Journal of the Korean Magnetic Resonance Society **2018**, *22*, 10-17
DOI 10.6564/JKMRS.2018.22.1.010

Practical Guide to NMR-based Metabolomics – II : Metabolite Identification & Quantification

Young-Sang Jung

Chong Kun Dang Research Institute, Chong Kun Dang Pharmaceutical Corp., 315-20, Dongbaekjukjeon-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Received Jan 26, 2018; Revised Feb 21, 2018; Accepted Feb 28, 2018

Abstract Metabolite identification and quantification are one of the foremost important issues in metabolomics. In NMR based metabolomics, mainly one-dimensional proton NMR spectra of biofluids, such as urine and serum are measured. However, it is not always easy to identify and quantify metabolites in one-dimensional proton NMR spectra. This article introduces useful public metabolite databases, metabolic profiling software, and articles.

Keywords NMR, identification, quantification, metabolite, metabolic profiling, metabolomics

서문

생체 내에서는 화학 반응이 계속 일어나고 있다. 신체 유지, 성장, 생식, 에너지 생성, 면역 작용 등을 위해서 생체 분자들이 잘게 끊어지는 이화작용(catabolism) 또는 잘게 끊어져 있던 분자들이 연결되거나 새로운 분자들이 합성되는 동화작용(anabolism)이 끊임없이 일어나고 있다. 이런 생체에서 일어나는 모든 화학 반응을 대사(metabolism)라고 한다. 그리고 이 대사에 참여하는 반응물과 생성물 중에 측정 가능한 약 1.5 kDa 이하의 작은 분자를 대사물질(metabolite)이라고 하고, 이 대사물질의 집합을 대사체(metabolome)라고 한다. 대사체는 적정 수준(level) 안에서 동적 평형을 유지하고 있는데, 만약 생체에 이상이 생기거나 외부 환경으로부터 자극을 받게 되면, 이 동적 평형에 변화가 생기게 된다. 대사체학은 비정상적으로 증가하거나 감소한 대사물질을 찾고, 이를 근거로 주목할 대사경로를 제안하고, 그 대사 변화의 기작을 유추하고 해석하는 학문이다.

위 과정에서 대사물질 동정(identification)과 적량(quantification)은 대사체학 연구를 위한 시작 점이며 필수 요소이다. 그리고, 적량은 절대적량과 상대적량으로 나누어 생각해 볼 수 있는데, 절대적량은 시료 안에 물질의 실제 농도를 측정하는 반면, 상대농도는 실제 농도를 측정하기보다는 농도를 반영하는 peak 의 크기 또는 면적을 기준 물질 대비 측정하는 것으로 단위는 없다.

대사물질 동정 및 적량을 위해서는 주로 질량분석기와 핵자기공명분광기를 사용한다. 먼저 가장 많이 사용되는 질량분석기의 경우, 최대 장점은 저농도로 존재하는 대사물질의 측정이 가능한 것이고, 단점은 재현성이 다소 낮고, 적량이 번거롭다는 점이다. 질량분석기 다음으로 많이 사용되는 핵자기공명분광기는 재현성이 매우 높고, 적량도 매우 쉽다. 반면, 측정 감도가 낮아 혈액 또는 소변의 경우 분석 가능한 대사물질의 수가 통상 80 개 미만으로 제한적이다.

NMR 기반 동정 및 적량 가능한 대사물질

대사체학 연구에는 다양한 시료들이 사용되는데, 대표적인 시료는 혈액, 소변, 침, 척수액, 대

* Correspondence to: **Young-Sang Jung**, Chong Kun Dang Research Institute, 315-20, Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea, Tel: 82-31-340-1244; E-mail: jys70@ckdpharm.com

변이다. Human Metabolome Database (HMDB)는 대사물질 동정 및 적량에 많이 참고하는 자료인데, 이곳의 자료를 살펴보면, 2018 년 2 월 기준 적량된 대사물질이 3,333 개가 있다.[1-5] 그중에 정량된 대사물질을 가장 많이 가지고 있는 시료는 혈액인데 대사물질이 3,007 개가 있고, 그 다음으로 소변이 1,589 개, 침이 871 개, 대변이 580 개, 척수액이 443 개의 적량된 대사물질을 각각 갖고 있다. 그 외에도 담즙, 모유, 림프액, 땀, 눈물 등등 다양한 시료들이 대사체학 연구에 사용된다.

