

核磁共振技术的定量方法综述*

周晓力¹, 李增鑫², 刘万卉^{2**}, 尹利辉^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 烟台大学, 烟台 264003)

摘要:核磁共振技术不仅是优秀的定性技术,在定量方面,也有着其独特的优势。作为一种高选择性、快速、经济的定量分析方法,核磁定量技术已广泛应用于医药、化工、食品等领域。核磁共振定量技术的基本原理是检测的磁性核共振信号强度与相应核的数成正比,并可根据样品性质,灵活选择相应的技术手段和定量方法,具有广泛的应用价值。本文针对核磁定量技术的定量方法,结合相关文献报道应用研究成果进行了系统的总结,为其实际应用及研究提供借鉴。

关键词:核磁定量;基本原理;相对定量法;归一化法;内标法;外部标准法;电子参考获取体内浓度法;通过信号注入进行幅度校正参考法;标准添加法;标准曲线法;基于脉冲长度的浓度测定法;人工信号量化法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)10 - 1655 - 10

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2023 - 0803

A review of nuclear magnetic resonance quantitative technique*

ZHOU Xiao - li¹, LI Zeng - xin², LIU Wan - hui^{2**}, YIN Li - hui^{1**}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Yantai University, Yantai 264003, China)

Abstract: Nuclear magnetic resonance technology is not only an excellent qualitative technique, but also has its unique advantages in quantitative aspects. As a highly selective, fast, and economical quantitative analysis method, nuclear magnetic quantification technology has been widely applied in fields such as medicine, chemical industry, and food. The basic principle of nuclear magnetic resonance quantitative technology is that the strength of the detected magnetic resonance signal is proportional to the number of corresponding nuclear. Based on the properties of the sample, corresponding technical means and quantitative methods can be flexibly selected, which have wide application value. This article provides a systematic summary of the quantitative methods of nuclear magnetic quantification technology combined with relevant literature reports and research results, providing reference for its practical application and research.

Keywords: quantitative nuclear magnetic resonance; basic principle; relative quantification method; normalization method; internal standard method; external standard method; electronic reference to access *in - vivo* concentration method; amplitude - corrected referencing through signal injection method; standard addition method; standard curve method; pulse length based concentration determination method; quantification by artificial signal method

* 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金项目(GJJS - 2022 - 5 - 2); 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室项目(2023HYZX08)

** 通信作者 刘万卉 Tel: (0535) 3946254; E - mail: wanhuiliu@ytu.edu.cn

尹利辉 Tel: (010) 53851547; E - mail: yinlihui@nifdc.org.cn

第一作者 周晓力 Tel: (010) 53851629; E - mail: zhouxiaoli@nifdc.org.cn

李增鑫 Tel: (010) 53851629; E - mail: 1171644839@qq.com

1945年, Purcell等^[1]用吸收法首次观察到固体石蜡的核磁共振现象。吸收法的原理是粒子在满足共振条件的射频电磁场的作用下, 处于低能级的粒子可吸收射频场 ΔE 的能量跃迁到高能级, 而处于高能级的粒子又可把能量交给晶格而回到低能级。若样品弛豫时间不长, 能够建立自旋与晶格之间的热平衡, 保持低能级粒子数多于高能级, 便能观察到持续的核磁共振信号。1951年, Bloch^[2]用感应法首次观察到水的核磁共振现象, 感应法的原理是当核磁矩在射频场作用下发生转向时, 宏观磁化矢量 M 随之改变, 根据电磁感应定律, 此时接收线圈上便会产生核感应电动势, 从而检测到信号。在随后的几年间, Bloembergen、Hahn等陆续发现了弛豫、自旋回波、化学位移以及自旋-自旋耦合等现象^[3-6], 意味着核磁共振技术逐步成为解决化学问题的有力工具。1963年, 核磁共振技术首次应用于定量分析, Jungnickel等^[7]利用定量核磁技术确定了26种纯有机物质的分子内质子比率; Hollis^[8]分析了3个待测物阿司匹林、非那西汀和咖啡因在各自混合物中的含量。此后随着磁场强度的提高、超低温探头的出现等, 使得定量核磁技术的灵敏度及分辨率不断提高, 应用也越来越广泛。

核磁定量技术可以集定性鉴别与定量测定于一体, 与其他分析技术相比, 不需要自身对照品, 不需要分离多组分样品, 能同时测定混合物中的多个组分, 样品前处理简单^[9]。USP第19版、BP 1975年增补版、JP 12版以及EP 5.0版开始把核磁定量技术作为法定标准收载于附录中。2000年, 国际化学测量委员会把该技术定义为基本比例测定方法^[10-11]。而我国对核磁定量技术研究相对较晚, 在2010年版《中华人民共和国药典》才把该技术作为法定标准收载于附录中。

核磁定量技术既可采用一维也可使用二维核磁实验来实现定量目的。由于氢是构成有机分子的主要元素, 分布普遍, ^1H 核的天然丰度高, 因此氢核灵敏度高, 且使用范围广, 是最常用的一维核磁共振技术。但氢谱的谱宽较窄, 信息量大, 重叠严重。若样品分子中含有其他杂原子磁性核, 如 ^{19}F 、 ^{31}P 、 ^{15}N 等, 也可选择相应的核磁共振实验进行定量, 以便获得更“干净”的谱图。同时在分析复杂样品时, 也可选用化学位移相关谱 (correlation spectroscopy, COSY)、全相关谱 (total correlation spectroscopy,

TOSCY)、J-耦合谱 (J-Resolved)、异核单量子相关 (heteronuclear singular quantum correlation, HSQC) 等二维技术解决问题。目前, 核磁定量技术已经在医药^[12]、生物^[13]、化学^[14]、食品^[15-17]、农业^[18]等多个领域得到广泛应用。

