

실험동물 뇨시료의 대사체학적 분석을 위한 핵자기공명스펙트럼 패턴인식

주현진 · 조정환[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 5, 2005; Revised February 18, 2005)

Pattern Recognition Using NMR Spectral Data for Metabonomic Analysis of Urine Samples from Experimental Animals

Hyun Jin Joo and JungHwan Cho[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Chyungpadong-2-Ga, Yongsan-Gu, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Metabonomic analysis has been recognized as a powerful approach for characterizing metabolic changes in biofluids due to toxicity, disease process or environmental influences. To investigate the possibility of relating metabolic changes with ¹H-NMR spectra, urine samples from Sprague-Dawley rats treated with various dietary restrictions or toxic substances (nicotine) were analysed using ¹H-NMR spectroscopy and pattern recognition techniques. Dietary restrictions-given to male rats were normal diet and high fat diet and fasting. The nicotine urine samples were collected from SD rats administered with nicotine (25 mg/kg) at the various time intervals. ¹H-NMR spectra of all urine samples were acquired at 400 MHz on a VARIAN spectrometer. To establish the presence of any intrinsic class-related patterns or clusters in each NMR data, methods of PCA (principal component analysis) and soft independent class modeling of class analogy (SIMCA) analysis were used, and the results from these analyses were compared to each other. In all cases of dietary conditions and nicotine treatment, SIMCA analysis gave better results for the discrimination of NMR spectra of urine samples than PCA.

Keywords □ metabonomics, PCA, SIMCA

생리적 자극 또는 유전적 변형 등에 의한 생체대사의 역동적인 변화를 연구하는 방법론인 대사체학(metabonomics)이 독성학, 식품영양학 및 환경화학에 이르기까지 여러 분야에서 응용되고 있다.¹⁻³⁾ 대사체학에서 주로 사용되는 시료는 세포를 비롯한 살아있는 유기체가 분비하는 생체액(body fluid)이며 이는 곧 세포기능의 결과인 대사물을 포함하고 있다. 복잡한 대사과정을 조사하기 위해서는 선택적이면서도 동시에 많은 정보를 담아낼 수 있는 기기분석기법이 요구되는데 핵자기공명분광기(NMR)과 질량분석기(Mass)를 비롯하여 기체크로마토그래피/질량분석기(GC/MS), 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 등이 사용되고 있다. 특히 NMR은 시료에 대해 비침습적인 방법으로서 복잡한 전처리 과정 없이도 대상이 되는 생체액에 포함된 넓은 범위의 화합물을 동시에 측정할 수 있는 잇점을 가지고 있어 대사체학 분야에 많은 이용이 되고 있다. 하지만 생화학적 정보의 극대화를

위해 최소 400 MHz 이상의 고성능 NMR이 요구된다. 시료에 대한 전처리과정으로는 단지 생체시료에 5~10% 정도의 D₂O만을 첨가하면 된다. 대신 생체시료에 상대적으로 많이 존재하는 물의 영향을 배제하기 위한 펄스법이 기본적으로 필요하다.

주로 이용되는 생체액에는 뇨, 혈청, 혈장, 전혈, 뇌척수액 등이 있으며 이들 각각의 성분은 질병과 독성물질 및 환경변화에 의해 야기되는 장기이상(organ dysfunction)의 생화학적 정보를 담고 있다. 하지만 생체시료는 개체차와 성별, 식이 및 호르몬 변화에 따른 내재된 변동요인을 가지고 있으므로 잘 제어된 조건에서 수집을 하는 것이 요구된다. 그리하여 신뢰성 있는 대사체학 데이터의 수집을 위해 호르몬, 인종, 식이 등의 변동요인과 대사체학 자료의 상관성을 평가하는 실험이 수행되어 왔다.^{4,5)} 특히 독성물질 등을 투여했을 때는 급격한 식욕의 감퇴 등이 일어나서 정상조건과는 다른 식욕의 변화가 일어나므로 식이 조건의 변화에 따른 대사체 변동의 기본적인 정보가 확보되어야 한다. 현실적으로 인체를 대상으로 한 실험모델의 경우 제어하기 힘든 조건 때문에 주로 동물실험모델이 사용되는 데도 불구하고 동물 모델에서의 식이 조건과 기본 대사물의 변동을 다룬 연구결과는

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9580 (팩스) 02-3211-9580
(E-mail) jcho@sookmyung.ac.kr

