

核磁共振技术在药物检测中的应用进展

刘雅琴*, 余明新, 何玲

浙江大学化学系, 杭州 310027

摘要:核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术已发展成为新化合物结构鉴定和天然产物药物分析不可缺少的工具。因其具有非破坏性和无侵入性等特点,广泛应用于药物领域,从合成产物的表征到生物系统分子结构和构象的测定以及分析分子间相互作用等研究都离不开这个工具。核磁共振能提供丰富且精确的结构信息,如拉莫尔频率、化学位移、自旋-自旋耦合、偶极偶合和弛豫时间等参数,成为结构解析的“金标准”。本文总结了核磁共振技术在药物发现、药物相互作用、药物代谢组学以及固态核磁共振技术在固态药物分析中的应用进展。

关键词:核磁共振技术;药物发现;药物检测;药物相互作用;药物代谢组学;固态核磁共振

中图分类号:O657;R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)11-1971-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.11.018

Application progress of nuclear magnetic resonance in pharmaceutical detection

LIU Ya-qin*, YU Ming-xin, HE Ling

Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

Abstract: Nuclear magnetic resonance (NMR) technology has evolved into an indispensable tool for the structural identification of new compounds and the analysis of natural products. Because of its non-destructive and non-invasive characteristics, it is widely used in the field of pharmaceuticals, from the characterization of synthetic products to the determination of molecular structure and conformation of biological systems and the analysis of molecular interactions. NMR can provide rich and accurate structural information, such as Larmor frequency, chemical shift, spin-spin coupling, dipole coupling, relaxation time and other parameters, which is becoming the "gold standard" for structural analysis. The paper summarizes the application and research progress of NMR in drug discovery, drug interaction, drug metabolomics and solid-state NMR (ss NMR) in solid-state drug analysis.

Key words: nuclear magnetic resonance; drug discovery; drug detection; drug interaction; drug metabolomics; solid-state NMR

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)波谱是一种基于特定原子核在外磁场中吸收与其裂分能级间能量差相对应的射频场能量而产生共振现象的分析方法。1946年由美国物理学家 Purcell 和 Bloch 等^[1-3]阐明磁共振现象并共同获得诺贝尔物理奖。在早期的研究中,药物结构的确定主要通过各种化学反应,如制备衍生物、化学降解、颜色反应等方式来完成,主要获得官能团但无法确定全部结构,一个复杂分子的结构鉴定甚至花费几十年的努力。近些年,对于难以结晶的分子,晶体海绵法、冷冻电镜等技术相继被开发用于分子结构测定,但是

对于无定形及低晶格能的非结晶分子,上述方法仍然捉襟见肘,难于应付。随着波谱学技术的发展和广泛应用,对药物的研究取得显著进展,核磁共振成为最实用、最全面的分析方法,其精确构象分析是单晶衍射与电镜所无法比拟。与其它分析方法相比较,核磁共振的优点有以下几种:①提供丰富且精确的结构信息,由拉莫尔频率获知原子核;化学位移推出官能团;自旋-自旋-偶合得出原子的相关性;偶极偶合获得空间位置关系;弛豫现象用于动力学研究。②简便性,药物不需要进行繁杂的前处理过程,可避免处理过程中的误差,且分析时间短。③无损伤性,在样品量非常有限的情况下,在对其进行核磁分析后,没有任何的损坏和浪费,性质不发生改变,还可以进行再使用。特别是二维核磁共振的发展使其成为化学结构研究的极为重要工具,同时也打开了通

收稿日期:2022-02-18 接受日期:2022-09-21

基金项目:浙江省科技厅公益技术研究计划(LGC19B050014)

*通信作者 Tel:86-571-87951384;E-mail:yaqin86@zju.edu.cn

向药、生物医学研究的新窗口,在细节上揭示了结构和功能的关系。对于一维谱信号重叠严重、无法准确归属,难以解析的情况,需要借助二维核磁共振谱技术来解决。通过 COSY 或 TOCSY 谱确定分子中各个位置的质子;在 HSQC 谱上通过质子找到对应的碳信号;用 HMBC 谱确认信号的归属,并解析碳与质子的连接位置及连接顺序等。核磁共振波谱正响应现代药物开发需要,提供药物相互作用的信息、特定的分子靶点和药理作用位点。随着核磁共振仪器硬件和脉冲方法的不断发展,加之其多功能性,它成为结构研究特别是药物研究的重要工具。核磁共振可提供一套多功能的实验方法,为药物发现提供了重要信息,从合成产物的表征、天然产物的开发到生物系统分子结构的研究。本文主要综述 NMR 技术应用于药物检测及其相关研究进展。

