



Practical Guide to NMR-based Metabolomics – III : NMR Spectrum Processing and Multivariate Analysis

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 Aug 15, 2018; Revised Sep 1, 2018; Accepted Sep 3, 2018

Abstract NMR-based metabolomics needs various knowledge to elucidate metabolic perturbation such as NMR experiments, NMR spectrum processing, raw data processing, metabolite identification, statistical analysis, and metabolic pathway analysis regarding technical aspects. Among them, some concepts of raw data processing and multivariate analysis are not easy to understand but are important to correctly interpret metabolic profile. This article introduces NMR spectrum processing, raw data processing, and multivariate analysis.

Keywords NMR, metabolomics, phase correction, baseline correction, multivariate analysis, spectrum processing

서문

NMR 기반 대사체학에서 실험 이후의 과정은 크게 세 가지 정도로 나누어 볼 수 있는데, 첫 번째는 NMR spectrum 및 data processing 이고, 두 번째는 통계분석이고, 마지막으로는 대사경로 분석이다. 마지막 단계는 본 저널의 성격을 고려하여 생략한다. NMR 실험 이후 실행해야 할 위 첫 두 과정은, NMR data 분석에 익숙하지 않은 생물학 연구자들뿐만 아니라,

NMR 연구자들에게도 생소한 지식과 마주하게 할 것이다. 덧붙여서, 실험적 측면에서 NMR 기반 대사체학에서 주로 사용되는 1D ¹H presat-NOESY 또는 CPMG 실험은 매우 간단한 실험이다. 그러나 대사체 분석을 위해서는 실험 이후에 data processing 및 통계분석이 더 많은 비중을 차지하고 중요하다. 특히 통계 분석은 대사체학 연구에 쉽지 않은 장애물로 느껴지기 쉽다. 그래서 본 논문에서는 각 단계에 어떤 과정들이 있고 어떻게 수행하는지 간단히 살펴 보도록 하겠다.

NMR Spectrum Processing

NMR 기반 대사체학에서는 각 시료에 대하여 주로 1D ¹H Presat-NOESY 또는 1D ¹H Presat-CPMG 실험 방법으로 1D NMR spectrum 을 얻는다. 보통 동물 모델을 이용한 연구인 경우는 시료 수가 적게는 20 개 많게는 50 개인 경우가 대부분이다. 반면 사람을 대상으로 한 연구들은 그 대상이 적게는 50 명, 많게는 수천 명이 넘는 경우도 있다. 그래서 많은 spectrum 을 동시에 다룰 수 있거나 또는 processing 시간을 줄일 방법을 항상 염두에 두어야 한다. 그리고 spectrum processing 에

* Address 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

앞서 꼭 주의해야 할 것이 있다. 좋은 분석 결과를 얻기 위해서는 좋은 NMR spectrum 을 얻는 것이 필수 선제 조건이란 것이다. 이를 위해 확실한 water suppression 조건을 찾고, 좋은 shimming 을 위한 노력이 필요하다. 먼저 NMR spectrum processing 을 위한 zero-filing, window function multiplication, Fourier transformation, phase correction, baseline correction 등의 일련의 과정이 (Figure 1) NMR 연구자들에게는 익숙한 일일 것이다. 그럼에도 불구하고 각 단계에서 고려해야 할 것들을 간단하게 논의하고자 한다.