이들 시료 내에 존재하는 대사물질의 농도에 따라 몇 가지 범주로 나누어 볼 수 있다. HMDB 는 암묵적으로 세 가지 범주 정도로 나누고 있다. 첫 번째 범주는 대사물질의 농도가 매우 낮은 '희소한 대사물질' (농도 < 1 nM, 'rare metabolite'), 두 번째는 농도가 매우 높은 '허다한 대사물질' (농도 > 1 μM, 'abundant metabolite'), 세 번째는 명시적으로 사용하지는 않았지만 '희소 대사물질'과 '허다한 대사물질' 사이 농도에 해당되는 '흔한 대사물질' (1 nM ≤ 농도 ≤ 1 μM). 보통 NMR 은 '허다한 대사물질' (abundant metabolite) 정도까지 동정을 할 수 있고, 질량분석기는 보통 '흔한 대사물질' 정도까지 측정할 수 있다.

Table 1. Statistics of the absolutely quantified metabolites in HMDB

측정 장비	대사물질 절대 농도 (μM)	대사물질 (개수)	누적빈도 (%)
MS	< 0.0001	31	2.4
	0.0001 ~ 0.001	118	11.7
	0.001 ~ 0.01	147	23.2
	0.01 ~ 0.1	179	37.3
	0.1 ~ 1	270	58.4
MS & NMR	1 ~ 10	260	78.8
	10 ~ 100	190	93.7
	100 ~1000	53	97.9
	> 1000	27	100.0
	모든 농도	1,275	100.0

HMDB 에 질량분석기와 NMR 을 이용해서 동정 및 적량이 된 대사물질이 3,333 종이 있고, 그중에 절대 적량값을 갖고 있는 대사물질은 대략 2899 개가 있다. 그중 지질 대사물질을 제외하면 대략 1275 개가 된다. 표 1 을 보면, 절대농도의 중간값(median)이 0.1 nM 보다 낮은 농도를 갖는 대사물질은 31 개로 전체 대사물질의 약 2.4% 이다. 이를 보면 절대적량은 대략 0.1 nM 이상 농도는 되어야 측정이 쉽고, 이 중에 10 μM 이상 농도는 되어야 통상적으로 NMR 을 이용하여 적량이 가능하다. Table 1 을 보면, 10 μM 이상 농도의 대사물질은 270 개 정도가 된다. 그렇지만, 일반적으로 NMR 기반 대사체 프로파일링에서는 각 생체시료 별로 80 개 이상의 대사물질 적량은 힘들다.

구체적인 예를 살펴보면, Psychogios 와 공동연구자는 NMR, GC-MS, LC/GC-FID, LC-ESI-MS/MS, DFI-MS 장비로 혈액 대사물질을 각각 49 개, 99 개, 3381 개, 96 개, 139 개를 동정 및 적량을 하고, 기존 문헌을 조사해서 적량값을 서로 비교했다. 그리고 자신들의 실험과 문헌 조사 모두에서 적량값을 갖는 혈액 대사물질은 43 개 정도가 있음을 보여주었다.[3] (보충자료 표 1 참조).

Bouatra 는 다양한 종류의 측정 장비를 이용해서 총 209 개의 대사물질을 동정하고 적량 했다.[5] 측정 장비 별로 보면 NMR (179/85), GC-MS (127/127), DFI/LC-MS/MS (40/40), ICP-MS (10/10), HPLC(10/10)를 이용하여 각각 소변 대사물질을 (동정/적량) 하고, 기존 발표된 대사체학 논문 조사를 통해서 소변 대사물질 동정과 적량값을 정리하여 비교하였다. 그리고 실험과 문헌 조사 모두에서 적량값을 갖는 소변 대사물질 중 항상 적량 및 동정이 가능하다고 예상한 소변 대사물질이 92 개 였다. (보충자료 표 2 참조)

상대적량과 절대적량

대사체 적량은 상대적량과 절대적량으로 나누어 볼 수 있다. 혈액 대사체 프로파일링을 할 때, 시료에서 단백질을 제거하지 않는 경우는 대부분 상대적량을 하게 된다. 혈액 내 단백질이 절대적량을 위해서 시료에 넣어 주는 DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) 또는 TSP (Trimethylsilylpropanoic acid) 같은 reference 물질과 상호작용을 해서 peak 크기가 임의로 변하기 때문이다. 단, ERETIC[6-12] 또는 ERETIC2[13-15] 방법을 사

용하면, 시료의 전처리 또는 DSS 와 TSP 없이도 절대적량이 가능하다.