1 NMR 波谱在药物发现中的应用

核磁共振波谱广泛用于药物分析以识别药物及其杂质,该技术非常适用于活性药物成分 (API) 的质量评估^[13-15],定量核磁共振在药物分析中可用于确定杂质水平并阐明其结构以及评估残留溶剂的含量^[16,17]。它可以通过手性添加剂测定异构体组成,即非对映体和对映体过量的比率^[18-21]。利用 NMR 可以提供许多重要的结构信息,各种不同原子可产生不同的磁共振波谱,如¹H、¹³C、⁷Li、¹⁹F、³¹P、⁷⁷Se 等。2020 年 Oriol 等^[22]为了在实验上评估铋介导的含氟有机硼化合物中间体的形成,通过¹H、¹¹B、¹⁹F 和¹³C 核磁共振证实了含氟有机硼的形成。Geeson 等^[23]报道了用于生产高纯度硅的三氯氢硅,将三偏

磷酸还原为一种新型的二(三氯氢硅基)磷化阴离子,通过²⁹Si 和³¹P 核磁共振的特征对其结构进行分析。Binas^[24]最新观点认为 RNA 也成为了药物发现的潜在靶点,他报道用¹⁹F-NMR 作为先导物鉴定的主要方法,对 14 种不同大小、不同结构的 RNA 进行 102 个片段文库的筛选。Zhou 等^[25]为了推断一种新型含硒柱芳烃具有可逆的氧化还原反应性,使用⁷⁷Se NMR 波谱研究硒化物和硒氧化物之间的可逆转化。柱芳烃含有硒氧化物部分,在⁷⁷Se NMR 中显示化学位移 δ 为 865.85,被维生素 C 还原后其化学位移 δ 变为 269.39,表明硒氧化物部分转化为硒化物基团;添加过氧化氢后化学位移变回 865.85。Tan 等^[26]利用 NMR 中的扩散序列谱 (diffusion ordered spectroscopy, DOSY) 对生物膜加入亲水高分子后两个反应物进行虚拟分离,测定扩散速率差,如图 1 所示,均匀分散的水-表面活性剂 (AOT)-癸烷 (decane) 多相系统中各组分的扩散系数通过核磁共振测量获得,在该系统中水分子的运动被限定在纳米水滴中。因此,测量所得的水的扩散速率不是单个分子的自扩散系数,而是纳米水滴的扩散系数。由于水分子的运动被限定在纳米水滴中,其扩散系数远小于自由状态下单个水分子的扩散系数。从二维的扩散排序核磁共振谱 (2D DOSY NMR) 中可看出,作为分散相的纳米水滴的扩散系数在 $7 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ 之间,而连续相中癸烷分子的扩散系数在 $4 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$ 左右,验证了成功制备一种具有图灵结构的新型生物膜。可见,核磁共振中各种不同类型谱图的发展推动着 NMR 在药物发现环节更加广泛的应用。

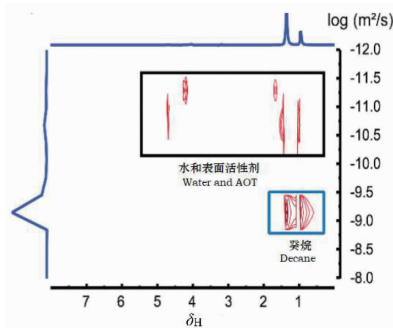


图 1 核磁共振 DOSY 谱表征生物膜的图灵结构

Fig. 1 Turing structure of biofilm by DOSY NMR

研究显示 NMR 波谱技术在药物高通量筛选 (high throughput screening, HTS)^[27-29] 和基于结构的药物发现^[30-32] 方面已发展成为新疗法发现过程背后的驱动力^[33]。核磁共振作为主要的分析工具用

