



Practical Guide to NMR-based Metabolomics - I : Introduction and Experiments

Young-Sang Jung*

Jeongjail-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Received Jul 30, 2017; Revised Aug 15, 2017; Accepted Aug 19, 2017

Abstract Metabolomics is one of latest '-omics', which is to analyze metabolome in cells, tissues and biofluids and to study metabolisms. It has become increasingly popular since 1990. The first goal of metabolomics is to analyze metabolites in a technical aspect. The major two analytical platforms in metabolomics are NMR spectroscopy and mass spectrometry (MS). MS is superior to NMR for detecting many more metabolites. That is one of the most important factors in metabolomics. However, NMR also has several advantages over MS. In this review, I firstly introduced metabolomics by comparing NMR-based metabolomics and MS-based metabolomics. Second, I explored technical issues on sample preparation and NMR experiments for metabolite identification and quantification.

Keywords Metabolomics, NMR, NMR-based Metabolomics, metabolite, metabolic profiling

서문

유전체학(genomics), 전사체학(transcriptomics), 단백질체학(proteomics), 대사체학(metabolomics) 등과 같은 오믹스(' -omics')의 등장은 생체 내에 일어나는 생명현상을 연구하는 패러다임을 바꾸어 놓았다. 이들 오믹스 중에 가장 최근에 등장한 것이 대사체학인데, 1990 년도부터 주목 받기 시

작했다. 대사체학은 생체 내부와 외부 환경의 변화에 따라 생체 내에 역동적으로 변화하는 대사체(metabolome)를 분석하고, 영향을 받은 대사(metabolism)를 제안하고, 해석하는 학문이다. 여기서 대사체라는 것은 생체 안에 있는 약 1.5 kDa 이하의 측정 가능한 모든 분자들의 집합(set)이다. 그리고 그런 개개의 작은 분자들을 대사물질(metabolite)이라고 한다. 즉, 대사체가 집합의 개념이라면, 대사물질은 원소(element)의 개념이다. 대사체는 내인성(endogenous) 분자뿐만 아니라 외인성(exogenous) 분자도 포함한다. 예를 들어, 환경호르몬, 식품보존제, 약물 및 약물 대사물질, 병원균의 대사물질 등도 생체 대사물질이다. Human Metabolome Database (HMDB) 통계 자료에 따르면, 현재까지 74,462 개의 사람 생체 대사물질이 있고, 그 중에 29,266 개는 내인성 대사물질이다.¹ 반면 외인성 대사물질은 이보다 더 많은 45,196 개가 있다. 외인성 대사물질 중에 가장 많은 것은 음식물 대사물질로서 32,518 개가 있다. 그 다음으로는 약물 대사물질이 2485 개, 미생물이 대사물질 172 개, 독성/공해 대사물질이 164 개 순으로 있다. 대사체학 연구의 시작은 앞에서 언급한 대사물질을 측정하는 것부터 시작 된다. 그러나 이는 다른 오믹스와 비교할 때 쉬운 일은 아니다. 예를 들어 유전자(gene)와 전사물(mRNA)은 4 종류의 뉴클레오타이드가 일련의 순서로 연결된 중합체(polymer)이고, 단백질은 20 개의 아미노산이 일련의 순서로 연결된 중합체이다. 그래서 유전자, 전사물, 단백질은 기본단위 물

* Correspondence to: Young-Sang Jung, Jeongjail-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea, Tel: 82-70-8292-7386; E-mail: youngsang.jung@gmail.com

질의 일련의 순서를 찾는 것이 동정 (identification)의 과정이다. 이는 측정 관점에서 보면, 4 개 또는 20 개 기본단위 물질만 측정 할 수 있으면 된다. 이 점은 동정을 매우 용이하게 하며, 단일 장비와 단일 기술로서 빠른 속도의 분석을 가능케 한다. 반면 대사물질은 측정 해야할 분자의 다양성이 대사물질의 개수만큼 된다고 할 수 있다. 이런 대사물질의 다양성은 측정을 어렵게 만들어서, 단일 측정 장비 또는 단일 기술로서는 분석할 수 있는 대사물질의 수를 제한되게 만든다. 그래서 대사체학에서 가장 중요한 부분을 차지하는 것 중에 하나가 대사체 분석장비 및 분석 기술이라고 할 수 있다.