소변의 경우에는, 혈액 및 다른 시료의 대사물질처럼 절대농도를 측정하기도 하지만, 많은 경우에 'creatinine (mM)' 대비 '대사물질 (μM)' 즉, [대사물질, μM]/[creatinine, mM]의 상대농도를 사용한다. 왜냐하면, 소변은 시료 마다 수분 섭취와 배뇨 사이의 시간 간격에 따라 대사물질의 전제적인 농도가 크게 영향을 받는다. 그래서 시료 간 대사물질을 비교하기 위해서는 이를 보완해야 하는데, 대표적인 보완 방법이 creatinine 보정이다. 역설적이 되게도 소변은 절대적량이 용이하지만, 소변 대사물질의 절대적량은 의미가 미미한데, 혈액 대사물질은 항상성을 유지하고 있어서 절대적량이 유용한데도 불구하고, 측정이 번거로워서 대부분 상대적량을 하는 편이다.

대사물질 동정을 위한 데이터베이스

대사물질 동정 또는 적량은 공개된 데이터베이스를 이용하거나, 기존에 발표된 논문을 참조하거나, 또는 소프트웨어를 이용한다. 단, 데이터베이스 및 기존에 발표된 논문을 이용할 경우, 동정에는 활용할 수 있지만, 적량할 때는 활용할 수 없다는 단점이 있다.

먼저, 대부분의 경우 대사물질의 동정은 단일 대사물질의 NMR 스펙트럼 또는 '화학적 이동' 표 ('chemical shift' table) 와 비교하면서 이루어진다. 이때 활용할 유용한 데이터베이스가 있다. Human Metabolome Database (HMDB),[1–5] Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRDB),[16] Birmingham Metabolite Library (BML),[17] Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD),[18] Metabolomics Database of Linkoping (MDL),[19] NMRShiftDB,[20] Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)[21] 등이 대표적이고, 웹페이지와 검색 기능을 제공하고 있다.

Spiking 실험

저농도로 존재하는 대사물질은 다른 대사물질의 chemical shift 와 겹치게 되면, 대사물질 동정이 모호한 경우가 자주 생기게 된다. 그때는 spiking 이라는 실험을 통해서 대사물질 동정을 이중으로 확인할 수 있다. Spiking 실험은 NMR 시료에 동정하고자 하는 reference 대사물질을 소량 넣은 다음, NMR 실험을 통해서 reference 대사물질을 넣기 전과 후의 NMR 스펙트럼을 비교하여, 동정한 peak 이 커지는지 아닌지를 확인하는 것이다.

예를 들어, Figure 1 의 스펙트럼에서 약 3.19 ppm 위치에 있는 singlet peak 을 choline peak 이라고 동정을 했다. 이를 확인 하기 위해서 같은 NMR 시료에 choline 을 넣고, 추가로 NMR 실험을 한다. 예상한 곳, 3.19 ppm 에 peak 이 커진 것을 볼 수 있다. 즉, 이는 3.19 ppm peak 이 choline 이라는 것을 의미한다.

Spiking 실험을 할 때 주의할 것은 적정량의 reference 대사물질을 넣어 주어야 한다는 것이다. 만약 너무 적은 양을 넣어 주면, peak 크기의 변화를 확인하기 힘들게 된다. 반면, 너무 많은 양을 넣으면, reference peak 이 너무 커져서 정확한 chemical shift 를 찾기 힘들거나, 또는 reference 대사물질이 산성 또는 염기성이 강하면 스펙트럼이 전체적으로 많이 변하게 되어 동정이 어렵게 된다. 경험상, 시작 농도는 대략 0.2 mM 정도가 좋다. 특히, 통계분석을 통해서 유의성 있게 차이 나는 대사물질일 경우에는, spiking 실험을 통해서 동정을 재검정하는 것이 바람직 하다.

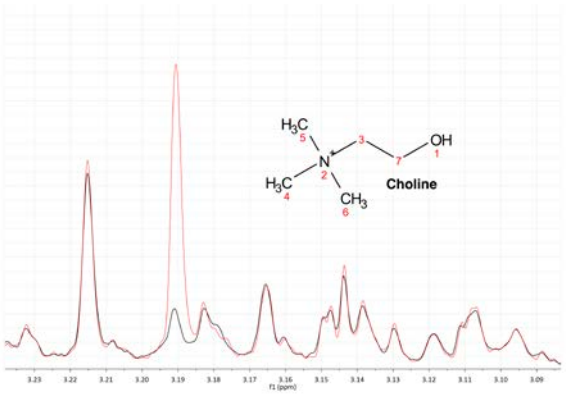

Figure 1. 1D proton NMR spectrum of a urine sample. Black and red lines are NMR spectra before and after adding choline into a urine sample, respectively.