于确定合成和天然产品化学先导物的化学结构和组成^[34,35]。核磁共振高通量配体筛选通常成为验证和识别新化学线索^[36,37];采用基于片段的方法意味着通过核磁共振快速筛选小型化学库可以实现结构

空间探索的指数增长,远远超过传统的 HTS 方法^[38]。

天然产物是药物发现的一个重要来源,特别是随着核磁共振方法的灵敏度和分辨率的提高,同时通过 NMR 与 HPLC 联用使得快速获得天然产物结构信息成为现实。HPLC-NMR 是高效液相色谱 (HPLC) 和核磁共振 (NMR) 联用系统,是一种高效的技术,对于复杂样品可以更好地进行快速的分离鉴定,应用于天然产物分析、代谢产物分析、药物杂质分析、结构鉴定等领域^[39]。HPLC-NMR 的主要缺点是其低灵敏度,但可通过引入超低温探头和增加磁场强度加以克服。Li 等^[40]从植物内生真菌 *Fusarium guttiforme* 次生代谢产物中分离纯化得到 7 种化合物,并通过核磁共振等波谱学手段鉴定其结构。Lever 等^[41]使用 HPLC-NMR 在海洋褐藻中的提取物中,找到 4 种未报道的化合物和 8 种已经报道的化合物,其中 5 种化合物具有选择抗菌活性。由于海洋生物活性物质具有结构复杂且含量极微的特性,LC-NMR 的联用展现了无法比拟的在线检测和结构解析的鉴定能力,极大地简化了分析过程,较好地实现了天然产物样品的在线结构分析。

2 NMR 波谱在药物相互作用中的应用

在药物研究中,NMR 是研究配体及其靶点相互作用非常重要的一个工具。核磁共振确定化学结构的实验依赖于磁化信号通过共价键或空间(构象)从一个原子核转移到另一个原子核。此外,每个原子核固有的弛豫速率,可以通过调节分子的 NMR 谱来测量,根据实验的不同,可能是构象交换、化学

交换、局部或全局动力学,也可能是分子的整体旋转和平移扩散。核磁共振技术的主要优点之一是能够获得相对简单的波谱,能够直接识别潜在配体混合物中的弱结合成分,识别配体的结合表位以及识别目标蛋白质中的结合口袋,从而了解分子中单个核的环境;人们可以利用这些相同的优势来测量小分子与其靶点的结合。小分子在溶液中很快地重新定向和扩散产生尖锐且分辨率良好的共振,而大分子在溶液中更缓慢地重新定向和扩散产生广泛且分辨率较低低的信号。Garavis 等^[42]基于¹⁹F NMR 片段的筛选,使用 355 个片段文库对 G-四链体 RNA 确定了几个对其他核酸靶点具有选择性的片段。NMR 还被用于证明一些小分子与 HIV 反式激活反应元件 (transactivation response element, TAR) 的结合稳定了低填充激发态,强调了动力学在核酸中的重要作用^[42-45]。

通过核磁共振波谱研究配体-目标结合相互作用有两种主要方法^[46,47]:配体观察法和目标观察法。前者依赖于配体 NMR 信号中的结合诱导变化,传统上由饱和转移差谱 NMR (saturation transfer difference NMR, STD NMR) 实验表示,另一方面,目标观察方法研究同位素标记目标中的结合诱导信号变化,异核单量子相关谱 (heteronuclear single quantum coherence, HSQC) 最能代表这个类别,它提供了常用的配体和靶点观察技术的信息。实验方法和标记方案的改进以及最新的生物学发现将继续激发人们对新的药物靶点的兴趣。STD NMR 谱是最灵敏的检测配体结合的实验,如图 2 所示^[12],采用 STD