대표적 대사체 분석 장비로는 질량분석기(MS, mass spectrometry)와 핵자기공명분광기(NMRS, nuclear magnetic resonance spectroscopy)가 있다. 각 분석 장비는 단독으로 사용되기도 하지만 다양한 장비와 결합해서 사용하는 경우가 많다. 특히 질량분석기는 다양한 부가 장비와 결합하여 사용한다. 그 예로 high performance liquid chromatography-tandem MS (HPLC-MS/MS), ultra high performance liquid chromatography-high resolution orbitrap MS (UHPLC-HRMS), fast atom bombardment ionization MS (FAB-MS), two-dimensional gas chromatography quadrupole MS (GCxGC-MS), two-dimensional gas chromatography time-of-flight MS (GCxGC-TOF-MS), nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-tandem MS (LC-ESI-MS/MS), LC / quadruple time-of-flight mass spectrometry (LC/QTOF-MS) 등 다양한 MS 기반 장비가 있다. 반면 NMR 기반 대사체학의 경우는 solution NMR 또는 high resolution magic angle spinning NMR (HRMAS NMR) 장비가 주로 사용되지만, 가끔 solid phase extraction NMR (SPE-NMR), LC-NMR, LC-SPE-NMR, LC-MS-SPE-NMR 장비가 이용 되기도 한다.

대사체학 연구를 위한 다음 이슈는, 실험을 통

해서 각 시료 당 얻은 NMR 또는 MS 스펙트럼을 어떻게 비교 분석하느냐 하는 것이다. 두 가지 다른 접근 방식이 있다. 하나는 'Metabolite/Metabolic profiling'이고 다른 하나는 'Metabolic fingerprinting'이다. 각 용어의 개념은 다음 섹션에서 설명을 했다. 각각의 접근 방식의 차이를 간단하게 살펴보면, 'Metabolite profiling'에서는 먼저 대사물질의 동정과 적량(quantification)을 수행한다. 그런 다음 적당한 대사물질을 주로 단변량(univariate) 분석을 한다. 대표적인 단변량 분석으로는 't-student test', 'Mann-Whitney U-test'가 있다. 반면 'Metabolic fingerprinting' 경우에는 대사물질의 동정과 적량을 배제한다. 그리고 개개 대사물질을 비교 분석하기 보다는 스펙트럼을 자체를 서로 비교한다. 그런데 각 스펙트럼은 대략 수 천개의 변량(variate)을 가지고 있다. 그래서 여러 스펙트럼을 동시에 비교한다는 것은 수 천개의 변량을 살펴면서 스펙트럼의 차이를 분석해야 한다는 것을 의미한다. 이는 변량이 하나인 단변량(univariate) 분석과는 다른 차원의 분석을 요구한다. 이런 고차원적인 분석을 위해서 도입된 통계분석 방법이 다변량(multivariate) 분석이다. 다변량 분석의 대표적인 분석법으로는 주성분 분석(PCA, principle component analysis)이 있다.²

대사체학 연구에서 최종적인 단계는 대사경로 분석 및 해석이 있다. 이 단계에서는 정상 농도를 벗어난 대사물질을 여럿 포함하는 대사경로 또는 대사회로를 찾고, 왜 그 대사경로가 생체 내부 또는 외부의 특정 자극에 영향을 받았는지 이유를 설명한다. 한 걸음 더 나아가면, 해석의 신빙성과 정확성을 높이기 위해서 대사체 분석뿐만 아니라 해석을 뒷받침 해줄 보충 자료를 찾고, 'immunoprecipitation', 'cell invasion assay', 'DNA fragmentation assay', 'histological analysis' 'serum biochemical analysis' 등과 같은 생물검정(bioassay) 실험, 임상 데이터 분석 및 다른 '오믹스' 연구를 추가로 수행한다.^{3,4}

