今未见报道,是突破性的。在此,我们推测:当受检者出现COPD症状,其血样中葡萄糖、肌酸和脂类等物质的浓度水平出现下降,可能意味着其能量代谢加快,它们的大量消耗或许又导致牛磺酸、肌醇和谷氨类等物质含量的异常增加。

那么,这种代谢物浓度之间表现出来的负相关将为我们进一步的浓度比值分析和组间区分提供帮助。由表3可知,在一些代谢物浓度比值之间,我们确实发现了有2组代谢物的浓度比值出现显著性升高(其均值同比约增加50%, $P<0.05$),它们分别是牛磺酸、肌醇和谷氨类物质区域与葡萄糖的浓度比值。这次发现也是首次报道。显然,与代谢物浓度相比,如直接分析代谢物浓度比值将更为简便和快速。

综上所述,尽管本研究的许多发现具有一定的突破性,但依然有些美中不足:第一,本研究中所讨论的样本数还是非常有限的;第二,尽管NMR技术对结果分析具有快速和高通量等优势,但对样本中

代谢物的绝对定量仍存在一定的困难;第三,由于本研究受场强和NMR实验脉冲序列数据采集的限制难免会出现一些谱峰的重叠,从而影响代谢物的含量(或浓度比值)计算的精确度。

接下来的工作,除需要继续增加样本数量以验证本研究中这些发现的可靠性外,还可以采用提高NMR场强或采用CPMG等多种脉冲技术以压制一些大分子物质和脂类的信号,减小代谢物信号峰的重叠,从而更清晰、更准确地定量标本中各种代谢物的信息。此外,还可以考虑将NMR技术与MS或LC等技术联用^[19-22],从而提高分析检测的灵敏性和准确度。

4 结论

本研究运用¹H NMR技术直接分析了92例人体血液样本中的代谢物变化特征。结果表明:第一,当受检者年龄超过40岁时会增加患COPD风险,而且COPD有向年轻化的发展趋势(如<40岁的中青年人群);第二,血液中一些代谢物(如牛磺酸和谷氨酸等)浓度变化或它们与葡萄糖浓度比值变化是区分有无COPD最明显特征。因此,以人体血液样本为研究对象,利用该技术探讨COPD的早期筛查和诊断标志物具有可行性。

【参考文献】

- [1] LOPEZ A D, SHIBUYA K, RAO C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections[J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(2): 397-412.
- [2] VESTBO J, HURD S S, AGUST A G, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary[J]. *Am J Resp Crit Care*, 2013, 187(4): 347-365.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. *中华结核与呼吸杂志*, 2013, 36(4): 255-264.
Chronic Obstructive Pulmonary Disease Group, Respiratory Branch, Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease (2013 Revision)[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiration Disease*, 2013, 36(4): 255-264.
- [4] RANU H, WILDE M, MADDEN B. Pulmonary function tests[J]. *Ulster Med J*, 2011, 80(2): 84-90.
- [5] XIA Y, GUAN Y, FAN L, et al. Dynamic contrast enhanced magnetic resonance perfusion imaging in high-risk smokers and smoking-related COPD: correlations with pulmonary function tests and quantitative computed tomography [J]. *J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014, 11(5): 510-520.
- [6] FAN L, XIA Y, GUAN Y, et al. Characteristic features of pulmonary function test, CT volume analysis and MR perfusion imaging in COPD patients with different HRCT phenotypes[J]. *Clin Respir J*, 2014, 8(1): 45-54.
- [7] CHEN W X, ZU Y K, HUANG Q, et al. Study on metabonomic characteristics of human lung cancer using high resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *Magn Reson Med*, 2011, 66(6): 1531-1540.
- [8] FUMAGALLI M, FERRARI F, LUISETTI M, et al. Profiling the proteome of exhaled breath condensate in healthy smokers and COPD patients by LC-MS/MS [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 13894-13910.
- [9] BUSCHER B A, JÄGFELDT H, SANDMAN H, et al. The determination of budesonide and fluticasone in human sputum samples collected from COPD patients using LC-MS/MS[J]. *J Chromatogr B*, 2012, 880(1): 6-11.
- [10] MCCLAY J L, ADKINS D E, ISERN N G, et al. ¹H nuclear magnetic resonance metabolomics analysis identifies novel urinary biomarkers for lung function[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 3083-3090.
- [11] UBHI B K, RILEY J H, SHAW P A, et al. Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients[J]. *Eur Respir J*, 2012, 40(2): 345-355.
- [12] WANG L L, TANG Y F, LIU S, et al. Metabonomic profiling of serum and urine by ¹H NMR-based spectroscopy discriminates patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy individuals[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65676.
- [13] NICHOLSON J K, FOXALL P J, SPRUAL M, et al. 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. *Anal Chem*, 1995, 67(5): 793-811.
- [14] BATY F, PUTORA P M, ISENRING B, et al. Comorbidities and burden of COPD: a population based case-control study[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63285.
- [15] DENGUEZLI M, DALDOUL H, HARRABI I, et al. COPD in nonsmokers: reports from the tunisian population-based burden of obstructive lung disease study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151981.
- [16] WU G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition [J]. *Amino Acids*, 2009, 37: 1-17.
- [17] WEN C Y, LI F G, ZHANG L Y, et al. Taurine is involved in energy metabolism in muscles, adipose tissue, and the liver[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(2): 1800536.
- [18] 杨秀云, 黄飞华, 张永建, 等. 基于¹H核磁共振技术对慢性阻塞性肺疾病急性加重期血清代谢组学的研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(11): 899-900.
YANG X Y, HUANG F H, ZHANG Y J, et al. Study on serum metabonomics of acute exacerbation of COPD based on ¹H NMR[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiration Disease*, 2016, 39(11): 899-900.
- [19] TOKUNAGA T, AKAGI K I, OKAMOTO M. Sensitivity enhancement by chromatographic peak concentration with ultra-high performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for minor impurity analysis[J]. *J Chromatogra A*, 2017, 1508: 163-168.
- [20] MODI V S, SIDDIQUE S S, PRAJAPATI P B, et al. A technique expanding the limits of structure elucidation: LC-NMR[J]. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2016, 39(1): 148-155.
- [21] FEI Q, WANG D F, JASBI P, et al. Combining NMR and MS with chemical derivatization for absolute quantification with reduced matrix effects[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(6): 4055-4062.
- [22] ALVES E G, SILVA L M, RIBEIRO P R, et al. ¹H NMR and LC-MS-based metabonomic approach for evaluation of the seasonality and viticulture practice in wines from Sao Francisco River Valley, a Brazilian semi-arid region[J]. *Food Chem*, 2019, 289: 558-567.

(编辑:陈丽霞)