동정을 위한 유용한 논문

사람의 혈청(serum)[3,22–31] 과 소변[5,32–35] 그리고 식물[36,37] 대사체 프로파일링 논문은 이미 많이 발표되었다. NMR 스펙트럼 peak 위에

대사물질 동정이 이루어져 있어 peak 의 모양과 크기에 대한 정보도 함께 이용할 수 있어서 데이터베이스 대비 더 많은 정보를 제공하다. 대사체학 연구에서는 사람의 생체시료뿐만 아니라, 동물 시료도 많이 사용된다. 특히, 대표적인 동물은 쥐다. 쥐의 대사체는 사람의 대사체 프로파일과 다르다. 그래서 기존에 발표된 쥐의 대사체 프로파일링 논문을 참고하면 도움이 많이 된다.[38-48]

동정 및 적량을 위한 소프트웨어

소프트웨어를 사용하면 대부분은 대사물질의 동정뿐만 아니라 동시에 적량도 가능하게 된다. 대사체학 연구자들은 대부분 대사체 프로파일링 소프트웨어를 사용한다. 대표적인 소프트웨어는 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, Canada)와 AMIX(Bruker Bio-Spin, Germany)가 있다. 그 외에도 BATMAN, Bayesil, MetaboMiner 등이 있다. 위의 소프트웨어 중 BATMAN 는 주어진 대사물질의 chemical shift list 와 간단한 분석 조건 설정을 통해 1D ^{1}H NMR 스펙트럼에 복잡하게 겹쳐져 있는 대사물질의 peak 을 Bayesian deconvolution 과 Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm 을 사용하여 자동으로 대사물질을 동정하고 상대농도를 결정해주는 프로그램이다. BATMAN 은 R 프로그램 (R Project for Statistical Computing, https://www.r-project.org)의 팩키지로 설치하여 사용할 수 있다. R 프로그램 사용이 익숙한 사람은 쉽게 사용할 수 있도록 만들어져있다.[49,50] 특히, Hao 는 Nature Protocol 논문에서 BATMAN 의 사용방법을 단계별로 자세하게 기술하고 있고, 사용 시 발생할 수 있는 문제를 해결 방법도 잘 설명하고 있다.[50] BATMAN 은 기본 757 개의 대사물질을 포함한 라이브러리를 가지고 있으며, 새로운 대사물질을 라이브러리에 추가하여 라이브러리를 확장하거나, 반대로 측정이 예상되는 대사물질만을 포함하는 축소된 라이브러리를 만들어서 대사물질 동정의 정확도를 높일 수도 있다. Linux system (HP workstation with 2.3 GHz processor, 64GB RAM and 21 cores)을 사용했을 때, 210 개 스펙트럼(5,249 data points)을 분석하는데 약 46 시간 정도 소요된다고 한다.

Bayesil 는 웹기반 프로그램으로서, Agilent/Varian 또는 Bruker 사의 NMR free inducation decay (FID) 데이터를 웹페이지에 올리면 자동으로 스펙트럼 프로세싱을 수행하고, 혈청 시료는 47 개, 혈장 시료는 50 개, 척수 시료는 43 개의 대사물질을 자동으로 동정하고 절대적량을 수행한다. 최종결과는 프로파일링이된 스펙트럼과 표를 제공한다. 표는 HMDB ID, 대사물질 이름, 절대적량 값, 그리고 신뢰 값을 제공한다. Bayesil 웹페이지에는 시료 준비와 NMR pulse sequence 및 실험조건을 상세하게 설명해 놓았다. Bayesil 는 프로그램을 설치할 필요가 없고, NMR data processing 이 자동화되어 있어 가장 쉽게 사용할 수 있는 프로그램이라고 할 수 있다. 만약 NMR 기반 대사체 프로파일링에 경험과 분석 프로그램이 없다면 Bayesil 은 우선적 선택이 될 수 있을 것이라고 생각한다.[51,52] 단, 현재는 500 MHz 와 600 MHz NMR 장비에서 얻은 data 만 분석할 수 있다. 그리고 참고로, Bayesil 은 “standard” 와 “fast profile” 두 가지 분석 방법을 가지고 있는데, “standard” 방법으로는 스펙트럼 하나를 분석하는데 대략 7 분 정도, “fast profile” 방법으로는 대략 2 분 정도 소요된다.