대사체학은 다양한 연구 분야에서 적용되고 있다. 질병진단 및 치료효과 모니터링을 위한 바이오마커 발굴, 신약 개발, 약물 효능 및 독성 평가, 맞춤형 의학, 환경호르몬 유해성 평가,

농축수산물 원산지 평가 등이 있다. 대사체학 논문은 1990 년도 이후부터 지속적으로 증가하고 있다.^{5,6} 대사체학은 앞으로도 다른 오믹스와 함께 계속 발전해 나갈 것으로 보인다.

Metabolomics 와 비슷한 용어 및 개념

대사체학으로 가장 보편적으로 사용되는 용어는 ‘Metabolomics’이다.⁷ 이는 주어진 조건 아래서 대사체 또는 모든 대사물질을 포괄적이고도 종합적으로 분석하는 것을 의미한다. 그러나 Metabolomics 는 실질적으로는 힘들다. 현재 분석 기술로는 단일 플랫폼 기술과 실험 방법으로 시료 내에 있는 모든 대사물질을 분석하는 것이 현실적으로는 거의 불가능하기 때문이다. 그런 의미에서 ‘Metabolomics’ 는 개념적인 용어라고 보는 것이 적절하다고 생각된다. 대사체학 연구에서는 ‘Metabolomics’ 라는 용어 외에도 연구 방식에 따라 몇몇 다른 용어가 자주 쓰인다.⁸ 가장 대표적인 것이 ‘metabolite profiling’ 과 ‘metabolic profiling’ 이다. 이 둘은 측정된 대사물질에 한해서 동정 및 적량을 수행 하는 것을 의미한다.^{7,9,10} 이 두 용어는 자주 혼용된다. 실험적 측면에서 보면 두 용어는 동일하다고 생각할 수 있다. 단, 해석 상 중점을 두는 부분에 있어서 약간의 차이가 있다. ‘metabolite profiling’ 은 그룹 간 농도에 차이가 있는 대사물질을 찾는 데 좀 더 중점을 두는 반면,^{11,12} ‘Metabolic profiling’ 은 대사물질의 대사 (metabolism) 분석에 좀 더 중점을 둔다. 다음으로 ‘metabolite target analysis’ 도 자주 사용되는데, 이는 개념적으로는 다른 용어에 비해서 ‘Metabolomics’ 와 가장 다르다고 할 수 있다.¹³ 왜냐하면, 분석할 소수의 대사물질을 미리 정하고, 그 대사물질만을 측정하고 비교 분석하기 때문이다. 다음으로 가끔 등장하는 용어는 ‘metabolic fingerprinting’ 과 ‘metabolic footprinting’ 이다. ‘metabolic fingerprinting’ 은 대사체 프로파일링을 하지 않고 즉, 대사물질 동정 및 적량을 하지 않고, 대사물질의 농도에 대한 정보를 가지고 있는 스펙트럼을 직접 비교 분석한다. 반면 ‘metabolic footprinting’ 은 분석 측면에서

는 ‘metabolic fingerprinting’ 과 같지만 측정하는 시료와 관점의 방향이 다르다. 예를 들어서 세포를 배양해서 ‘세포’ 의 대사체 스펙트럼을 비교 분석하면 ‘metabolic fingerprinting’ 이 되고, ‘세포 배양액’ 의 대사체 스펙트럼을 비교 분석하면 ‘metabolic footprinting’ 이 된다. 한편 대사체학 연구에서 동정 및 적량을 하지 않는 ‘metabolic fingerprinting’ 은 가장 쉽고 빠르게 적용 가능한 접근 방식으로서 대부분의 경우 다변량 분석과 함께 사용된다.¹⁴ 끝으로 가끔 볼 수 있는 ‘untargeted metabolic profiling’, ‘global metabolic profiling’ 두 용어는 같은 것으로 볼 수 있으며 앞에서 언급한 ‘Metabolite target analysis’ 와 반대되는 개념이라고 할 수 있다.