核磁定量技术的定量方法众多, 除了常用的相对定量、绝对定量等, 还有像电子参考获取体内浓度 (electronic reference to access *in-vivo* concentration, ERETIC)、基于脉冲长度的浓度测定 (pulse length based concentration determination, PULCON) 等方法。本文对核磁定量的主要技术及应用进行综述。

1 基本原理

核磁定量的基本原理是信号强度与产生该信号的核数成正比^[19]。

$$I = K_s \times N$$

I 代表信号强度, N 代表原子核数目, K_s 代表光谱仪常数。在定量分析里, 所有共振线的 K_s 应保持相同。 K_s 取决于样品的性质、仪器的磁场强度和脉冲序列等因素^[19]。通过优化这些因素, 保证所有参与分析的核经历相同的磁化水平, 从而进行精确积分^[20]。

2 定量方法

2.1 相对定量法

相对定量法是最简单的核磁定量方法之一, 2个组分X、Y的摩尔比 n_x/n_y 可以由以下公式确定^[21]:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x}$$

其中, n 代表摩尔量; I 代表信号强度; N 代表核数; X、Y分别代表2个组分。

组分X的摩尔量在 m 种组分的混合物中所占的百分比可以由以下公式确定^[21]:

$$\frac{n_x}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{I_x/N_x}{\sum_{i=1}^m I_i/N_i} \times 100\%$$

其中, n 代表摩尔量; m 代表组分个数; X代表分析物; I 代表信号强度; N 代表核数。

该方法是定量异构体比例的重要方法。Parker^[22]在其发表的一篇综述中详细介绍了使用NMR法来测量手性分子纯度的各种技术和策略, 例如 ^2H 可以用于分析通过同位素标记的手性化合物, 特别是手性醇和胺类; ^{19}F 可以用于分析含氟原子的手性化合物; 另外还包括 ^{13}C 、 ^{31}P 、 ^{29}Si 、 ^{33}S 、 ^{77}Se 等, 均可以分析含有相应原子的手性化合物, 在实际实验中, 研

究人员需要根据目标化合物的结构和性质选择相应的核素,优化实验条件以便获得准确的手性纯度信息。Salsbury 等^[23]使用高浓度纯手性溶剂化试剂(CSA) 1,1-bis-2-naphthyl(联萘酚),采用¹H NMR 对手性胺类药物盐酸芬氟拉明、盐酸舍曲林和盐酸帕罗西汀各自的对映体进行了分离和定量。通过调整各药物与 CSA 的摩尔比,实现各自对映体之间的基线分离,在芬氟拉明与 CSA 摩尔比为 1:18 时,芬氟拉明的甲基共振出现明显基线分离;在舍曲林与 CSA 摩尔比为 1:20 时,可观察到舍曲林对映体之间的信号分离;在帕罗西汀与 CSA 摩尔比为 1:20 时,有利于实现帕罗西汀对映体之间的基线分离,但分离并不完全,通过同核去耦实验提高分辨率,进而达到定量目的。由于盐酸芬氟拉明 HPLC 法需要衍生化或需要特定的色谱柱,盐酸舍曲林 HPLC 法需要额外推导,因此作者并没有对这 2 种药物进行 HPLC 定量,而盐酸帕罗西汀 NMR 法定量结果与 HPLC 法结果一致。通过选择不同的手性溶剂化试剂,可以利用核磁共振技术分离定量不同功能的手性药物的对映体,且该技术不需要进行衍生化,也不需要特殊的耗材,非常适合快速常规分析,可用作手性 HPLC 或旋光度测定的补充或替代方法。除此之外,也有文献报道使用相对定量法结合 2D TOCSY 测量¹³C 标记的代谢物中的特定¹³C 富集度^[24];结合 3D TOCSY-HSQC+非等间距采样用于¹³C-代谢通量分析^[25];结合 3D Ultrafast J-Resolved Correlation Spectroscopy (UFJCSY) NMR 测量复杂生物样品中的位点特异性¹³C 同位素丰度^[26]。

2.2 归一化法 归一化法,也叫做 100% method 法,公式如下^[27]:

$$P(\%) = \frac{n\text{Int} \cdot M_{w_t}}{n\text{Int} \cdot M_{w_t} + \sum_1^u (n\text{Int}_u \cdot M_{w_u})} \times 100\%$$

其中,nInt 为单个质子的归一化积分, M_w 为相对分子质量,t 为分析物,u 为杂质的个数。

Pauli 等^[27]以计算商业用槲皮素中组分山柰酚的含量为例,采用¹H 实验,分十步详细解释了此方法的计算过程,并最终算得山柰酚的含量为 12.20%。该方法最大优势是其不需要精确称量样品,避免了因人为或天平原因而导致称重不准确产生的误差。且该方法无需校准,适用于珍贵或者质量有限的样品。但要注意:所有杂质必须在所采集的核磁图谱上可见;不存在信号重叠现象^[21]。

2.3 内标法 内标法是核磁定量中应用最广泛的定量方法,是一种绝对定量方法,主成分的含量 P_X 可通过添加已知含量的内标物 P_{std} 通过以下公式计算^[21]:

$$P_X = \frac{I_X N_{\text{std}} M_X m_{\text{std}}}{I_{\text{std}} N_X M_{\text{std}} m_X} P_{\text{std}}$$

其中, I_X 、 I_{std} 分别代表待测物和内标物的信号强度; N_X 、 N_{std} 分别代表待测物和内标物产生相应信号的核数; M_X 、 M_{std} 分别代表待测物和内标物的相对摩尔质量; m_X 、 m_{std} 分别代表待测物和内标物的质量。

作为应用最广泛的定量方法,选择合适的内标尤为重要。内标物需自身性质稳定,不吸潮,不变质,纯度高,品质好,无毒,价低,可长期保存;在没有分析物信号的区域产生单共振线是最佳选择;不与待测样品发生反应;有较短的 T_1 值,最好与分析物参与计算的信号的 T_1 值相近^[21,28]。