다음으로, 2D NMR 스펙트럼을 이용하여 대사물질 동정을 하는 MetaboMiner 가 있다. MetaboMiner 의 특징은 1D ^{1}H NMR 스펙트럼이 아니라, ^{1}H-^{1}H TOCSY 와 ^{1}H-^{13}C HSQC 스펙트럼을 이용해서 대사물질을 동정한다는 것이다. 단, 적량은 수행하지 않는다. 그래서 MetaboMiner 은 대사체 프로파일링에 활용하기보다는, 1D ^{1}H NMR 스펙트럼으로 동정한 것을 검정할 때 또는 추가로 대사물질을 동정하고자 할 때 유용하다. MetaboMiner 는 HMDB 와 BMRB 등의 공개 데이터베이스를 활용하고 있고, 대사물질의 개수는 table 2 에 요약되어 있다.

앞에서 설명한 BATMAN 과 Bayesil 은 대표적인 무료 소프트웨어인 반면, AMIX 와 Chenomx 는 대표적인 상용 소프트웨어이다. 먼저, AMIX 는 약 500 여 종의 대사물질에 대한 1D NOESY, 2D TOCSY, 2D J-Resolved,

Tabel 2. Summary of spectral reference libraries of MetaboMiner

NMR 실험	Biofluid	All	Common
TOCSY	Generic	223	60
	CSF	82	39
	Plasma	137	48
	Urine	95	48
HSQC	Generic	502	61
	CSF	146	39
	Plasma	287	48
	Urine	185	61

2D COSY, 2D HSQC, 1D Carbon 스펙트럼 데이터베이스를 보유하고 있다. AMIX 는 대사물질 동정과 적량 모두가 가능하지만, 사용하기가 다소 불편하여, MetaboMiner 처럼 대사물질 동정에 좀 더 유용하다.

Chenomx 는 profiler, library manager, processor, compound builder, spin simulator 등의 4 개의 모듈로 구성되어져 있다. 그리고 Chenomx library 는 338 종 대사물질을 보유하고 있으며, HMDB 에 있는 대사물질의 NMR 스펙트럼을 변환하여 330 여 종의 대사물질도 추가로 구축이 가능하여, 총 670 여 종의 대사물질 구축이 가능하다. 그리고 매우 사용하기 쉬운 GUI (graphical user interface) 환경을 제공한다.

또한, processor 모듈은 FID 을 Fourier transformation 할 수 있을 뿐만 아니라, line broadening, baseline correction, phase correction, shim correction, CSI calibration, pH calibration 등 다양한 기능도 포함하고 있다. 이들 기능을 잘 활용하면 좀 더 정확한 적량이 가능하다. 대표적으로 CSI calibration 은 정확한 적량에 많은 영향을 미친다. 예를 들어서, Figure 3A 는 CSI calibration 잘못된 반면, 3B 는 calibration 이 잘 되었다.

한편 Chenomx 에서는 simulated peak 의 위치와 높이를 사용자가 스펙트럼의 peak 모양에 맞추는 것이 적량이며 동시에 동정을 하는 것인데, 가장 많이 실수하는 경우는, Figure 4 처럼 매우 넓은 peak 과 얇은 peak 이 겹쳐 있을 때이다. 예를 들어 Figure 4 에서 녹색 선은 실제 스펙트럼과 simulated peak 의 차이인데, Figure 4A 처럼 맞추는 것은 잘 못 된 것이다.

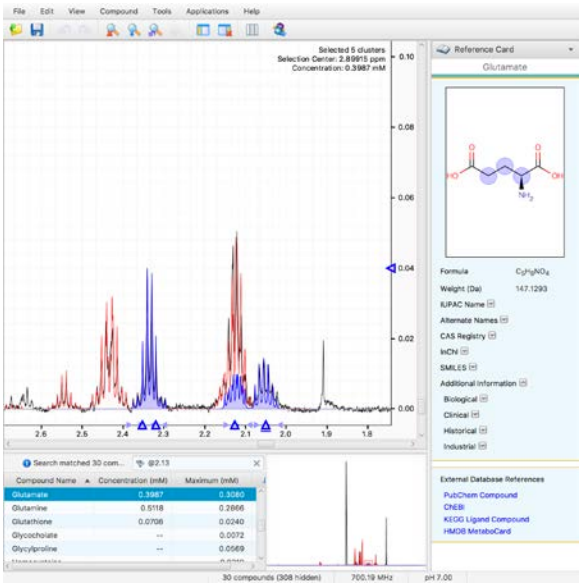

Figure 2. Profiling 1D proton NMR spectrum of a urine sample with Chenomx.