발표되지 않았다. 한편, NMR 분광법에 기반을 둔 대사체학은 또한 패턴인식과 같은 통계적 다변량 자료처리법과 더불어 더욱 유용성이 증가되어 패턴인식은 시료의 분류와 새로운 생체 표지자(biomarker)의 발굴 등을 용이하게 할 것으로 보인다.⁶⁻⁸⁾

따라서 본 연구에서는 대사체학에서 주로 사용되는 흰쥐 모델에 있어 식이조건에 따른 뇨시료의 ¹H NMR 스펙트럼을 물의 신호를 배제하는 펄스기법으로 획득한 후 식이조건에 따른 대사물의 변화 및 독성물 투여시의 대사물 변화를 추적해보고 그 변화 여부를 객관적으로 평가할 수 있는 가능성을 확인하고자 뇨시료의 NMR 스펙트럼 자료에 대한 주성분분석 및 SIMCA 분석 같은 패턴인식을 실시하였고 이를 통하여 신뢰성 있는 패턴인식방법을 확보하고자 하였다.

실험 방법

동물실험

식이 변이 - Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(7주령, 260±2 g, 샘타코)를 대상으로 흰쥐사료(샘타코)와 상수를 임의로 섭취할 수 있도록 공급하면서 일주일 동안 동물실험실 환경(온도 21~24°C, 습도 40~60%)에서 순응시킨 후 각각을 대사 케이지에 수용하고 정상 흰쥐사료(순응시와 동일한 것)와 상수를 임의로 섭취케 하여 4일 동안 매일 1회씩 각각의 개체로부터 정상식이 뇨를 채취하였다. 정상식이 뇨 채취 후 새로운 5일 동안에는 사료 없이 상수만 제공하여 매일 3회씩 절식 뇨를 채취하였는데 절식 개시일의 뇨는 실험에 사용하지 않았다. 절식 뇨 채취 후 새로운 4일 동안에는 고지방 사료(분쇄한 정상사료와 라드를 1:1로 혼합)와 상수를 임의로 섭취케 하여 매일 3회씩 각각의 개체로부터 고지방 식이뇨를 채취하였다.

니코틴 투여- Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐(7주령, 260±2 g, 샘타코)를 대상으로 사료와 상수를 임의로 섭취하게 하고 일주일 동안 동물실험실 환경(온도 21~24°C, 습도 40~60%)에서 순응시킨 후 실험에 사용하였다. 니코틴(Aldrich)을 증류수에 녹여 흰쥐에 단회 강제 경구투여(25 mg/kg 체중)하였다. 경구투여 후 한 개체씩 대사 케이지에 수용하고 사료와 상수를 공급한 상태에서 다음의 시간 간격별로 뇨를 채취하였다: 0~8, 8~24, 24~32, 32~48, 48~72, 72~96시간. 대조군으로 사용한 정상 뇨시료는 동일 개체로부터 경구투여를 실시하기 전에 대사 케이지에 한 마리씩 수용하여 사료와 상수를 자유롭게 공급받게 한 상태에서 수집하였다.

뇨시료의 전처리 및 NMR 분석

모든 채취한 뇨시료는 사료 부스러기 및 털 등의 오염물을 제거하기 위해 원심 분리(3000 rpm, 15 min)한 뒤 상정액에서 500 µl를 취하여 100 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.4) 200 µl와

1 mM sodium 3-trimethylsilyl[2,2,3,3,-²H₄] propionate(TSP)의 D₂O 용액 50 µl를 첨가하고 잘 혼합한 뒤 그 중 700 µl를 분취하여 NMR 튜브(5 mm, i.d.)에 넣어 Varian 400 MHz NMR 분광기를 사용하여 ¹H NMR spectrum을 측정하였다. 이때 물의 공명을 억제하기 위해 PRESAT 펄스기법(Varian)을 사용하였다.