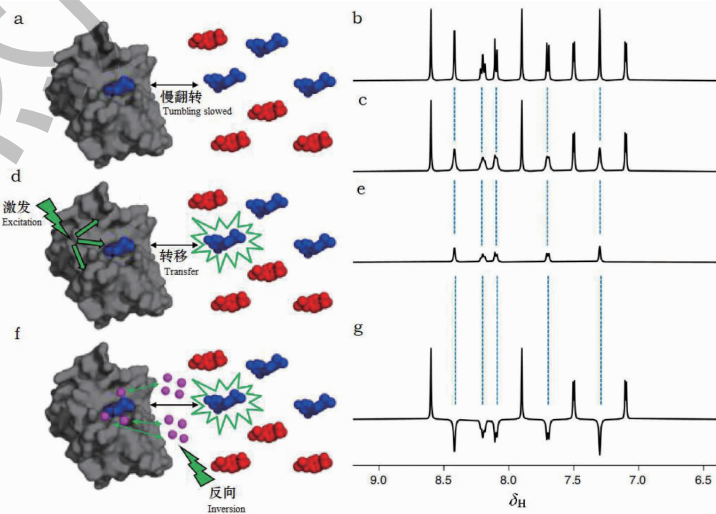


图 2 利用 STD NMR 实验观测配体的结合行为

Fig. 2 The binding behavior of ligands was observed using STD NMR experiment

NMR 实验观测配体与蛋白结合的行为, (a) 结合配体(蓝色)在束缚态和自由态之间进行缓慢翻转处于平衡状态,而非结合配体(红色)不受目标存在的影响。(b)核磁共振氢谱显示了结合和非结合配体的信号。(c)对于结合配体,NMR 信号变宽,而对于非结合配体,信号不受影响。(d)在 STD-NMR 实验中,利用一系列选择性脉冲使蛋白质饱和和扩散到靶区,最终通过结合平衡转移到自由配体。(e)STD-NMR 谱仅反映属于结合配体的信号,而未观察到来自非结合配体的信号。(f)在 WaterLOGSY (Water-ligand observed via gradient) 实验中,样品利用水分子通过 NOE 选择性转移使得结合配体的信号与非结合配体的信号相反。(g)WaterLOGSY 谱显示非结合配体与相关的结合配体的信号正好反向。该研究揭示了通过 NMR 观察生物分子的溶液行为可以获得有关其结构、动力学和相互作用的信息,这对于配体与靶点相互作用的新颖识别至关重要。

3 核磁共振技术在药物代谢组学中的应用

磁共振波谱可作为药物治疗反应评估的定量方法,能提供溶液里药物代谢组学的结构信息,如原子水平上的修饰位点、区域和立体异构体特征、动态物理性质以及如何测量这些参数^[48,49]。事实上,该技术已经应用于不同领域的代谢物的无创体内分析,例如癌症中一些内源性代谢物的³¹P、¹³C、¹⁹F 和¹H 磁共振波谱^[50-52]信号可以被观察到。例如,¹⁹F NMR 已经成功地应用于评估氟化药物的药代动力学^[53]。根据时间过程,这些测定与二维和更高维方法相结合以区分药物信号与不可避免的重叠共振,并获得更多信息,当然这些例子基本上仅限于高浓度给药的癌症治疗药物。一般来说核磁共振波谱在药理学研究中的作用是研究药物对组织形态、生理学和生物化学的影响,而不是研究药物本身在机体中的去向^[54,55]。可见,核磁共振是一种无损地表征多种元素的重要方法。

氢核磁共振波谱已成功应用于心力衰竭患者的可靠诊断方法。Kang 等^[56]从尿苷¹H NMR 测量中获得代谢产物抑制了酮体水平的增加,同时降低了三羧酸循环中间产物的水平,表明能量代谢改变,包括三羧酸循环和脂肪酸代谢的改变,这些是通过样品的氢谱在规定化学位移处出现特征峰信号的方法进行鉴别。观察到涉及甲基丙二酸和核苷酸代谢的代谢途径中的扰动。¹H NMR 光谱已经成为植物代谢信息处理的一项强有力的技术,主要是因为与其

他分析技术相比,该技术对样品需求量小,无破坏性,定量准确。核磁共振波谱将继续成为药物代谢产物结构阐明工具的重要组成部分,它提供的信息类型与从药物代谢工作中使用的主要分析工具 HPLC-MS 获得的信息可完美互补^[57]。