Bekiroglu 等^[29]研究了 25 种核磁定量内标物的候选化合物,通过比较其溶解度、纯度、适用性及在 4 种不同氘代试剂(D_2O 、 $DMSO-d_6$ 、 CD_3OD 和 $CDCl_3$) 中的¹H 化学位移值,最终确定了 8 个化合物(2,4,6-三碘苯酚、1,3,5-三氯-2-硝基苯、3,4,5-三氯吡啶、对苯二甲酸二甲酯、1,4-二硝基苯、2,3,5-三碘苯甲酸、马来酸和富马酸)作为内标。

秦玲萍等^[30]分别采用¹H 核磁定量法和¹⁹F 核磁定量法测定盐酸莫西沙星的含量。在¹H 核磁定量中,以样品 δ 8.66 处信号为样品定量信号,以 3,5-二甲基吡啶 δ 5.74 处信号为内标定量信号;在¹⁹F 核磁定量中,以样品 δ 120.08 处信号作为内标信号,以三氟乙酸 δ 75.66 处做为内标定量信号,均采用内标法进行含量测定。分别对 2 种方法进行方法学验证,结果均符合预期。2 种方法含量测定结果与质量平衡法测定结果一致。韩智等^[31]以六甲基磷酰三胺为内标,采用³¹P 核磁定量技术测定肉制品中磷酸盐的含量,并进行了方法学验证。该方法加标回收率为 97.0%~112.0%,RSD 为 0.87%~3.2%。日内精密密度为 0.68%~3.6%,日间精密密度为 1.1%~4.5%,对市售肉制品中磷酸盐含量进行检测,核磁共振法测定结果准确,与离子色谱法无显著性差异($P > 0.05$)。

Hu 等^[32]提出了一种特殊的 HSQC 实验,称为 Time-Zero ¹H-¹³C HSQC ($HSQC_0$)。在常规的 HSQC 实验中,由于受到 C-H 异核耦合、H-H 同

核耦合以及弛豫时间的影响,峰体积与样品浓度不成正比^[33],因此无法通过常规的内标法获得分析物的量。HSQC₀实验的原理是通过重复前面谱图中包含的脉冲序列程序,获得3个HSQC_i谱,对其数据进行外推,确定HSQC₀实验中样品的信号强度,该信号类似于¹H核磁定量实验中的信号,在第一个¹H激励脉冲后立即(在零时间)获得,因此可以认为不存在信号衰减,HSQC₀中的归一化信号强度与混合物中单个化学物质的浓度成正比。在Bruker topspin软件中,HSQC₁实验需要设置梯度脉冲GPNAM1,2,13-16,形状均为SMSQ 10.100,值分别为80%、20.1%、70%、85%、15%及90%;HSQC₂实验在HSQC₁实验的基础上,增加GPNAM3和42个梯度,形状均为SMSQ 10.100,值分别为70%、17.59%;HSQC₃实验在HSQC₂实验的基础上,增加GPNAM5和62个梯度,形状均为SMSQ 10.100,值分别为60%、15.075%。

公式如下:

$$\ln(A_i, n) = \ln(A_0, n) + i \times \ln(f_A, n)$$

其中, i 代表进行HSQC实验的次数($i=1, 2, 3$); (A_i, n) 代表在第 i 次实验中样品的信号强度; (A_0, n) 代表HSQC₀实验中样品的信号浓度, (f_A, n) 表示特定衰减因子。

该实验可看作是二维实验中的内标法,不需要考虑不同峰 J_{CH} 的影响,可用于绝对定量。但需要注意以下几点:由于HSQC_i需要重复多个HSQC的脉冲,弛豫对检测的影响较大,因此该实验比较适用于小分子混合物样品的定量而不适用于大分子样品或大分子和小分子混合样品的检测,且弛豫延迟时间D1要设置成大于等于待检测样品T1的5倍;扫描次数(NS)根据样品浓度而定,为了保证在HSQC₃种仍能看到信号,最开始的NS需要设大一些,如果希望误差 $<1\%$,设置的NS最好使信噪比 $(S/N) > 150$;若为了平衡样品浓度与检测时间的问题,也可只做HSQC₁和HSQC₂2个点获取HSQC₀。Wyche^[34]使用HSQC₀法对从一种海绵分离出的复杂提取物中的具有显著抗肿瘤活性的单个化合物Thiocoranine进行了定量分析。以四甲基硅烷为内标,CDCl₃作溶剂,添加4%的Cr(AcAc)₃作为弛豫增强剂,使用700 MHz仪器进行采集,对样品1分别进行恒定时间相位循环HSQC₀实验和非恒定时间梯度选择HSCQ₀实验,对样品2进行恒

定时间相位循环HSQC₀实验,得到含量分别为1.12%、1.17%和0.90%,最终估算提取物中Thiocoranine的含量为1.0%,与实验室分离出的实际量一致。Kohda^[35]使用HSQC₀实验结合II分析研究了水溶液中nukacin ISK-1(含有3个单硫键的27个残基的抗菌肽)的两态交换,通过HSQC₀,得到了无偏差的平衡常数K,通过II分析,得到了K与速率常数 k 的乘积,利用2种方法得到的无偏差数据,生成了速率-平衡自由能关系(rate-equilibrium free energy relationship)图。与普通的HSQC相比,HSQC₀得到的速率-平衡自由能关系图分布宽度减少了约50%,显示了良好的聚类形成。而通过HSQC₀方法,作者还发现了2个特殊的氨基酸残基Abu 9和Ala 14,推断它们可能在转换态中采用了特殊构象,从而允许一些侧链穿过由单硫键形成的环结构,这2个残基为操纵nukacin ISK-1的物理化学性质和生物活性提供了有用的目标,对药物设计和疾病治疗具有潜在的应用价值。