자료처리

각 뇨시료의 스펙트럼은 MestRe-C(MESTREC, Spain)를 사용하여 위상 및 바탕선을 조정하였고 아스키 파일로 변환 후 자체 제작한 MATLAB M-프로그램을 이용하여 -0.5 ppm에서 10.1 ppm 영역 내에서 기준물질인 TSP의 신호(δ 0.0)에 대해 정렬하고 0.001 ppm의 동일 간격으로 내삽한 후 남아 있는 물과 요소의 공명피크영역을 피하기 위해 다시 4.4에서 6.0 ppm 영역은 제외한 0.5 ppm에서 10.1 ppm 영역만을 자료처리에 사용하였다. 각 자료내 군집형성 유무의 판단을 위한 주성분분석 및 SIMCA 분석은 자체 제작한 MATLAB M-프로그램을 이용하여 수행하였다. 패턴인식에 앞서 실시한 자료 전처리법은 mean-centering과 autoscaling이며 자체 제작한 MATLAB M-프로그램으로 수행하였다. mean-centering은 자료 행렬의 각 열(변수)의 평균을 각 열의 값에서 빼주는 것이며 autoscaling은 mean-centering후에 각 열의 표준편차로 나누는 것이다.

주성분분석(Principal component analysis) - 주성분분석은 다변량 분석의 한 방법으로서 원래 자료의 변수들이 가진 정보를 최대한 확보하는 적은 수의 새로운 변수를 생성하는 것이다.⁹⁾ 이 새로운 변수를 주성분(Principal component, PC)이라 하며 원래 자료가 지닌 변이를 최대한 설명할 수 있는 주성분들을 선택하게 된다. 각 주성분 벡터들은 상호직교하고 단위길이를 가지며 자료의 가장 많은 변이를 설명하는 것부터 차례대로 배열된다. 자료는 주성분을 좌표축으로 하는 좌표계로 표현되고 이때 자료의 새로운 좌표축에서의 좌표값을 스코어(score)라 한다.

SIMCA(Soft Independent Modeling of Class Analogies) - SIMCA는 주성분분석을 기반으로 하는 패턴인식의 한 방법으로서 각 군집별로 별도의 개별적 주성분모형을 만들고 개별 관측치를 군집별 주성분모형으로부터의 거리를 Hotelling의 T²와 Q를 기준으로 계산함으로써 군 소속성을 판별한다.¹⁰⁾ 이때, 각 군집별 최적의 주성분모형을 선정하기 위하여 Malinowski의 인자지시함수(Factor Indicator Function, IND)¹¹⁾로 최적의 주성분 벡터의 개수를 결정하였다.