4 固态核磁共振技术在固态药物分析中的应用

固态核磁共振(solid state nuclear magnetic resonance, ssNMR)在宏观和微观尺度上获得的分子特性为药物和药物产品的物理化学稳定性提供了关键信息,能够确定药物作为纯物质或在配方产品中的状态,而无需从配方中提取。该药物通常表现出与赋形剂不同的共振,从而有可能在制剂中识别药物。定量碳谱交叉极化魔角旋转(cross polarisation-magic angle spinning, CP-MAS)固态核磁共振方法已广泛用于量化原料药和固体剂量中的多晶型和形态转化百分比。¹³C-CP-MAS NMR 可以量化物理混合物中 API 多晶型、水合物、溶剂化物、盐和无定形形式的相对数量^[58-60]。Kumar 等^[61]采用固态核磁共振技术研究一组抗癌药物(5-氟尿嘧啶、阿霉素和柔红霉素)在 ZnO 纳米粒上的吸附行为,ssNMR 数据阐述了自由和氧化锌表面吸附药物样品的¹³C CP-MAS NMR 谱显示出明显的谱线展宽和化学位移变化,表明了可能的吸附模式。弛豫测量证实了 ZnO 表面 5-氟尿嘧啶的刚性结构和动力学特性的变化,它证明了固态核磁共振波谱在获取基于纳米颗粒的详细结构和动力学信息方面的有效性和针对性。

魔角旋转固态核磁共振波谱也可用于阐明脂膜中功能重要的蛋白质-配体相互作用。固态核磁共振方法^[62]包括多核检测以获得全面的结构信息,距离测量以定位配体结合位点以及动态核极化和¹H 检测以提高光谱灵敏度。固态核磁共振波谱技术最近用于表征酶与药物复合物的结构生物学研究,Vassa 等^[63]展示了一个 29 kDa 碳酸酐酶乙酰唑胺复合物,非氧化的 500 μm 样品通过固态核磁共振波谱技术,获得蛋白质结构、蛋白质动力学以及氨基酸侧链中的生化参数。因此,这些研究为蛋白质-配体相互作用、跨膜信号、底物转运、抗菌作用和许多其他生物过程的机制提供了新的见解和前期的研究基础。特别的是,高静态场强、基于同核双极解耦序列的实验以及基于动态核极化(DNP)的实验,在固体药物材料中得到了越来越多的应用。

5 结语与展望

近三十多年来,核磁共振技术的发展促使了药

物研究速度显著加快,它可获得无与伦比的结构信息,成为结构解析的“金标准”。虽然 HPLC-MS 可以在有利条件下检测给定分析物至飞摩尔级别,但即使是最现代的核磁共振设备也需要在合理时间内使用数纳摩尔的样品进行分析。实际上,所有现代高分辨率核磁共振光谱仪都是脉冲傅里叶变换仪器,可同时激发给定类型的所有原子核,并以自由感应衰变的形式收集原始数据,这使得将多个自由感应衰变瞬态相加以提高频谱信噪比成为可能,因此,低灵敏度一直是(并将继续是)核磁共振生物分析应用的致命弱点,而提高核磁共振灵敏度一直是过去四十年来大多数技术发展的焦点。目前,全球首个 1.2 GHz 最高磁场在瑞士联邦理工学院安装,预计未来将逐渐出现更多大于 1 GHz 的 NMR 谱仪,通过提高磁体的磁场强度将使药物大分子的结构研究有重大突破。随着核磁共振谱在生物大分子结构分析中的应用,核磁共振技术所提供的结构信息的数量和复杂性呈几何级数增加,将发展三维核磁共振技术。对三维空间的构象和大分子与小分子之间的相互作用等,二维核磁共振已显得无能为力,因此要发展分子建模技术,利用 NOE 所提供的分子中质子间的距离信息来计算三维空间结构。同时也将提高核磁共振信号的内在敏感性和 35 kDa 以上生物分子固有的广泛和重叠信号的分辨率,我们期望核磁共振能继续为药物领域的研究做出贡献。特别是固态核磁共振的发展,可提供独特和全面的视角,其固有的定量性质、区分单个化学品的高灵敏度、阐明局部结构和复杂相互作用的原子分辨率、探测非晶态材料的分子填料的能力以及在不同时间尺度上研究分子运动的能力,使核磁共振成为更加有力的分析工具。在未来,核磁共振可能与其他分析技术(如质谱和 X 射线晶体学)结合使用,便于更快地控制、更好的动态范围以及更大的灵活性和可扩展性,提供最领先的结构分析方法。