대사체 분석 장비 및 장단점

대표적인 대사체학 분석 장비로는 질량분석기 (MS, mass spectrometry) 와 핵자기공명분광기 (NMRS, nuclear magnetic resonance spectroscopy) 가 있다. 두 장비는 각각 장단점을 가지고 있고, 질량분석기의 단점이 핵자기공명분광기의 장점이 되고, 질량분석기의 장점이 핵자기공명분광기의 단점이 된다. 이 두 장비는 단독 또는 상호 보완적으로 함께 이용이 되기도 한다. 질량분석기의 가장 큰 장점은 측정 감도가 매우 높아 대략 수백 개 이상의 많은 개수의 대사체를 측정할 수 있다는 것이다. 단점은 적량이 용이하지 않고, 실험의 재연성 (reproducibility) 및 신뢰성 (reliability) 이 다소 부족하다는 것이다. 반면, 핵자기공명분광기는 적량이 용이하고, 실험의 재연성 및 신뢰성은 높지만, 감도가 낮아 측정할 수 있는 대사체의 개수가 보통 50 ~ 70 개 미만으로서, MS 대비 상대적으로 많이 적은 편이다. 그래서 NMR 기반 대사체학 연구는 신속하게 그룹 간에 대사의 차이가 있는지를 확인하거나, 상대적으로 높은 농도의 대사물질이 관여하는 대사경로에 대한 연구를 할 때 적합하다. 주로 언급되는 대사경로는 에너지대사와 직간접적으로 관련 대사경로인데, glycolysis, gluconeogenesis, citric acid cycle, urea cycle 등이 있다.

MS 기반 대사체학은 NMR 기반 대사체학과 달리 시료의 전처리 방법에 따라 측정 가능한 대사물질이 미리 결정된다. 그리고 실험 방법에 따라, 즉 어떤 종류의 분리 기술 (separation techniques)을 사용하는가에 따라, 또 어떤 종류의 질량분석기를 사용하는가에 따라, 또 어떤 실험 프로토콜을 선택하는가에 따라 측정되는 대사물질의 종류, 특성, 크기 등이 다양해진다. 반면, NMR의 경우는 시료의 전처리가 간단하다. 액체상 시료의 경우는, pH를 맞추기 위해서 완충용액(buffer solution)을 넣는 것 정도가 전부이다. 조직(tissue) 시료 같은 경우에도 HRMAS NMR을 사용할 경우에는 완충액 정도만 넣으면 NMR 시료 준비가 끝난다. 그리고 NMR 실험의 경우는, 특정 그룹의 대사물질만을 측정하는 것이 아니라, 시료에 녹아 있는 모든 대사물질을 측정하는 것이 MS 실험과 대비 되는 점이다. 그래서 이론적으로는 NMR이 MS보다 Metabolomics에 더 적합하지만, 실질적으로는 그 반대이다. 그 이유는 NMR의 경우는 MS에 비해 감도가 약 1,000 배 이상 차이가 낮기 때문이다.

시료 종류 및 전처리

대사체학에 사용되는 NMR 실험 시료는 크게 두 종류로 나눌 수 있다. 액체상 (liquid state) 시료와 반고체상 (semi-solid state) 시료이다. 액체상 시료에는 혈액, 소변, 뇌척수액 (cerebral spinal fluid), 침 (saliva) 등이 있고, 전처리 과정이 매우 쉽고 간단하다. 반고체상 시료에는 조직(tissue) 시료가 있다. 거의 생체 모든 조직이 시료로 사용 가능하며, 심장, 신장, 간, 뇌, 췌장, 혈관 등이 자주 사용된다. 조직 시료는 전처리 방법에 따라 두가지 상태의 NMR 시료를 만들 수 있다. 첫번째는 조직을 추출을 해서 액체상 시료를 만드는 것이다. 조직 추출 방법은 기존에 발표된 여러 논문에 잘 기술되어 있다.¹⁵ 두번째는 전처리 과정 없이 반고체 상태로 그대로 (intact) 조직을 사용하여 실험하는 것이다.^{16,17} 조직을 전처리 없이 그대로 사용하는 경우는 HRMAS NMR 실험을 통해서 스펙트럼을 얻는다. HRMAS NMR 실험은 몇 가지 장점이 있다. 앞에서 언급 했듯