결과 및 고찰

식이에 따른 흰쥐 뇨시료의 패턴인식분석

식이에 따른 뇨시료의 400 MHz ¹H NMR 스펙트럼 - 식이 조건을 달리하여 흰쥐로부터 얻은 뇨시료의 ¹H NMR 스펙트럼

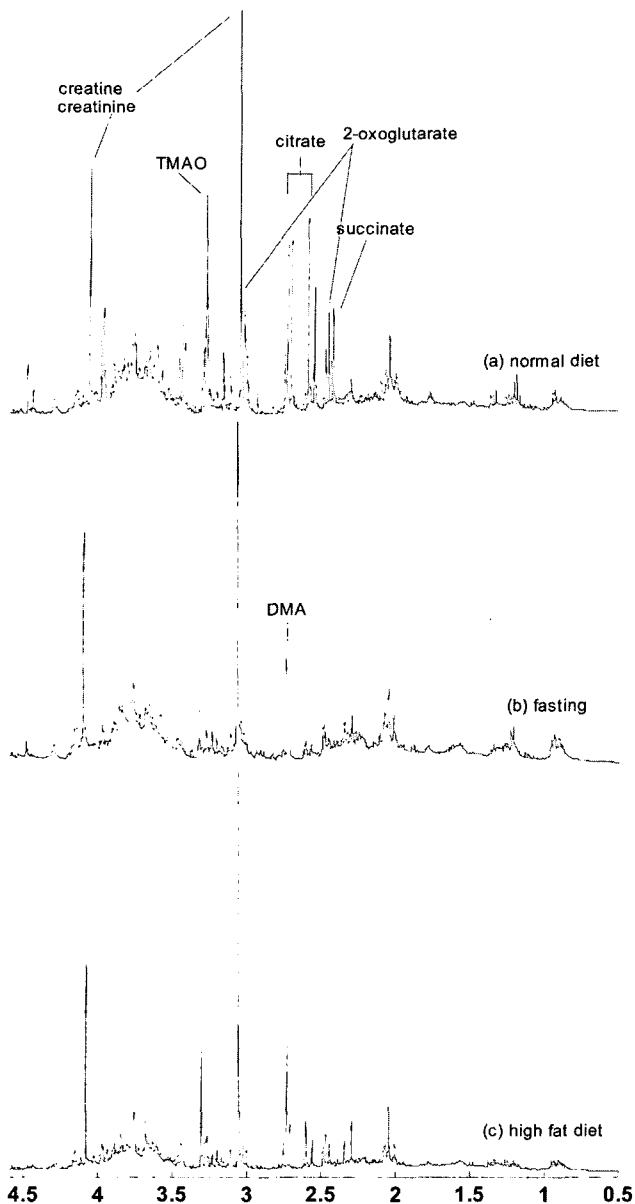


Fig. 1 – 400 MHz ^1H NMR spectra of urine (δ 0.0~4.8) obtained from rats treated with different diets. (a) normal diet (b) fasting (c) high fat diet.

을 시각적으로 비교하였다(Fig. 1). 절식 후에는 ^1H NMR 스펙트럼에서의 대사물 프로파일에 큰 변화를 보였는데 정상식이뇨에서와 달리 절식뇨에서는 citrate, TMAO(trimethylamine-*N*-oxide), 2-oxoglutarate, succinate의 공명이 크게 감소됨을 알 수 있다. 고지방 식이뇨에서는 정상식이뇨에서 보였던 대부분의 공명 피크를 관찰할 수 있었지만 특징적으로 2-oxoglutarate의 공명이 상대적으로 감소되었다.

뇨시료의 ^1H NMR 스펙트럼에 대한 주성분분석 – 식이 조건에 따른 패턴이나 군집 형성 유무를 확인하기 위해 전체 뇨시료에 대해 주성분분석을 실시하였고, 3개의 식이군으로부터 얻은

Table I – Sample set (Training/Validation) preparation for SIMCA modeling

Sample combination	Group name	Number of samples	
		Training	Validation
Normal diet and fasting	Normal diet	6	6
	Fasting	6	5
Fasting and high fat diet	Fasting	6	5
	High fat diet	6	6
Normal diet and high fat diet	Normal diet	6	6
	High fat diet	6	6

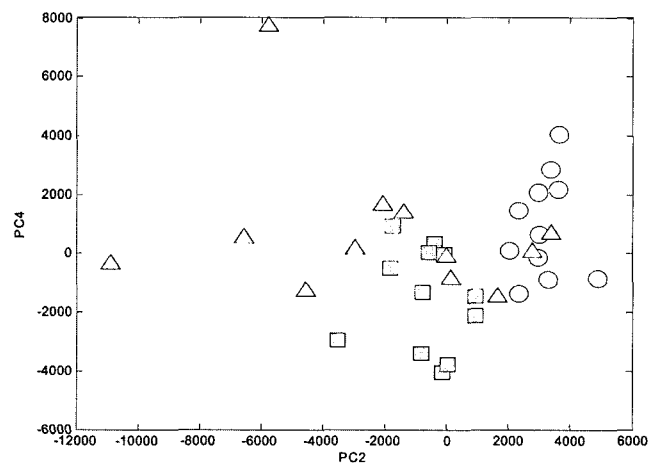


Fig. 2 – Plot of PC2 vs PC4 scores based on mean-centered data from ^1H NMR spectra of whole urine samples obtained from rats treated with different diets. PC2 and PC4 stand for the scores of the 2nd and 4th principal components, respectively. Key : (■) normal diet; (●) fasting; (▲) high fat diet.

뇨시료 자료를 2종류의 식이군끼리 조합하여 총 3개의 조합된 뇨시료 자료를 생성하고(Table I) 각 자료에 대한 주성분분석을 실시하였다. 주성분분석에 앞서 자료의 전처리로서 자료에 autoscaling 및 mean-centering을 실시하였다. 주성분분석에서는 식이에 따른 군집형성을 확인하기 위해 주성분분석에서 획득된 여러 주성분을 조합하여 2차원 주성분 score plot을 형성하는 것으로서 식이에 따른 군집형성을 가장 잘 나타내는 2차원의 주성분 조합을 찾아보았다. mean-centering 한 전체 뇨시료 자료에 주성분분석을 실시한 결과, 식이변화에 따른 3가지 군을 명확하게 구별하는 주성분조합을 찾을 수는 없었으나 최대한 각각의 군집형성을 보이는 주성분조합은 PC2와 PC4였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보면 PC2에 의해 정상식이뇨와 절식뇨는 잘 분리되지만 고지방 식이뇨는 특히 정상식이뇨와 다소 겹쳐있는 것을 볼 수 있다. 이는 Fig. 1에서 대사물 프로파일을 시각적으로 비교한 바와 같이 고지방 식이뇨와 정상식이뇨에서의 대사물의 큰 변화가 없는 것과 일치하는 결과이다. 이어서 조합된 뇨시료 자료에 대한 주성분분석을 시행하여 보았다. 주성분분석 결과를