参考文献

- 1 Bloch F. Nuclear induction [J]. *Phys Rev*, 1946, 70: 460-474.
- 2 Bloch F, et al. Nuclear induction [J]. *Phys Rev*, 1946, 69: 127.
- 3 Purcell EM, et al. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid [J]. *Phys Rev*, 1946, 69: 37-338.
- 4 Wang Z, et al. Detection of metabolite-protein interactions in complex biological samples by high-resolution relaxometry: toward interactomics by NMR [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 9393-9404.
- 5 Sara V, et al. NMR analysis of carboxylate isotopomers of ¹³C-metabolites by chemoselective derivatization with ¹⁵N-nicholamine [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 6629-6637.
- 6 Porras G, et al. Ethnobotany and the role of plant natural products in antibiotic drug discovery [J]. *Chem Rev*, 2021, 121: 3495-3560.
- 7 Martin R, et al. Advances in instrumentation and methodology for solid-state NMR of biological assemblies [J]. *J Struct Biol*, 2019, 206: 73-89.
- 8 Daskalov A, et al. Structures of pathological and functional amyloids and prions, a solid-state NMR perspective [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 670513.
- 9 Rocha M, et al. Chemical properties determine solubility and stability in β -crystallins of the eye lens [J]. *ChemBioChem*, 2021, 22: 1329-1346.
- 10 Hughes A, et al. Recent advances in probing host-guest interactions with solid state nuclear magnetic resonance [J]. *CrytEngComm*, 2021, 23: 2491-2503.
- 11 Tao M, et al. Structure of membrane-bound huntingtin exon 1 reveals membrane interaction and aggregate on mechanisms [J]. *Structure*, 2019, 27: 1570-1580.
- 12 Leblanc R, et al. A drug discovery toolbox for Nuclear Magnetic Resonance (NMR) characterization of ligands and their targets [J]. *Drug Discov Today: Technol*, 2020, 37: 51-60.
- 13 Singh N, et al. Quantitative NMR (qNMR) spectroscopy based investigation of the absolute content, stability and isomerization of 25-hydroxyvitamin D₂/D₃ and 24(R), 25-dihydroxyvitamin D₂ in solution phase [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 3014.
- 14 Krake EF, et al. NMR and DFT analysis of the major diastereomeric degradation product of clopidogrel under oxidative stress conditions [J]. *J Mol Struct*, 2022, 1247: 131309.
- 15 Jin J, et al. Quantitative probing of hydrogen environments in quasicrystals by high-resolution NMR spectroscopy [J]. *Acta Mater*, 2022, 226: 117657.
- 16 Arnesano F. NMR spectroscopy to study the fate of metallo-drugs in cells [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 61: 214-226.
- 17 Monakhova Y, et al. Monitoring daily routine performance in quantitative NMR (qNMR) spectroscopy: is the system suitability test necessary [J]. *Magn Reson Chem*, 2019, 57: 110-117.
- 18 Sousa J, et al. Assignment of ¹H and ¹³C NMR data for three pairs of diastereomers of 4'-X benzo [1, 3] cyclopropa [1, 2-b] chromene-4, 5-diones (X = H, OCH₃, and Cl) [J]. *Magn Reson Chem*, 2019, 57: 512-521.