이 전처리 과정이 필요 없고, 전처리 과정 중에 발생하는 대사물질의 변형이나 손실을 막을 수 있다. 또 용해되어 있는 대사물질뿐만 아니라 용해되어 있지 않은 (insoluble) 대사물질도 동시에 측정이 가능하다. 그리고 스펙트럼의 해상도(resolution)도 액체상 NMR 만큼 높다.

대사체학의 대표적인 시료에는 혈액과 소변이 있다. 그 중에 가장 많이 사용되는 시료는 혈액인데, 다른 액체상 시료와 중요한 차이점이 있다. 여기서 혈액은 전혈(whole blood)이 사용되기 보다는 거의 대부분의 경우 혈장(blood plasma) 또는 혈청(blood serum)이 사용된다. 혈장과 혈청은 단백질과 같은 거대 분자들을 포함하고 있는데, 이를 제거하지 않고 NMR 실험을 하려면, Car-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) NMR pulse sequence를 사용해야 한다. 여기서 CPMG의 역할은 단백질과 거대 분자의 NMR peak를 제거하고, 분자량이 작은 대사물질의 NMR peak 크기는 대부분 유지 시키는 방법이다. 그러나 만약 단백질을 제거한 경우에는 CPMG NMR pulse sequence를 사용하지 않아도 된다. 단백질 제거 방법으로는 필터(3 kDa cut-off)를 사용하여 물리적으로 걸러내거나, 메탄올 (methanol), 클로로포름 (chloroform), 과염소산 (perchloric acid), 아세톤 (acetone), 아세토니트릴 (acetonitrile) 등의 용액을 이용해 침전시켜 제거한다. 단백질을 제거한 시료의 장점은 시료의 변질이 줄어든다.¹⁸ 그리고 절대적량이 용이하다. 반면 단백질 제거 과정 중에 원 시료에 있던 대사물질 중 일부가 손실 될 수 있다.^{18,19} 다음으로 소변은 혈액과 함께 대사체학 연구에 가장 많이 사용되는 시료로서, 높은 해상도의 NMR 스펙트럼을 얻을 수 있고, 생체 시료 중에 가장 많은 대사물질에 대한 정보를 제공한다.²⁰ 이런 소변은 혈액과는 다른 이슈를 가지고 있다. 소변 시료 마다 대사물질의 농도, pH, 이온강도(ionic strength)의 차이가 매우 크다. 소변의 농도 같은 경우는 같은 사람의 소변이라도 묽을 때와 진할 때가 10 배 이상 차이가 나기도 한다. 특히, chemical shift에 크게 영향을 주는 pH와 이온강도의 경우, 정상인의 소변 pH는 5.5 ~ 6.5 정도의 변화를 보이며,

스트레스 환경 하에서는 4.6 ~ 8.0 까지도 변화를 보인다. 그리고 이온강도는 10 배 정도까지도 변화를 보인다.²⁰⁻²² 그래서 소변 시료는 pH와 이온강도의 영향을 최소화 하기 위한 전처리가 필수적이다.^{20,23,24}