2.4 外部标准法 内标法是将对照品与待测物混合进行采集,会有互相污染的风险,而为了避免这种风险发生,可以采用加入外部标准的方法进行分析。在同轴毛细管加入标准溶液,然后将毛细管插入含有样品溶液的核磁管中进行采集计算。分析物与标准物要溶解在同一种溶剂中,且要事先校准毛细管与核磁管的体积^[21]。在灵敏度方面,外部标准法的灵敏度要低于内标法,是由于插入毛细管后导致样品在射频线圈内所占体积减少。在5 mm核磁管中插入外径为1.8 mm的毛细管, S/N 会降低约30%,但这种降低取决于毛细管的直径,因此可以选择使用更薄的毛细管,以便在核磁管中占用更少的样品体积。而在精密度方面,外部标准法要优于内标法^[36]。

Henderson等^[37]使用额外带有同轴毛细管的特殊核磁管,以磷酸三乙酯作为外标,采用³¹P NMR测定了军用神经毒剂沙林、梭曼以及VX的纯度,并进行了方法学验证,其精密度RSD为0.50%,准确度RSD为1.0%,检测限为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,定量限为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过使用此种方式,可以有效避免标准物被军用神经毒剂所污染。Hu等^[38]使用1,1,2,2-四氯乙烷作为外部标准,将含有已知浓度的外标的毛细管插入到NMR样品管中,通过¹H NMR,测得牛奶中脂肪含量为 $(3.6 \pm 0.1)\%$,乳糖含量为

(47.8 ± 1.0) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 通过 HSQC, 首次在牛奶中定量了柠檬酸、*N*-乙酰糖类和三甲胺, 浓度分别为 (3.2 ± 0.2) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、(2.9 ± 0.1) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 (4.0 ± 0.6) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 电子参考获取体内浓度法 在 20 世纪 90 年代, 由于当时还没有理想的内部参考标准, Akoka 等^[39] 提出了电子参考获取体内浓度法 (electronic reference to access *in-vivo* concentration, ERETIC)。以盐酸三甲胺 (TMA) 做为内标, D_2O 为溶剂, 配制乳酸钠浓度范围为 5.25 ~ 54.11 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5 份样品, 通过实验对比内标法与 ERETIC 法。结果表明 ERETIC 法的准确度略好于内标法, 且当实验时间超过 56 h 时, 结果没有明显变化。Michel 等^[40] 在不同的 2D 光谱中使用 ERETIC 信号, 包括 CO-SY、J-耦合以及 HSQC 等, 证明该方法可成功应用不同的 2D 实验。使用 500 MHz 仪器, 内部增加了 1 个宽带天线的探针生成 ERETIC 信号, 使用相位重置技术便于同时检测到 ERETIC 信号和 NMR 信号, 室温下采集不同的 2D 光谱。结果证明, ERETIC 信号可以被精确地放置在谱图的任意位置, 通过调整 ERETIC 信号参数, 可在不同的 2D 光谱中轻松控制 ERETIC 峰的位置。通过应用 ERETIC 方法, 可在不同的情况下改善光谱的质量, 更有利于抑制 T1 噪音与提高分辨率, 在定量分析中有很大的潜力。在固体核磁中, 由于内部标准及外部标准应用受限, 应用 ERETIC 可以大大提高测量精度^[39]。Franconi 等^[41] 将 ERETIC 法应用到注射造影后器官的 MRI (磁共振成像) 研究。随后 ERETIC 结合高分辨率魔角光谱 (HR-MAS) 在生物医学领域得到越来越广泛的应用, 尤其是在患者诊断和临床预后提供定量信息方面^[42-43]。

ERETIC 信号使用浓度已知的溶液进行校准, 可以用于样品的定量分析。该方法通过在探头中设置一个自由线圈 (通常是 ^{13}C 线圈), 可以在采样过程中产生参考信号, 该信号由指数递减信号 (低频成分) 和观测频率的正弦信号 (高频成分) 相乘产生, 是一个具有真实 NMR 信号的所有特征的伪 FID 信号, 通过控制频率、相位和振幅等参数, 获取准确的化学位移和积分值, 进而量化谱图中的所有组分。电子信号设置在自由光谱范围内, 避免与分析物信号重叠^[38-39]。

ERETIC 信号首先要通过已知浓度的溶液进行

校准, 其公式如下:

$$[\text{ERETIC}] = [\text{REF}] \cdot \frac{A_{\text{ERETIC}}}{A_{\text{REF}}}$$

其中, $[\text{ERETIC}]$ 、 $[\text{REF}]$ 分别是 ERETIC 和标准溶液的浓度;

A_{ERETIC} 、 A_{REF} 分别是 ERETIC 和标准溶液的峰面积

校准完成后, 使用以下公式计算任意化合物的含量:

$$[\text{Comp}] = K[\text{ERETIC}] \cdot \frac{A_{\text{Comp}}}{A_{\text{ERETIC}}}$$

其中, $[\text{Comp}]$ 、 A_{Comp} 分别代表分析物的浓度和峰面积

K 是常数, 与产生信号的核数和组分的相对摩尔质量有关

无需每天都对 ERETIC 信号进行校准, 若仪器的功率、脉冲长度、室温和其他条件保持稳定, 其信号的变化是很微小的, 仅需每月校准一次即可^[45]。此方法可以适用于所有核和所有仪器, 因为参考信号的所有参数可以在很大范围内轻松调整。