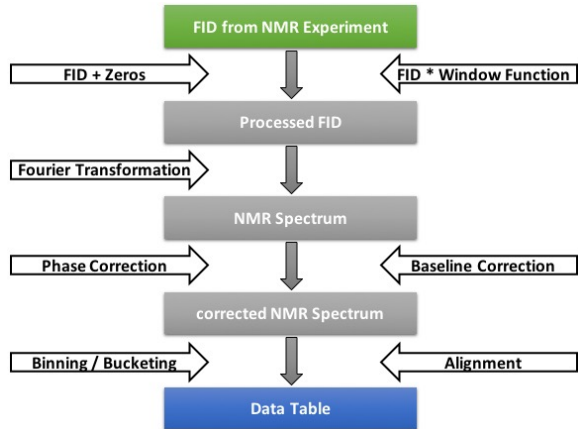


Figure 1. NMR spectrum processing and data processing procedures

Zero-filing

먼저 NMR 실험은 최종적으로 NMR spectrum 을 64K (64*1024) points 정도로 맞추는 것을 권장한다. 예를 들어, NMR 실험을 32K points 로 했다면 추가로 32K points 의 zero 값을 넣어 준다. 만약 NMR 실험을 64K points 로 했다면 zero-filing 은 생략하는 것이 좋다. 여기서 64K points 제안하는 것은 NMR spectrum deconvolution 또는 겹쳐져 있는 peak 들을 분석하기 위해서 적절한 분해능을 얻을 수 있기 때문이다. 단, zero-filing 을 많이 한다고 spectrum 의 해상도가 계속 높아지지는 않기 때문에 NMR 실험은 32K 또

는 64K data points 하는 것을 권장한다.

Window function

Window function 을 적절하게 사용하면 spectrum 분석이 쉽다. 주로 사용되는 window function 은 exponential, gaussian, sine, sine² function 등이 있다. 대부분의 경우, S/N (signal to noise ratio)를 높이면서도 적절한 해상도를 유지하기 위해서 exponential function 을 사용하고, LB (line broadening) 값은 보통 0.5 ~ 1.0 Hz 정도를 사용한다. 참고로, exponential function 은 LB 를 높이면 S/N 는 높아지지만, 해상도는 낮아진다.

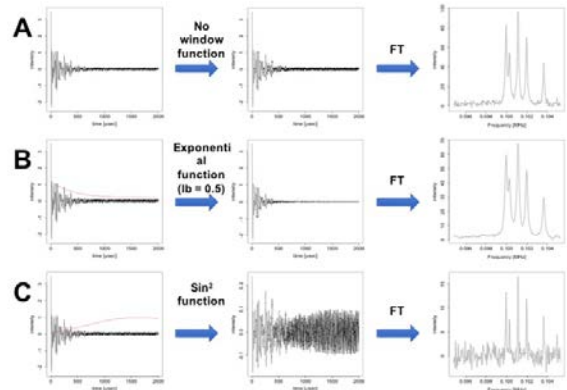


Figure 2. Window function multiplication effect.

Phase correction

Phase correction 은 peak 의 모양을 대칭적으로 정확하게 맞추는 것으로서, 앞에서 언급한 NMR spectrum deconvolution 또는 겹쳐져 있는 peak 들을 분석하기 위해서 중요한 일이다. 단, NMR 실험에 문제가 있었을 경우, 특히 water suppression 잘 안 되었을 때 또는 shim 이 좋지 않을 때, phase correction 이 힘든 경우가 있다. 그런 면에서 spectrum processing 에 앞서, 정확한 NMR 실험의 중요성을 여러 번 강조하는 것이 지나친 일은 아닐 것이다. Phase correction 은 보통 zero-order, 1st-order phase correction 을 통해서 조정한다. Zero-order correction 은

frequency 에 무관한 것으로 spectrum 전체 영역에서 phase 가 같은 정도로 틀어져 있는 경우 적용하게 된다 (Figure 3B). 그리고 1st-order phase correction 은 frequency 에 선형적으로 비례해서 phase 가 틀어져 있으면 적용하게 된다 (Figure 3C). 보통은 위 두 가지를 함께 적용해서 가장 이상적인 spectrum 모양을 만들게 된다 (Figure 3A).