대사체 동정과 적량을 위한 NMR 실험

NMR 기반 대사체학에서 대사체 프로파일링을 위해서 주로 사용하는 NMR 실험은 one dimensional (1D) proton (1H) NMR 실험이다. 1D 를 사용하는 이유는 많은 시료의 NMR 스펙트럼을 짧은 시간 안에 신속하게 얻기 위해서이고, proton 을 측정하는 것은 가장 감도가 높은 핵종이기 때문이다. 1D 1H NOESY-presat (nuclear Overhauser spectroscopy presaturation; Bruker 장비, noesypr1d), 1D 1H CPMG-presat (Bruker 장비, cpmgpr)가 대사체 프로파일링을 위해서 대표적으로 사용되는 NMR pulse sequence 이다. 두 실험 중에서 CPMG-presat 은 시료에 거대 분자가 존재 할 경우 생기는 크고 넓은 (broad) NMR peak 을 제거하기 위해서 사용한다. 예를 들어 혈액에는 단백질 같은 거대 분자가 다량 존재해서 CPMG-presat 을 사용한다. 반면, 거대 분자가 거의 존재하지 않는 소변 시료는 NOESY-presat 을 사용한다. 그리고 두 실험 방법에서 '-presat' 은 NMR 스펙트럼에서 물 peak 을 제거를 위해서 presaturation 방법을 사용했다는 것을 말한다. NMR 시료의 용매가 물일 때, '물 peak 제거'(water suppression)는 NMR 실험에서 중요한 이슈 중에 하나이다. 정확한 적량이 중요한 대사체학 연구에서는 특히 water suppression 이 중요하다. Presaturation 외에도 다양한 water suppression 방법들이 있지만,^{25,26} presaturation 의 장점은 적용이 쉽고, 처음 시료에 최적화한 설정값을, 다른 모든 시료에도 동일하게 사용하더라도 대체로 문안한 수준의 NMR 스펙트럼을 얻을 수 있기 때문이다. 자세한 NMR 실험 방법은 이미 발표된 논문들을 참조하되, Beckonert 이 Nature Protocols 에 발표한 것이 대표적으로 참고할 만한 논문이다.²⁷ 이 실험의 설정값을 따르면, 1D 1H NOESY-presat 와 1D 1H CPMG-presat 의

스펙트럼 측정 소요시간은 각각 약 5 분, 10 분 정도가 된다. 그리고 시료 교체, 온도 안정화, shimming, 90° pulse 설정 등 시료 당 실제 실험 소요시간은 각각 약 15 분, 20 분 정도가 된다. 그러나 많은 사람들이 Presaturation 을 사용하고 있다고 하더라도, 최선의 방법이라고 보기는 힘들다.^{25,26} 예를 들어 Sat-180 (saturation with adiabatic toggling of 180° pulse inversion)와 WET-NOESY-1D (Water suppression Enhanced through T1 effects-NOESY-1D)는 좋은 대안이 될 수도 있을 것이다.^{25,26} 그러나 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, Canada)을 사용해서 절대적량을 하려면, 여전히 프로그램이 제안하는 1D 1H NOESY-presat 실험과 그 실험 설정 값을 사용해서 NMR 실험을 해야한다. 여기서 Chenomx 는 NMR spectrum 의 대사체 동정과 적량을 위한 소프트웨어인데 많이 사람들이 사용하고 있다. 시료 준비 및 NMR 실험 설정 값은 Chenomx NMR Suite 유저 가이드에 나와 있다.

다음으로 대사물질 동정을 위해서는 1D 13C 실험을 비롯해서 다양한 two dimensional (2D) NMR 실험을 한다. 대표적인 실험으로는 1H-1H J-resolved spectroscopy (JRES), 1H-1H correlation spectroscopy (COSY), 1H-1H total correlation spectroscopy (TOCSY), 13C distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT), 1H-13C heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (HSQC), 1H-13C heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) 등이 있다.

결론 및 논의

이번 리뷰에서는 대사체학을 핵자기공명분광기와 질량분석기의 기술적인 측면을 비교하며 간략하게 소개했다. 그리고 NMR 기반 대사체학 연구를 위한 기술요소 중에서 시료 전처리와 대사체 동정과 적량을 위한 NMR 실험에 대해서 논의 했다. 다음에 연재될 리뷰에서는 대사체 동정과 적량에 대해서 논의할 것이고, 마지막으로 연재될 리뷰에서는 NMR spectrum processing 및 다변량 분석에 대해서 논의할

것이다.