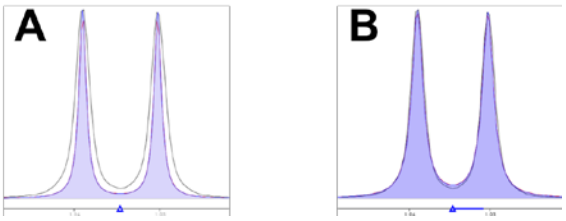

Figure 3. 1D proton NMR spectrum of a urine sample. Black line is real NMR spectrum, and the shaded area represents simulated peaks by Chenomx.

녹색 선이 완만하게 연결되도록 simulated peak 을 figure 4B 처럼 맞추어야 한다. Chenomx 는 사용이 편리하고, 매우 유용한 기능들을 많이 가지고 있어서, 많은 연구자에게 사용되고 있다.

결론 및 논의

현재 대사체학에서는 질량분석기가 핵자기공명 분광기 보다 더 많이 활용되고 있다. 가장 큰 이유는 NMR 의 낮은 감도인데, 향후 자기장 세기를 획기적으로 높인 초전도체 자석의 개발 및 DNP (dynamic nuclear

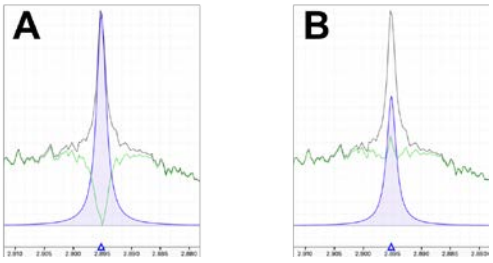

Figure 4. 1D proton NMR spectrum of a urine sample. Black line is real NMR spectrum, and the shaded area represents simulated peaks by Chenomx. The green line is subtracted spectrum by simulated peak.

polarization)[54,55] NMR 을 통해서 훨씬 더 많은 수의 대사물질을 측정할 수 있을 것이라고 기대한다. 그리고 지금까지는 1D proton NMR 기반 대사체 프로파일링이 대부분이었지만, 더욱더 신뢰성 높은 대사체 프로파일링을 위해서 2D NMR 기반 대사체 프로파일링 기술 개발도 더욱더 요구되고 있다.

References

1. D. S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D. D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G. E. Duggan, G. D. MacInnis, A. M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B. D. Sykes, H. J. Vogel, and L. Querengesser, *Nucleic Acids Res.* **35**, D521 (2007)
2. D. S. Wishart, C. Knox, A. C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D. D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J. A. Cruz, E. Lim, C. A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, L. Li, H. J. Vogel, and I. Forsythe, *Nucleic Acids Res.* **37**, D603 (2009)
3. N. Psychogios, D. D. Hau, J. Peng, A. C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam, N. Young, J. Xia, C. Knox, E. Dong, P. Huang, Z. Hollander, T. L. Pedersen, S. R. Smith, F. Bamforth, R. Greiner, B. McManus, J. W. Newman, T. Goodfriend, and D. S. Wishart, *PLoS One* **6**, e16957 (2011)
4. D. S. Wishart, T. Jewison, A. C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, and A. Scalbert, *Nucleic Acids Res.* **41**, D801 (2012)
5. S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A. C. Guo, M. R. Wilson, C. Knox, T. C. Bjorndahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z. T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F. S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, and D. S. Wishart, *PLoS One* **8**, e73076 (2013)
6. S. Akoka, L. Barantin, and M. Trierweiler, *Anal. Chem.* **71**, 2554 (1999)
7. N. Michel and S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **168**, 118 (2004)
8. P.-L. Ding, L.-Q. Chen, Y. Lu, and Y.-G. Li, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **60**, 44 (2012)
9. S. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **20**, 87 (2016)
10. M. J. Albers, T. N. Butler, I. Rahwa, N. Bao, K. R. Keshari, M. G. Swanson, and J. Kurhanewicz, *Magn. Reson. Med.* **61**, 525 (2009)
11. S. Heinzer-Schweizer, N. De Zanche, M. Pavan, G. Mens, U. Sturzenegger, A. Henning, and P. Boesiger, *NMR Biomed.* **23**, 406 (2010)
12. M. C. Martínez-Bisbal, D. Monleon, O. Assemat, M. Piotto, J. Piquer, J. L. Llácer, and B. Celda, *NMR*