2.6 通过信号注入进行幅度校正参考法 ERETIC 信号强度受到各种耦合因素的调制, 如 2 个通道之间的调谐/匹配, 线圈之间的电感和电容耦合机制, 用于耦合 ERETIC 信号的探针通道的回波损失等。若样品在不同的溶剂或盐组成中有着不同的介电特性时, 在定量分析中会引入显著误差。因此 Russell 等^[46] 在 ERETIC 的基础上, 开发了一种更具优势的方法, 即通过信号注入进行幅度校正参考法 (amplitude-corrected referencing through signal injection, ARTSI)。该方法不将参考信号直接注入任何通道上的探头, 使用插入损耗非常低的定向耦合器, 将参考信号直接通过光谱仪的整个路径。因此可以很好控制参考信号的路径, 防止其随时间退化。由于每个样品都可能改变线圈探针的接受度, 并改变信号的灵敏度, 因此需要相应的缩放电子信号强度。根据互易原理, 信号强度与探针质量因子的平方根成反比, 质量因子与 90° 脉宽的平方成反比。因此可以根据参考样品的脉宽和电子参考功率计算参考强度所需的功率, 对 ERETIC 信号进行功率校正, 更适用于盐浓度变化较大的样品。Russell 等制备了一系列含 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、0.24 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡聚糖硫酸钠和 0 ~ 250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液, 分别用 ERETIC 和

ARTSI 法测定其蔗糖浓度,而 ARTSI 法得到的数据要好于 ERETIC 法。

2.7 标准添加法和标准曲线法 标准添加法原理是将未知浓度(假设为 C_X)的分析物 X 等分成相同体积(V_X),并分别将其转移到体积为 V_i 的量瓶中,向其添加 V_s 体积的浓度为 C_s 的分析物 X 的标准溶液,随后用相应的溶剂将溶液稀释至刻度。可用以下公式计算^[38]:

$$I_T = \frac{kV_s C_s}{V_T} + \frac{kV_X C_X}{V_T} = KV_s C_s + KV_X C_X$$

其中, I_T 代表总积分面积; $K = k/V_T$

将公式变形,得到:

$$I_T = mV_s + b$$

其中, $m = KC_s$, $b = KV_X C_X$

通过线性最小二乘法确定 m, b 的值

$$\frac{m}{b} = \frac{KC_s}{KV_X C_X}$$

则分析物浓度 C_X 可由以下公式计算:

$$C_X = \frac{bC_s}{mV_X}$$

若样本量有限,可通过将对照品连续递增至分析物的单个测量等分试样来进行标准添加。在原始样品上以及每次加入标准溶液后进行测量。使用未知样品中添加的对照品的峰面积和浓度绘制曲线。分析物的浓度通过标准曲线的外推得到。Berregi 等^[47] 使用标准添加法,采集样品的 ^1H 谱图,测定了 5 种不同苹果汁中甲酸的含量。标准曲线的线性相关系数 $r = 0.9995$, 检测限计算为 $1.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 回收率在 $95\% \sim 109\%$, 日内重复性 ($n = 5$) RSD 为 3.9% , 日间重复性 ($n = 10$) RSD 为 4.6% 。Martineau 等^[48] 使用标准添加法,采集样品的 2D INADEQUATE 谱图,测定了 3 种不同的乳腺癌细胞系 (MDA - MB - 468, SKBR3 和 MCF - 7) 提取物中 15 个代谢物的绝对浓度,结果与关于乳腺癌代谢特征变化的研究一致,并且该方法展现出了良好的线性与准确度,是确定相关生物标志物的有利工具。

标准曲线法是使用一系列含有已知浓度的标准溶液,标准溶液浓度范围应当包含测定分析物所需的浓度,利用最小二乘法进行线性回归,建立线性方程,从而计算样品浓度,需要注意的是,标准溶液与测试溶液的参数应当保持一致。Chen 等^[49] 使用标准曲线法,采集样品的选择性 HSQC (band - selective

HSQC) 谱图,计算了 23 个雷公藤属倍半萜吡啶类生物碱的浓度,浓度范围为 $0.25 \sim 7.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Lewis 等^[50] 在 HSQC 实验中使用标准曲线法,测定了 3 个不同生物提取物(拟南芥、酿酒酵母和紫花苜蓿)中约 40 种代谢物的浓度,浓度范围为 $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 230 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并且使用 HSQC 方法的平均误差为 2.7% , 而 ^1H NMR 方法的误差为 16.2% , 证明在 HSQC 法比 ^1H NMR 更加准确。Dufour^[51] 使用标准曲线法,通过 2D COSY NMR 对血浆中 2 - 羟丙基 - β - 环糊精进行了定量分析,并进行了方法学验证。线性相关系数 $r = 0.996$, 定量限为 $0.112 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 重复性与中间精密度 RSD 均 $< 4.8\%$, 证明了该方法在复杂生物基质中定量分析难以检测的化合物方面的有效性。另外,Tréfi 等^[52] 将 2D DOSY NMR 与标准曲线法结合,定量分析了不同来源的氟西汀与氟伏沙明制剂中的活性成分与辅料。

标准添加法与标准曲线法均需要使用标准物质,若标准物质充足,可以考虑使用该方法解决问题。

2.8 基于脉冲长度的浓度测定法 对于生物大分子溶液而言,很难找到一种不与大分子相互作用并在光谱范围外发生共振的化合物,因此 Wider 等^[53] 基于互易原理,开发了基于脉冲长度的浓度测定法 (pulse length based concentration determination, PULCON) 定量分析蛋白质样品。其公式如下:

$$C_U = f_i c_R \frac{S_U T_U \theta_{360}^U n_R}{S_R T_R \theta_{360}^R n_U}$$

其中, S 代表信号强度,即积分; T 代表温度,以开尔文为单位; θ_{360} 代表 360° 射频脉冲; n 代表扫描次数; U 代表待测物; R 代表参考物。因子 f_i 包含在激发和信号采集之间所发生的任何信号损失,在常规一维单脉冲实验中, f_i 为 1, 在二维实验中,由于信号强度受到弛豫及 J 耦合的影响,信号存在不均匀衰减,需要对每个信号单独计算 f_i 。

该方法主要取决于传递到核磁共振探头线圈的射频功率和线圈的完美调谐/匹配。线圈功率取决于稳定的放大器,也取决于从放大器到探头的路径中相同的射频电缆、射频滤波器及其他组件,而这些部件长时间内不会损坏,因此为 PULCON 法的稳定性提供了可靠的保障。需要注意,对于高盐浓度样品,需要精确设置调谐与匹配,避免浓度测量的误差。