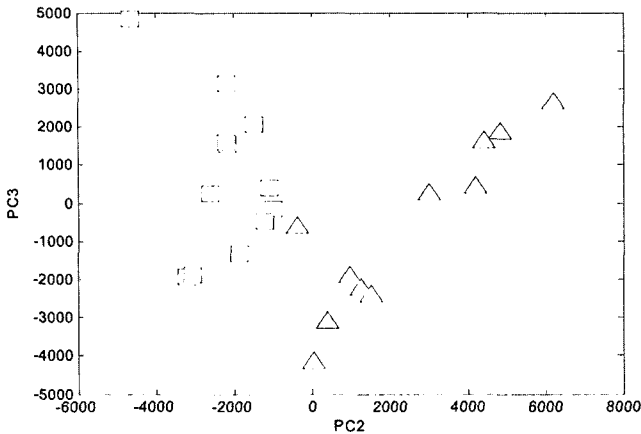


Fig. 3 - Plot of PC2 vs PC3 scores based on mean-centered data from ¹H NMR spectra of combined urine samples (normal fasting) obtained from rats treated with different diets. Key : (■) normal diet; (●) fasting.

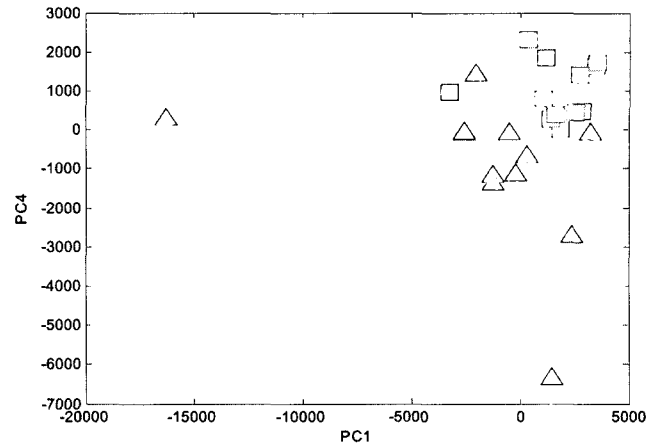


Fig. 5 - Plot of PC1 vs PC4 scores based on mean-centered data from ¹H NMR spectra of combined urine samples (normal high fat diet) obtained from rats treated with different diets. Key : (■) normal diet; (▲) High fat diet.

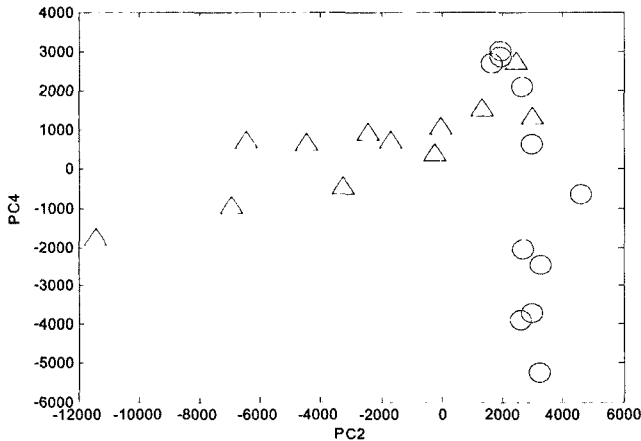


Fig. 4 - Plot of PC2 vs PC4 scores based on mean-centered data from ¹H NMR spectra of combined urine samples (fasting high fat diet) obtained from rats treated with different diets. Key : (●) fasting; (▲) high fat diet.