- 19 Hussaini S, et al. Application of NMR spectroscopy for the detection of equilibrating E-Z diastereomers [J]. ACS Omega, 2020, 5:24848-24853.
- 20 Senapatis S, et al. Synthesis of four diastereomers of notoryne and their ¹³C NMR chemical shifts analysis [J]. J Chem Sci, 2021, 133(3):76-89.
- 21 Aizawa S, et al. Enantiomeric NMR signal separation mechanism and prediction of separation behavior for a praseodymium(III) complex with (S,S)-ethylenediamine-N,N-disuccinate [J]. Magn Reson Chem, 2020, 58:941-948.
- 22 Oriol P, et al. Fluorination of arylboronic esters enabled by bismuth redox catalysis [J]. Science, 2020, 367:313-317.
- 23 Geeson M, et al. Phosphoric acid as a precursor to chemicals traditionally synthesized from white phosphorus [J]. Science, 2018, 359:1383-1385.
- 24 Binas O, et al. ¹⁹F-NMR-based fragment screening for 14 different biologically active RNAs and 10 DNA and protein counter-screens [J]. ChemBioChem, 2021, 22:423-433.
- 25 Zhou Y, et al. A redox-responsive selenium-containing pillar [5]arene-based macrocyclic amphiphile: synthesis, controllable self-assembly in water, and application in controlled release [J]. Chem Commun, 2017, 53:8364-8367.
- 26 Tan Z, et al. Polyamide membranes with nanoscale Turing structures for water purification [J]. Science, 2018, 360:518-521.
- 27 Larsson K, et al. Therapies for rare diseases: therapeutic modalities, progress and challenges ahead [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19:93-111.
- 28 Osborne J, et al. Fragments: where are we now? [J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48:271-280.
- 29 Marasco D, et al. Identification of inhibitors of biological interactions involving intrinsically disordered proteins [J]. Int J Mol, 2015, 16:7394-7412.
- 30 Falese JP, et al. Targeting RNA with small molecules: from fundamental principles towards the clinic [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50:2224-2243.
- 31 Lau J, et al. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions [J]. Bioorg Med Chem, 2018, 26:2700-2707.
- 32 Wang J, et al. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: a customizable toolbox for molecular manipulations [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24:3256-3270.
- 33 Nagana G, et al. Recent advances in NMR-based metabolomics [J]. Anal Chem, 2017, 89:490-510.
- 34 Chae YK, et al. A simple and sensitive detection of the binding ligands by using the receptor aggregation and NMR spectroscopy: a test case of the maltose binding protein [J]. J Biomol NMR, 2021, 75:371-381.
- 35 Yan W, et al. Investigating NMR-based absolute and relative permeability models of sandstone using digital rock techniques [J]. J Pet Sci Eng, 2021, 207:109105.
- 36 Lingel A, et al. Comprehensive and high-throughput exploration of chemical space using broadband ¹⁹F NMR-based screening [J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59:14809-14817.
- 37 Cdc A, et al. Investigation of protein-ligand complexes by ligand-based NMR methods [J]. Carbohydr Res, 2021, 503:108313.
- 38 Kusova AM, et al. NMR and dynamic light scattering give different diffusion information for short-living protein oligomers. Human serum albumin in water solutions of metal ions [J]. Eur Biophys J, 2022, 51:375-383.
- 39 Gebretsadik T, et al. LC-NMR for natural product analysis: a journey from an academic curiosity to a robust analytical tool [J]. Sci, 2021, 3:6.
- 40 Li HY, et al. Study on secondary metabolites of plant endophytic fungus *Fusarium guttiforme* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34:1143-1147.
- 41 Lever J, et al. Natural products of marine macroalgae from south eastern australia, with emphasis on the port phillip bay and heads regions of victoria [J]. Mar Drugs, 2020, 18:142.
- 42 Garavis M, et al. Discovery of selective ligands for telomeric RNA G-quadruplexes (TERRA) through ¹⁹F-NMR based fragment screening [J]. ACS Chem Biol, 2014, 9:1559-1566.
- 43 Ganser L, et al. Demonstration that small molecules can bind and stabilize low-abundance short-lived RNA excited conformational states [J]. J Mol Biol, 2020, 432:1297-1304.
- 44 Umuhire A, et al. Understanding the contributions of conformational changes, thermodynamics, and kinetics of RNA-small molecule interactions [J]. ACS Chem Biol, 2019, 14:824-838.
- 45 Chen J, et al. Design, optimization, and study of small molecules that target tau Pre-mRNA and affect splicing [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142:8706-8727.
- 46 Harner M, et al. NMR in drug design [J]. Biochem Biophys, 2017, 628:132-147.
- 47 Meyer B, et al. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors [J]. Angew Chem Int Ed, 2003, 42:864-890.
- 48 Berners S, et al. Insights into the mechanism of action of platinum anticancer drugs from multinuclear NMR spectroscopy [J]. Prog NMR Spectrosc, 2006, 49:65-98.
- 49 Warner K, et al. Principles for targeting RNA with drug-like small molecules [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17:547-