该方法不仅局限于蛋白质溶液的核磁共振,只要溶质可以产生核磁信号,就可以确定其浓度。Lagerquist等^[54]在³¹P NMR中使用PULCON法对木质素中的羟基含量进行测定,避免了内标信号与木质素信号重叠或内标降解导致稳定性差的问题。使用500 MHz仪器,比较了使用e-HNDI内标和PULCON法测定的香草醇及木质素样品中的羟基含量,结果证明PULCON法与传统内标法相当,该方法能解决内标的相关问题,并能与ICON相结合,可提高实验的效率和可重复性。Chen等^[49]使用PULCON法,采集样品的选择性HSQC(band-selective HSQC)谱图,将PULCON法的结果与标准曲线法结果进行横向比较,证明该方法准确可行。除此之外,PULCON法也可能在固体核磁、磁共振成像以及体内磁共振波谱中得到应用^[12,53]。

若达不到探针完美调谐的条件(阻抗匹配达到50 Ω)或样品电导过高,PULCON法可能会失败,此外,由于核磁共振激发和接受电路实际上略有不同,互易原理并不是完全准确,因此Mo等^[55]改进了此方法,用“接收效率R”表征在最佳调谐和匹配下从单位横向磁化强度下观察到的核磁信号的效率。最佳调谐条件是指在激励电路中对探头进行调谐和匹配,使其在观测频率处的射频反射最小。接收效率R相当于紫外中的消光系数。在接收器增益、激发角以及样品体积不变的情况下,经接收效率归一化的信号与浓度成正比。但该技术还未应用于小分子。

2.9 人工信号量化法 Farrant等^[56]基于绝对强度测量并结合PULCON校正,开发了用于核磁定量的

自动采集后软件。通过添加标准人工频域信号,并根据实验参数和条件的变化补偿信号,使得核磁信号的强度相对于数字参考信号同步,然后积分值自动转化为其毫摩尔当量。但添加的信号同样需要校准。这种方法叫作人工信号量化(quantification by artificial signal, QUANTAS),也可以在TOPSPIN软件中使用,称为ERETIC 2。此外,QUANTAS软件可以自动将外部标准数据集(如90°脉冲长度、扫描次数、温度和接收器增益等)复制到当前实验中以供参考。Farrant通过在¹H和¹⁹F NMR中应用QUANTAS方法,证明该方法可以从¹H核定量扩展到异核定量,并且还使用该方法评估了NMR仪的长期稳定性和对不同样品的响应再现性,探究了盐浓度对于NMR响应的影响,有利于处理含有盐分的生物样品。Waagepetersen^[57]使用QUANTAS法结合¹H NMR,确定了大鼠大脑皮层中葡萄糖、乳酸、丙氨酸、谷氨酸、GABA、谷氨酰胺和天冬氨酸的绝对浓度,使用QUANTAS法结合HSQC,确定了这些代谢物中¹³C的富集情况,说明QUANTAS法在研究代谢途径和代谢物动态方面是一种非常有利的工具。

3 总结与展望

随着技术的不断发展,核磁共振技术已经越来越多的应用于定量目的,已经逐步发展成为研究热点之一,发展前景十分广阔。本文结合相关文献报道的应用研究成果,对核磁定量技术的定量方法进行了总结,表1归纳了本文涉及的核磁定量的应用实例,希望能为核磁定量技术的进一步发展提供借鉴。

表1 核磁定量应用实例总结

Tab. 1 Summary of examples of NMR quantitative applications

方法 (method)	应用举例 (examples of NMR quantitative applications)	NMR 技术 (NMR technology)
相对定量法(relative quantification method)	盐酸芬氟拉明、盐酸舍曲林、盐酸帕罗西汀对映体定量分析(quantitative analysis of enantiomers of fenfluramine hydrochloride, sertraline hydrochloride, and paroxetine hydrochloride)	¹ H NMR
	手性胺类和醇类定量分析(quantitative analysis of chiral amine and alcohol)	² H NMR
	¹³ C 标记的代谢物中的特定 ¹³ C 富集度(specific ¹³ C enrichment in ¹³ C labeled metabolites)	2D TOSCY
	¹³ C 代谢通量分析(¹³ C metabolic flux analysis)	3D TOSCY-HSQC
	复杂生物样品中的位点特异性 ¹³ C 同位素丰度(site specific ¹³ C isotope abundance in complex biological samples)	3D UFJCSY
归一化法(normalization method)	商业用槲皮素中山柰酚定量分析(quantitative analysis of commercial quercetin and kaempferol)	¹ H NMR
内标法(internal standard method)	盐酸莫西沙星定量分析(quantitative analysis of moxifloxacin hydrochloride)	¹ H、 ¹⁹ F NMR
	肉制品中磷酸盐定量分析(quantitative analysis of phosphates in meat products)	³¹ P NMR

表1(续)