Biomed. **22**, 199 (2009)
13. Y.-S. Jung, J.-S. Hyeon, and G.-S. Hwang, *Anal. Chim. Acta* **934**, 194 (2016)
14. V. Molinier, B. Fenet, J. Fitremann, A. Bouchu, and Y. Queneau, *Carbohydr. Res.* **341**, 1890 (2006)
15. R. S. Hong, K. H. Hwang, S. Kim, H. E. Cho, H. J. Lee, J. T. Hong, and D. C. Moon, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **17**, 98 (2013)
16. E. L. Ulrich, H. Akutsu, J. F. Doreleijers, Y. Harano, Y. E. Ioannidis, J. Lin, M. Livny, S. Mading, D. Maziuk, Z. Miller, E. Nakatani, C. F. Schulte, D. E. Tolmie, R. Kent Wenger, H. Yao, and J. L. Markley, *Nucleic Acids Res.* **36**, D402 (2007)
17. C. Ludwig, J. M. Easton, A. Lodi, S. Tiziani, S. E. Manzoor, A. D. Southam, J. J. Byrne, L. M. Bishop, S. He, T. N. Arvanitis, U. L. Günther, and M. R. Viant, *Metabolomics* **8**, 8 (2012)
18. Q. Cui, I. A. Lewis, A. D. Hegeman, M. E. Anderson, J. Li, C. F. Schulte, W. M. Westler, H. R. Eghbalnia, M. R. Sussman, and J. L. Markley, *Nat. Biotechnol.* **26**, 162 (2008)
19. *Metabolomics Database of Linkoping (MDL)* (2005) Available at: https://liu.se/hu/mdl/main.
20. *NMRShiftDB* Available at: https://nmrshiftdb.nmr.uni-koeln.de/portal/media-type/html/user/anon/page/default.psml/js_pane/P-Home;jsessionid=49142EA2A833064513B3C1830FC7CDE6.
21. *SDBSWeb (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)* Available at: http//sdbs.db.aist.go.jp.
22. J. K. Nicholson, P. J. D. Foxall, M. Spraul, R. D. Farrant, and J. C. Lindon, *Anal. Chem.* **67**, 793 (1995)
23. C. A. Daykin, P. J. D. Foxall, S. C. Connor, J. C. Lindon, and J. K. Nicholson, *Anal. Biochem.* **304**, 220 (2002)
24. A. R. Fernie, R. N. Trethewey, A. J. Krotzky, and L. Willmitzer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 763 (2004)
25. S. Tiziani, A.-H. Emwas, A. Lodi, C. Ludwig, C. M. Bunce, M. R. Viant, and U. L. Günther, *Anal. Biochem.* **377**, 16 (2008)
26. Q. He, X. Kong, G. Wu, P. Ren, H. Tang, F. Hao, R. Huang, T. Li, B. Tan, P. Li, Z. Tang, Y. Yin, and Y. Wu, *Amino Acids* **37**, 199 (2009)
27. D. Misra and U. Bajpai, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **23**, (2009)
28. D. A. MacIntyre, B. Jiménez, E. J. Lewintre, C. R. Martín, H. Schäfer, C. G. Ballesteros, J. R. Mayans, M. Spraul, J. García-Conde, and A. Pineda-Lucena, *Leukemia* **24**, 788 (2010)
29. N. K. Srivastava, S. Pradhan, B. Mittal, and G. A. N. Gowda, *NMR Biomed.* **23**, 13 (2010)
30. M. Trabi, M. D. Keller, and N. N. Jonsson, *Metabolomics* **9**, 1041 (2013)
31. Y. Simón-Manso, M. S. Lowenthal, L. E. Kilpatrick, M. L. Sampson, K. H. Telu, P. A. Rudnick, W. G. Mallard, D. W. Bearden, T. B. Schock, D. V. Tchekhovskoi, N. Blonder, X. Yan, Y. Liang, Y. Zheng, W. E. Wallace, P. Neta, K. W. Phinney, A. T. Remaley, and S. E. Stein, *Anal. Chem.* **85**, 11725 (2013)
32. E. Holmes, P. J. Foxall, M. Spraul, R. D. Farrant, J. K. Nicholson, and J. C. Lindon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 1647 (1997)
33. H. C. Keun, O. Beckonert, J. L. Griffin, C. Richter, D. Moskau, J. C. Lindon, and J. K. Nicholson, *Anal. Chem.* **74**, 4588 (2002)
34. U. F. H. Engelke, *Clin. Chem.* **50**, 58 (2004)
35. D. M. Jacobs, L. Spiesser, M. Garnier, N. de Roo, F. van Dorsten, B. Hollebrands, E. van Velzen, R. Draijer, and J. van Duynhoven, *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 2349 (2012)
36. K. Choi, J. S. Park, H. S. Kim, Y. H. Choi, J. H. Jeon, and J. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 119 (2017)
37. H.-E. Kim, Y. H. Choi, K.-H. Choi, J. S. Park, H. S. Kim, J. H. Jeon, M. S. Heu, D.-S. Shin, and J.-H. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **16**, 91 (2012)