- 558.
- 50 Castro A, et al. Four-component relativistic ^{31}P NMR calculations for *trans*-platinum (II) complexes; importance of the solvent and dynamics in spectral simulations [J]. Dalton Trans, 2019, 48 :8076-8083.
- 51 Dadiani M, et al. The application of NMR in tumor angiogenesis research [J]. Prog NMR Spectr, 2006, 49 :27-44.
- 52 Usman A, et al. Tuning the thermoresponsive properties of PEG-based fluorinated polymers and stimuli responsive drug release for switchable ^{19}F magnetic resonance imaging [J]. Polym Chem, 2021, 12 :5438-5448.
- 53 Kamm Y, et al. ^{19}F -magnetic resonance spectroscopy in patients with liver metastases of colorectal cancer treated with 5-fluorouracil [J]. Anticancer Drugs, 2004, 15 :229-233.
- 54 Auer TA. Advanced MR techniques in glioblastoma imaging-upcoming challenges and how to face them [J]. Eur Radiol, 2021, 31 :6652-6654.
- 55 Penet M, et al. MRI and MRS of intact perfused cancer cell metabolism, invasion, and stromal cell interactions [J]. NMR Biomed, 2019, 32 :4053.
- 56 Kang S, et al. ^1H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure [J]. Clin Biochem, 2011, 44 :293-299.
- 57 Emwas A, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies; a review [J]. Metabolomics, 2015, 11 :872-894.
- 58 Li MY, et al. Solid-state NMR spectroscopy in pharmaceutical sciences [J]. Trends Analyt Chem, 2021, 135 :116152.
- 59 Li MY, et al. Quantifying pharmaceutical formulations from proton detected solid-state NMR under ultrafast magic angle spinning [J]. J Pharm Sci, 2020, 109 :3045-3053.
- 60 Psaa B, et al. Pharmaceutical Analysis by NMR can accommodate strict impurity thresholds; the case of choline [J]. J Pharmaceut Biomed, 2022, 214 :114709.
- 61 Kumar D, et al. Investigation of adsorption behavior of anticancer drug on zinc oxide nanoparticles; a solid state NMR and cyclic voltammetry (CV) analysis [J]. J Pharm Sci, 2021, 110 :3726-3734.
- 62 Elkins M, et al. Elucidating ligand-bound structures of membrane proteins using solid-state NMR spectroscopy [J]. Curr Opin Struct Biol, 2019, 57 :103-109.
- 63 Vasa S, et al. Assessment of a large enzyme-drug complex by proton-detected solid-state nmr spectroscopy without deuteration [J]. Angew Chem Int Ed, 2019, 58 :5758-5762.
-
- (上接第 1918 页)
- 16 Xie C, Wang J, Zhao N, et al. Effects of electroacupuncture on sleep via the dopamine system of the HPA axis in rats after cage change [J]. Evid-Based Compl Alt, 2021, 7 :1-25.
- 17 Meneses A, Manuel AL, Rocha L, et al. Expression of the 5-HT receptors in rat brain during memory consolidation [J]. Behav Brain Res, 2004, 152 :425-436.
- 18 Xu Q, Qu WM, Huang ZL. Progress in sleep-wake regulation of dopamine D2 receptor [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2010, 15 :361-366.
- 19 Zielinski MR, Kim Y, Karpova SA, et al. Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression [J]. Neurosci Lett, 2014, 580 :27-31.
- 20 Aldabal L, Bahammam AS. Metabolic, endocrine, and immune consequences of sleep deprivation [J]. Open Respir Med J, 2011, 5 :31-43.
- 21 Porkka HT, Zitting KM, Wigren HK. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances [J]. Acta physiol, 2013, 208 :311-328.
- 22 Sun Y, Zhang N, Qu Y, et al. Shuangxia decoction alleviates *p*-chlorophenylalanine induced insomnia through the modification of serotonergic and immune system [J]. Metab Brain Dis, 2020, 35 :315-332.