전처리 과정에 따라 비교한 결과 mean-centering 한 자료가 autoscaling 한 자료보다 좀더 명확한 군집형성을 보여주었다. 따라서 mean-centering 한 자료에 있어서의 주성분분석 결과만을 살펴보면 정상식이 뇨와 절식 뇨에 주성분분석을 실시했을 때 PC2와 PC3의 score plot이 두 군을 가장 잘 구별해서 보여주었고(Fig. 3) 절식 뇨와 고지방식이 뇨에 주성분분석을 실시한 최적의 결과는 PC2와 PC4의 score plot이고(Fig. 4) 정상식이 뇨와 고지방식이 뇨에 대한 결과는 PC1와 PC4의 score plot이었다(Fig. 5). 전체 뇨시료를 대상으로 한 주성분분석 결과와 비슷하게 정상식이 뇨와 절식 뇨간에는 명확한 구분이 있었고 고지방식이 뇨를 포함한 조합 뇨시료 자료에서는 명확한 구분이 되지 않았다. 이는 마찬가지로 Fig. 1에서 관찰한 결과와 일치한다. 주성분분석의 결과 식이에 따른 변화가 뇨시료에 들어있는 대사

물의 변화로 나타나고 특별한 화학적 전처리가 없이 뇨시료의 ¹H NMR spectrum에 대한 주성분분석을 시행하여 그 변화 여부를 감지할 수 있는 것으로 나타났다.

뇨시료에 대한 SIMCA 분석 - 주성분분석에 이어 조합된 뇨시료 자료에 대해서 SIMCA 분석을 실시하였다. 각 식이별 뇨시료 자료에서 일부를 취하여 표준군(training set)을 구성하고 표준군에 대한 SIMCA 모델을 형성하였다. 그리고 표준군에 포함되지 않았던 남은 자료를 가지고 검증군(validation set)를 구성하여 형성된 SIMCA 모델을 검증하는데 사용하였다(Table I). 그리고 SIMCA법을 적용하기에 앞서서 자료에 대한 전처리로서 autoscaling 또는 mean-centering을 실시하여 각각의 경우에 대해 SIMCA 분석을 수행하였다. 전처리법에 따른 SIMCA 분석의 결과는 다음과 같다. 정상식이 뇨와 절식 뇨에 경우 autoscaling 과 mean-centering 의 두가지 전처리법에 있어서 모두 높은 정확도를 보여주었으나 절식 뇨와 고지방식이 뇨에서는 mean-centering 한 경우가 더 높은 정확도를 보여주었고 마찬가지로 정상 뇨와 고지방식이 뇨에서도 mean-centering 처리를 한 자료가 더 높은 정확도를 보여주었다(Table II). 따라서 주성분분석에서와 마찬가지로 SIMCA 분석에서도 mean-centering이 식이에 따른 뇨시료 NMR spectrum의 패턴인식 분석에 더 나은 전처리 자료처리법임을 알 수 있었다. 따라서 mean-centering 처리한 SIMCA 분석의 결과만을 검토하면 각 군별로 전반적으로 높은 정확도를 보여주므로 식이에 따른 뇨시료의 구분에 SIMCA 분석이 유용함을 알 수 있었다. 또한 식이에 따른 주성분분석의 결과와 비교했을 때에도(Fig. 2~5) SIMCA 분석이 더 나은 군집형성능력을 보여주었다(Table II). 즉, 이는 SIMCA 분석이 주성분분석보다 각 뇨시료 군간의 대사물 프로파일의 미세한 변동을 더 잘 반영하는 것으로 인식된다. 또한 SIMCA 분석은 정확도를

Table II – Pattern recognition results of validation set by SIMCA

Sample combination	Group name	Hit ratio (%)	
		Autoscaling	Mean-centering
Normal diet and Fasting	Normal diet	100	100
	Fasting	100	100
Fasting and high fat diet	Fasting	0	100
	High fat diet	100	67
Normal diet and high fat diet	Normal diet	0	100
	High fat diet	100	83

이용하여 각 군의 판별정도를 확인하므로 결과의 비교면에서도 시각적 판단에 의존하는 주성분분석보다 더 용이한 잇점이 있다.

니코틴을 경구 투여한 흰쥐 뇨시료의 패턴인식분석

뇨시료의 400 MHz ¹H NMR 스펙트럼 – 니코틴을 경구 투여한 흰쥐와 대조군인 정상 흰쥐로부터 얻은 뇨시료의 ¹H NMR 스펙트럼을 시각적으로 비교하였을 때 니코틴 뇨시료에서는 정상 뇨시료보다 citrate의 피크의 감소가 두드러졌다(Fig. 6)