38. T. De Meyer, D. Sinnaeve, B. Van Gasse, E.-R. Rietzschel, M. L. De Buyzere, M. R. Langlois, S. Bekaert, J. C. Martins, and W. Van Criekinge, *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1781 (2010)
39. Y. Zhang, W. Li, J. Sun, R. Zhang, B. Wu, X. Zhang, and S. Cheng, *Ecotoxicology* **20**, 1065 (2011)
40. Z. Gao, X. Liu, S. Yu, Q. Zhang, Q. Chen, Q. Wu, J. Liu, B. Sun, L. Fang, J. Lin, B.-M. Zhu, X. Yan, and F. Liang, *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2014**, 1 (2014)
41. P.-R. Wang, J.-S. Wang, M.-H. Yang, and L.-Y. Kong, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **88**, 106 (2014)
42. A. Wijeyesekera, C. Selman, R. H. Barton, E. Holmes, J. K. Nicholson, and D. J. Withers, *J. Proteome Res.* **11**, 2224 (2012)
43. R. Schicho, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, G. Duggan, H. J. Vogel, and M. Storr, *J. Proteome Res.* **9**, 6265 (2010)
44. L. E. Romick-Rosendale, A. M. Goodpaster, P. J. Hanwright, N. B. Patel, E. T. Wheeler, D. L. Chona, and M. A. Kennedy, *Magn. Reson. Chem.* **47,** S36 (2009)
45. Y. I. Shurubor, U. Paolucci, B. F. Krasnikov, W. R. Matson, and B. S. Kristal, *Metabolomics* **1,** 75 (2005)
46. Y. Wang, J. Utzinger, J. Saric, J. V. Li, J. Burckhardt, S. Dirnhofer, J. K. Nicholson, B. H. Singer, R. Brun, and E. Holmes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 6127 (2008)
47. J.-B. Peng, H.-M. Jia, T. Xu, Y.-T. Liu, H.-W. Zhang, L.-L. Yu, D.-Y. Cai, and Z.-M. Zou, *Process Biochem.* **46**, 2240 (2011)
48. C. Chen, D. J. Brenner, and T. R. Brown, *Radiat. Res.* **175**, 622 (2011)
49. J. Hao, W. Astle, M. De Iorio, and T. M. D. Ebbels, *Bioinformatics* **28**, 2088 (2012)
50. J. Hao, M. Liebeke, W. Astle, M. De Iorio, J. G. Bundy, and T. M. D. Ebbels, *Nat. Protoc.* **9**, 1416 (2014)
51. S. Ravanbakhsh, P. Liu, T. C. Bjorndahl, R. Mandal, J. R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu, C. Luchinat, R. Greiner, and D. S. Wishart, *PLoS One* **10**, e0132873 (2015)
52. S. Ravanbakhsh, P. Liu, T. C. Bjordahl, R. Mandal, J. R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu, C. Luchinat, R. Greiner, and D. S. Wishart, *PLoS One* **10**, e0124219 (2015)
53. Z. Gan, I. Hung, X. Wang, J. Paulino, G. Wu, I. M. Litvak, P. L. Gor'kov, W. W. Brey, P. Lendi, J. L. Schiano, M. D. Bird, I. R. Dixon, J. Toth, G. S. Boebinger, and T. A. Cross, *J. Magn. Reson.* **284**, 125 (2017)
54. A. Abragam and M. Goldman, *Rep. Prog. Phys.* **41**, 395 (1978)
55. A. Bornet, M. Maucourt, C. Deborde, D. Jacob, J. Milani, B. Vuichoud, X. Ji, J. N. Dumez, A. Moing, G. Bodenhausen, S. Jannin, and P. Giraudeau, *Anal. Chem.* **88**, 6179 (2016)