References

1. 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. Bjorn Dahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, and A. Scalbert, *Nucleic Acids Res.* **41**, D801 (2013)
2. S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi, *Chemometr. Intell. Lab.* **2**, 37 (1987)
3. D. G. Hebels, P. Georgiadis, H. C. Keun, T. J. Athersuch, P. Vineis, R. Vermeulen, L. Portengen, I. A. Bergdahl, G. Hallmans, D. Palli, B. Bendinelli, V. Krogh, R. Tumino, C. Sacerdote, S. Panico, J. C. Kleinjans, T. M. de Kok, M. T. Smith, S. A. Kyrtopoulos, and C. EnviroGenomarkers Project, *Environ. Health Persp.* **121**, 480 (2013)
4. A. Sreekumar, L. M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, and A. M. Chinnaiyan, *Nature* **457**, 910 (2009)
5. A.-H. M. Emwas, R. M. Salek, J. L. Griffin, and J. Merzaban, *Metabolomics* **9**, 1048 (2013)
6. M. Ernst, D. B. Silva, R. R. Silva, R. Z. N. Vêncio, and N. P. Lopes, *Nat. Prod. Rep.* **31**, 784 (2014)
7. O. Fiehn, J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. N. Trethewey, and L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol.* **18**, 1157 (2000)
8. R. Goodacre, S. Vaidyanathan, W. B. Dunn, G. G. Harrigan, and D. B. Kell, *Trends Biotechnol.* **22**, 245 (2004)
9. O. Fiehn, *Comp Funct Genomics* **2**, 155 (2001)
10. G. G. Harrigan, and R. Goodacre, *Metabolic profiling : its role in biomarker discovery and gene function analysis*, Kluwer Academic, (2003)
11. S. J. Hur, H. W. Lee, A. H. Shin, and S. J. Park, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **18**, 10 (2014)
12. W. S. Choi, Y. W. In, H. H. Kim, J. S. Hyun, and S. J. Park, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 44 (2017)
13. A. M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, and C. M. Slupsky, *Anal. Chem.* **78**, 4430 (2006)
14. 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)
15. C. A. Sellick, R. Hansen, G. M. Stephens, R. Goodacre, and A. J. Dickson, *Nat. Protoc.* **6**, 1241 (2011)
16. D. Yoon, I. H. Jo, and S. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **20**, 82 (2016)
17. O. Beckonert, M. Coen, H. C. Keun, Y. Wang, T. M. D. Ebbels, E. Holmes, J. C. Lindon, and J. K. Nicholson, *Nat. Protoc.* **5**, 1019 (2010)
18. S. Tiziani, A. H. Emwas, A. Lodi, C. Ludwig, C. M. Bunce, M. R. Viant, and U. L. Günther, *Anal. Biochem.* **377**, 16 (2008)
19. J. R. Sheedy, P. R. Ebeling, P. R. Gooley, and M. J. McConville, *Anal. Biochem.* **398**, 263 (2010)
20. V. M. Asiago, G. A. Nagana Gowda, S. Zhang, N. Shanaiah, J. Clark, and D. Raftery, *Metabolomics* **4**, 328 (2008)
21. J. C. Lindon, J. K. Nicholson, and J. R. Everett, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **38**, 1 (1999)
22. M. Lauridsen, S. H. Hansen, J. W. Jaroszewski, and C. Cornett, *Anal. Chem.* **79**, 1181 (2007)
23. L. Jiang, J. Huang, Y. Wang, and H. Tang, *The Analyst* **137**, 4209 (2012)
24. C. Xiao, F. Hao, X. Qin, Y. Wang, and H. Tang, *The Analyst* **134**, 916 (2009)
25. H. Mo, and D. Raftery, *J. Magn. Reson.* **190**, 1 (2008)
26. P. Giraudeau, V. Silvestre, and S. Akoka, *Metabolomics* **11**, 1041 (2015)
27. O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon, and J. K. Nicholson, *Nat. Protoc.* **2**, 2692 (2007)