뇨시료에 대한 주성분분석 – 니코틴을 경구 투여한 흰쥐의 뇨시료와 정상 뇨시료에 대해 주성분분석을 실시하였다. 주성분분

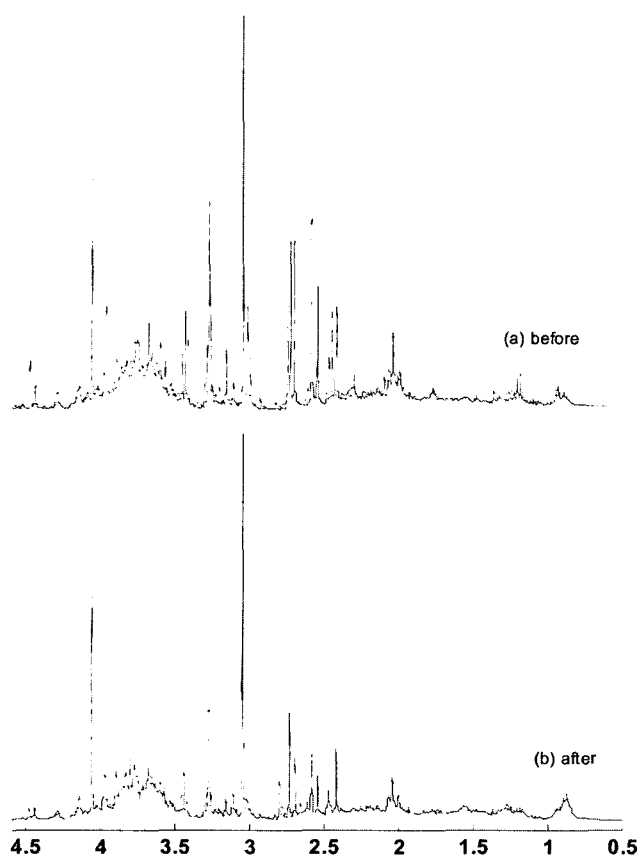


Fig. 6 – 400 MHz ¹H NMR spectra (δ 0.0~4.8) obtained from SD rats (a) before (b) after nicotine oral administration.

석 전에 자료의 전처리로서 autoscaling 또는 mean-centering을 실시하여 각각의 경우에 대하여 주성분분석을 실시하고 결과를 비교하였다. 니코틴 투여와 정상간의 군집형성 유무를 확인하기 위해 얻어진 주성분을 조합하여 2차원 주성분 score plot을 형성하여 보았는데 명확하게 니코틴과 정상시료를 구분하는 주성분 score plot은 어느 전처리 경우에도 얻지 못하였다.

뇨시료에 대한 SIMCA 분석 – 니코틴 시료와 정상 뇨시료에서 각각 일부를 취하여 SIMCA 분석을 위한 표준군을 구성하였고 나머지 자료를 가지고 SIMCA 모델의 평가를 위한 검정군을 구성하였다. 이때 표준군과 검정군에 포함되는 자료를 다르게 선택함으로써 각각 두가지 경우의 자료 세트(Set A, Set B)를 구성하였다(Table III). 이어서 주성분분석에서와 마찬가지로 모든 자료 세트에 대해 전처리로서 autoscaling 또는 mean-centering을 실시하고 각각의 경우에 대한 SIMCA 모델을 형성한 후 평가하여 결과를 비교하여 보았다(Table IV). 평가결과는 군소속성의 판단 여부를 백분율로 나타내어 수행하였다. 결과를 비교하면 자료 Set A를 autoscaling 하여 SIMCA 분석한 결과는 정상군의 정확도는 100%이고 니코틴의 경우는 80%였다. 자료 Set A에 대해 mean-centering 한 경우 정상군의 정확도는 73%이며 니코틴의 경우는 100%였다. 자료 Set B를 autoscaling한 후 SIMCA 분석시 정상군의 정확도는 100%이고 니코틴은 80%로서 이는 Set A의 경우와 일치하였다. 또한 Set B에 mean-centering한 경우 정상군은 100%인 반면 니코틴은 30%였다. 따라서 니코틴 투여 뇨시료와 정상 뇨시료에서의 SIMCA 분석을 위한 자료 전처리법을 비교했을 때 mean-centering보다 autoscaling을 했을 때 더 높은 정확도를 보여주었으며 자료세트의 종류에도 상관없이 autoscaling은 일치하는 정확도를 보여주었다. 이는 앞서 시행한 식이별 뇨시료에 대한 SIMCA 분석에서 최적의 자