方法 (method)	应用举例 (examples of NMR quantitative applications)	NMR 技术 (NMR technology)
	Thiocoranine 定量(quantitative analysis of Thiocoranine)	HSQC ₀
	nukacin ISK-1 两态交换(two state exchange of nukacin ISK-1)	
外部标准法(external standard method)	军用神经毒剂纯度测定(purity determination of military nerve agents)	³¹ P NMR
	酸奶中各组分定量分析(quantitative analysis of each component in yogurt)	¹ H NMR、HSQC
ERETIC	乳酸钠浓度测定(determination of sodium lactate concentration)	¹ H NMR
	COSY、J-耦合、HSQC 等实验的适用性测定(applicability determination of COSY, J-coupling, HSQC and other experiments)	COSY J-耦合(J-coupling)、HSQC
	固体核磁、磁共振成像等(SS NMR, MRI, etc)	SS NMR, MRI, etc
ARTSI	蔗糖浓度测定(determination of sucrose concentration)	¹ H NMR
标准添加法(standard addition method)	苹果汁中甲酸含量测定(determination of formic acid content in apple juice)	¹ H NMR
	乳腺癌细胞系中代谢物绝对浓度的测定(determination of the absolute concentration of metabolites in breast cancer cell lines)	INADEQUATE
	雷公藤属倍半萜吡啶类生物碱浓度测定(determination of concentration of sesquiterpenoid pyridine alkaloids in the tripterygium genus)	HSQC
标准曲线法(standard curve method)	生物提取物中复杂代谢物浓度测定(determination of complex metabolite concentration in biological extracts)	
	血浆中2-羟丙基-β-环糊精进行定量分析(quantitative determination of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin in plasma)	COSY
	不同来源的氟西汀与氟伏沙明制剂中的活性成分与辅料(active ingredients and excipients in different sources of fluoxetine and fluvoxamine preparations)	DOSY
PULCON	木质素中羟基含量测定(determination of hydroxyl content in lignin)	³¹ P NMR
	雷公藤属倍半萜吡啶类生物碱浓度测定(determination of concentration of sesquiterpenoid pyridine alkaloids in the tripterygium genus)	HSQC
	固体核磁、磁共振成像等(SS NMR, MRI, etc)	SS NMR, MRI, etc 等
QUANTAS	异核定量(heteronuclear quantification)	¹⁹ F
	研究代谢途径和代谢物动态(study metabolic pathways and metabolite dynamics)	¹ H, HSQC

参考文献

- [1] PURCELL EM, TORREY HC, POUND RV. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid [J]. *Phys Rev*, 1946, 69(1-2):37
- [2] BLOCH F. Nuclear induction [J]. *Physical*, 1951, 17(3-4):272
- [3] BLOEMBERGEN N, ARMSTRONG, JA, DUCUING J, *et al.* Interactions between light waves in a nonlinear dielectric [J]. *Phys Rev*, 1962, 127(6):1918
- [4] HAHN EL, MAXWELL DE. Chemical shift and field independent frequency modulation of the spin echo envelope [J]. *Phys Rev*, 1951, 84(6):1246
- [5] RAMESY NF, PURCELL EM. Interactions between nuclear spins in molecules [J]. *Phys Rev*, 1952, 85(1):143
- [6] YU FC, PROCTOR WG. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound [J]. *Phys Rev*, 1950, 77(5):717
- [7] JUNGnickel JL, FORBES JW. Quantitative measurement of hydrogen types by integrated nuclear magnetic resonance intensities [J]. *Anal Chem*, 1963, 35(8):938
- [8] HOLLIS DP. Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1963, 35(11):1682
- [9] MALZ F, JANCKE H. Validation of quantitative NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5):813
- [10] 张芬芬, 蒋孟虹, 沈文斌, 等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药学领域的应用进展 [J]. *南京师范大学学报(工程技术版)*, 2014, 14(2):8
- ZHANG FF, JIANG MH, SHEN WB, *et al.* Progress in quantitative nuclear magnetic resonance technology in pharmaceutical applications [J]. *J Nanjing Norm Univ (Eng Technol Ed)*, 2014, 14(2):8
- [11] HOLZGRABE U, DEUBNER R, SCHOLLMAYER C, *et al.* Quantitative NMR spectroscopy - application in drug analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5):806
- [12] ULRIKE H. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical application [J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2):229
- [13] RIZZO V, PINCIROLI V. Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5):851
- [14] FIELDING L. NMR methods for the determination of protein-ligand