Table III – Sample set (Training/Validation) preparation for SIMCA modeling

Data set	Group name	Number of samples	
		Training	Validation
Set A	control	11	11
	nicotine	10	10
Set B	control	11	11
	nicotine	10	10

Table IV – Pattern recognition results of validation set by SIMCA

Data set	Group name	Hit ratio (%)	
		Autoscaling	Mean-centering
Set A	control	100	73
	nicotine	80	100
Set B	control	100	100
	nicotine	80	30

료 전처리법이 mean-centering이었던 것과는 반대되는 결과이다. 즉, 사용되는 자료의 성격에 따라 적절한 자료 전처리법을 선택해야 함을 알 수 있었다. 또한 니코틴 투여 뇨시료와 정상 뇨시료에 시행한 주성분분석에서는 명확한 군집형성을 하는 주성분 score plot을 찾을 수 없었지만 SIMCA 분석에서는 각 군집별 정확도가 평균 90%에 이르는 것으로 보아 식이별 뇨시료 비교 실험에서처럼 주성분분석보다 SIMCA 분석이 더 유용한 패턴인식 방법으로 판단된다. 이는 주성분분석에 따른 Score plot이 2~3개로 제한된 후의 주성분을 대상으로 하는 비교인데 반해 SIMCA는 각 군집별로 최적의 모든 주성분의 수를 결정하여 패턴인식을 실시하게 된다는 점에서 유래한다고 볼 수 있다.

결 론

식이 조건 변화 및 니코틴 투여를 한 흰쥐 뇨의 ¹H NMR 스펙트럼 자료에 각각 다른 자료전처리를 실시한 후 주성분분석과 SIMCA 분석의 패턴인식을 수행하여 그 결과를 비교하였다. 식이조건 변화에 따른 스펙트럼에 대한 자료전처리에서는 mean-centering으로 처리했을 때가 autoscaling 보다 주성분분석이나 SIMCA 분석에 있어 더 나은 패턴인식결과를 보여주었다. 또한 주성분분석과 SIMCA 분석을 비교시 SIMCA 분석이 명확한 패턴인식능력을 보여주었다. 니코틴 투여에 따른 스펙트럼 자료에서는 autoscaling이 mean-centering 보다 패턴인식의 정확도를 높이는 데 더 적절한 자료전처리법이었으며 마찬가지로 SIMCA 분석이 주성분분석보다 나은 패턴인식결과를 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 숙명여자대학교 2004학년도 교내특별연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝혀둡니다.

참고문헌

1) Griffin, J. L. and Bollard, M. E. : Metabonomics: Its potential as

a tool in toxicology for safety assessment and data integration. *Current Drug Metabolism* 5(5), 389 (2004).

2) Vaidyanathan, S. and Goodacre, R. : Proteome and metabolome analyses for food authentication. *Food Authenticity and Traceability* 71 (2003).

3) Griffin, J. L., Walker, L. A., Shore, R. F. and Nicholson, J. K. : Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat. *Chemical Research in Toxicology* 14(10), 1428 (2001).

4) Lenz, E. M., Bright, J., Wilson, I. D., Hughes, A., Morrisson, J., Lindberg, H. and Lockton, A. : Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36(4), 841 (2004).

5) Nicholls, A. W., Mortishire-Smith, R. J. and Nicholson, J. K. : NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chemical Research in Toxicology* 16(11), 1395 (2003).

6) Griffin, J. L. : Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Current Opinion in Chemical Biology* 7(5), 648 (2003).

7) Dumas, M.-E., Canlet, C., Andre, F., Vercauteren, J. and Paris, A. : Metabonomic assessment of physiological disruptions using ¹H-¹³C HMBC-NMR spectroscopy combined with pattern recognition procedures performed on filtered variables. *Analytical Chemistry* 74(10), 2261 (2002).

8) Robertson, D. G., Reily, M. D., Sigler, R. E., Wells, D. F., Paterson, D. A. and Braden, T. K. : Metabonomics: Evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid *in vivo* screening of liver and kidney toxicants. *Toxicological Sciences* 57(2), 326 (2000).

9) Massart, D. L. and Vandeginste, B. G. M. : Chemometrics: a textbook, Elsevier Science Publishers B.V., 242 (1988).

10) Sharaf, M. A. and Illman, D. L. : "Chemometrics", John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 339-355 (1991).

11) Malinowski, E. R. : Factor analysis in chemistry, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York (1991) page 109, page 60 and page 70 were referenced in this sequence.