- and dissociation constants[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2007, 51(4):219
- [15] OHTSUKI T, SATO K, SUGIMOTO N, *et al.* Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 734: 54
- [16] TADA A, TAKAHASHI K, ISHIZUKI K, *et al.* Absolute quantitative of stivoside and rebaudioside a in commercial standard by quantitative NMR[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2013, 61(1):33
- [17] MARCONE MF, WANG S, ALBABABISH W, *et al.* Diverse food – based application of nuclear magnetic resonance(NMR) technology[J]. *Food Res Int*, 2013, 51(2):729
- [18] BEKIROGLU S, MYRBERG O, MARIANNE E, *et al.* Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(4–5): 958
- [19] ADILA K, MONHAMMAD K. Nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis: a review for its application in the chemical, pharmaceutical and medicinal domains[J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2023, 53(5):997
- [20] FRANCO PHC, BRAGA SFP, OLIVEIRA RB, *et al.* Purity determination of a new antifungal drug candidate using quantitative ^1H NMR spectroscopy: method validation and comparison of calibration approaches[J]. *Magn Reson Chem*, 2020, 58(1):97
- [21] ULRIKE H. Quantitative NMR, methods and applications[J]. *J Encycloped Spectrosc Spectrom*, 2017, 3: 816
- [22] PARKER D. NMR determination of enantiomeric purity[J]. *J Chem Rev*, 1991, 91: 1441
- [23] SALSBUURY JS, ISBESTER PK. Quantitative ^1H NMR method for the routine spectroscopic determination of enantiomeric purity of active pharmaceutical ingredients fenfluramine, sertraline, and paroxetine[J]. *Magn Reson Chem*, 2005, 43(11):910
- [24] MASSOU S, NICOLAS C, LETISSE F, *et al.* NMR – based fluxomics; quantitative 2D NMR methods for isotopomers analysis[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(16–18):2330
- [25] REARDON PN, MAREAN – REARDON CL, BUKOVEC MA, *et al.* 3D TOCSY – HSQC NMR for metabolic flux analysis using non – uniform sampling[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(5):2925
- [26] GIRAudeau P, CAHOREAU E, MASSOU S, *et al.* UFJCOASY; a fast 3D NMR method for measuring isotopic enrichments in complex sample[J]. *Chemphyschem*, 2012, 13(13):3098
- [27] PAULI GF, CHEN SN, SIMMER C, *et al.* Importance of purity evaluation and the potential of quantitative ^1H NMR as a purity assay[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(22):9220
- [28] HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2):229
- [29] RUNDLÖF T, MATHIASSEN M, BEKIROGLU S, *et al.* Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(5): 645
- [30] 秦玲萍, 王新仙, 卢定强. 核磁共振定量法测定盐酸莫西沙星的含量[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(3):375
- QIN LP, WANG XX, LU DQ. Determination of moxifloxacin hydrochloride by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. *Chin J Bioproc Eng*, 2020, 18(3):375
- [31] 韩智, 江丰, 周密, 等. 核磁共振磷谱定量测定肉制品中磷酸盐的含量[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9):275
- HAN Z, JIANG F, ZHOU M, *et al.* Quantitative determination of phosphate in meat products by ^{31}P – nuclear magnetic resonance [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(9):275
- [32] HU K, WESTLER WM, MARKLEY JL, *et al.* Simultaneous quantification and identification of individual chemicals in metabolite mixtures by two – dimensional extrapolated time – zero ^1H – ^{13}C HSQC (HSQC₀) [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(6):1662
- [33] GIRAudeau P. Quantitative 2D liquid – state NMR[J]. *Magn Reson Chem*, 2014, 52(6):259
- [34] HU K, WYCHE TP, BUGNI TS, *et al.* Selective quantification by 2D HSQC₀ spectroscopy of thiocoraline in an extract from a sponge – derived *verrucosipora* sp[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(10):2295
- [35] HAYASHI S, KOHDA D. The time – zero HSQC method improves the linear free energy relationship of a polypeptide chain through the accurate measurement of residue – specific equilibrium constants[J]. *J Biomol NMR*, 2022, 76(3):87
- [36] BHARTI, SANTOSH KB, RAJA R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy[J]. *Trends Anal Chem*, 2012, 35: 5
- [37] HENDERSON TJ. Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determinations for military nerve agents[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(1):191
- [38] HU F, FURIHATA K, KATO Y, *et al.* Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two – dimensional NMR spectroscopy [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11):4307
- [39] AKOKA S, BARANTIN L, TRIERWEILER M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method[J]. *Anal Chem*, 1999, 71(13):2554
- [40] MICHEL N, AKOKA S. The application of the ERETIC method to 2D NMR[J]. *J Magn Reson*, 2004, 168(1):118
- [41] ZIARELLI F, VIEL S, SANCHEZ S, *et al.* Precision and sensitivity optimization of quantitative measurements in solid state NMR [J]. *J Magn Reson*, 2007, 188(2):260
- [42] FRANCONI F, CHAPON C, LEMAIRE L, *et al.* Quantitative MR renography using a calibrated internal signal (ERETIC) [J]. *Magn Reson Imaging*, 2002, 20(8):587
- [43] RISA O, MELØ TM, SONNEWALD U. Quantification of amounts and ^{13}C content of metabolites in brain tissue using highresolution magic angle spinning ^{13}C NMR spectroscopy[J]. *NMR Biomed*,

- 2009, 22(3):266
- [44] SITTER B, BATHEN TF, SINGSTAD TE, *et al.* Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy[J]. *NMR Biomed*, 2010, 23(4):424
- [45] SILVESTRE V, GOUPRY S, TRIERWEILER M, *et al.* Determination of substrate and product concentrations in lactic acid bacterial fermentations by proton NMR using the ERETIC method[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(8):1862
- [46] MEHR K, JOHN B, RUSSELL D, *et al.* Electronic referencing techniques for quantitative NMR: pitfalls and how to avoid them using amplitude - corrected referencing through signal injection [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(21):8320
- [47] BERREGI I, CAMPO GD, CARACENA R, *et al.* Quantitative determination of formic acid in apple juices by ^1H NMR spectrometry[J]. *Talanta*, 2007, 72(3):1049
- [48] MARTINEAU E, TEA I, AKOKA S, *et al.* Absolute quantification of metabolites in breast cancer cell extracts by quantitative 2D ^1H INADEQUATE NMR[J]. *NMR Biomed*, 2012, 25(8):985
- [49] CHEN YW, WANG YD, YAN JG, *et al.* Quantification of sesquiterpene pyridine alkaloids from genus *tripterygium* by band - selective HSQC NMR[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1274(15):341568
- [50] LEWIS IA, SCHOMMER SC, HODIS B, *et al.* Method for determining molar concentrations of metabolites in complex solutions from two - dimensional $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ NMR spectra[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(24):9385
- [51] DUFOUR G, EVRARD B, TULLIO PD. 2D - COSY NMR spectroscopy as a quantitative tool in biological matrix: application to cyclodextrins[J]. *AAPS J*, 2015, 17(6):1501
- [52] TREFI S, GILARD V, BALAYSSAC S, *et al.* Quality assessment of fluoxetine and fluvoxamine pharmaceutical formulations purchased in different countries or via the Internet by ^{19}F and 2D DOSY ^1H NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(4):707
- [53] WIDER G, DREIER L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy[J]. *J Am Soc*, 2006, 128(8):2571
- [54] LAGERQUIST L, RAHKILA J, EKLUND P. Utilization of ^{31}P PULCON for quantitative hydroxyl group determination in lignin by NMR spectroscopy[J]. *ACS Sustain Chem Engin*, 2019, 7(9):9002
- [55] MO H, HARWOOD J, ZHANG S, *et al.* R: a quantitative measure of NMR signal receiving efficiency[J]. *J Magn Reson*, 2009, 200(2):239
- [56] FARRANT RD, HLOOERTON JC, LYNN SM, *et al.* NMR quantification using an artificial signal[J]. *Magn Reson Chem*, 2010, 48(10):753
- [57] SICKMANN HM, WAAGEPETERSEN HS, SCHOUSBOE A, *et al.* Brain glycogen and its role in supporting glutamate and GABA homeostasis in a type 2 diabetes rat model[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(3):267

(本文于2023年12月18日收到)