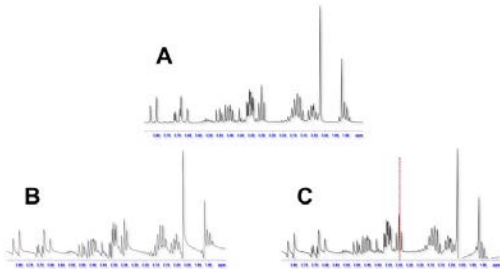


Figure 3. NMR spectrum phase correction

Baseline correction

Baseline correction 은 peak 의 바닥이라고 예상되는 부분과 noise 부분의 spectrum 을 zero level 에 맞추는 것인데, phase correction 못지않게 중요한 일이다. 왜냐하면 baseline correction 이 잘 못 된 경우, 다변량 분석을 할 때 이상치(outlier)가 될 수도 있기 때문이다. 한편, NMR 실험이 잘 되어 water suppression 이 잘 되고, baseline distortion 이 없다면, 모든 spectrum 을 명령어 하나로 간단하게 baseline correction 을 실행하는 것이 가능하지만 (Figure 4B, 4C), 그렇지 않다면 각 spectrum 마다 수동으로 수행해야 할 수도 있다 (Figure 4A).

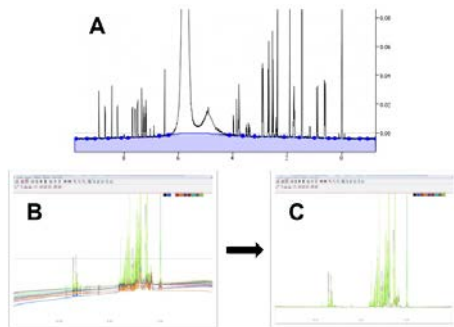


Figure 4. NMR spectrum baseline correction.

Data Processing

앞에서 언급한 각 NMR spectrum processing 과정은 NMR 연구자들에게는 익숙한 것일 것이다. 반면 spectrum alignment 와 binning (또는 bucketing)은 생소한 것일 수 있다.

Binning

앞선 NMR spectrum processing 과정을 통해서 이상적인 spectrum 을 얻은 후, 모든 spectrum 을 ASCII (American Standard Code for Information Interchange) 형식의 파일로 결과를 얻는다. 만약 결과 파일의 이름을 “spectrum table”이라고 한다면, spectrum table 에서 spectrum 의 resolution 을 낮추 것이 binning 이라고 할 수 있다. 방법적으로는 Figure 5 처럼 spectrum 에 구간(bin)을 나누고 각 구간마다 data points 의 평균값을 구하고, 그 평균값들로 새로 spectrum 을 만드는 것이다.

예를 들어 NMR 실험을 TD (Time Domain; number of raw data points) = 10,000 points, spectral width = 0.0 ~ 10.0 ppm 으로 실험을 하고, spectrum 을 0.05ppm 크기로 구간을 나누다면, 총구간(bin)의 개수는 200 (= (10 - 0)/0.05)가 될 것이다. 그리고 각 구간(bin)에 안에 있는 50 (= 10,000 / 200) 개의 data points 의 평균값을 구한다. 그 각 구간 평균값들로 새로운 spectrum 을 만든다. 결과적으로는 10,000 data points 또는 초기 0.001 ppm 의 solution 을 갖고 있던 spectrum 이 binning 을 통해서 200 data points 또는 0.05 ppm 의 resolution 을 갖는 spectrum 이 된 것이다.

Binning 을 하는 이유는 두 가지이다. 첫 번째는 다변량 분석의 초기 자료가 (raw data) 되는 spectrum table 의 data 크기를 줄이는 것이 목적이다. 예를 들어 설명하자면, 앞에서 언급한 zero-filing 후, NMR spectrum 이 10,000 data points 갖게 되었고, 함께 비교 분석해야 할 spectrum 이 50 개가 있다면,

spectrum table 은 $50 \times 10,000$ 크기의 행렬 (matrix)이 된다. 그러나 만약 binning 을 통해서 각 spectrum 을 200 points 로 줄였다면, spectrum table 은 50×200 크기의 행렬이 된다. Spectrum table 크기를 줄이는 이유는 다변량 분석의 계산의 어려움을 줄이기 위함이다. 그런데, 만약 사용하는 computer 의 성능만 우수하다면 spectrum table 크기는 별로 문제 되지 않는다.

Binning 을 하는 두 번째 이유는 다음 section 에서 설명할 alignment 과정을 생략하고자 하는 이유로 사용되기도 한다.

Binning 을 할 때 중요하게 고려해야 할 점이 있다. 바로 bin 크기이다. 만약 bin 크기가 너무 작으면 원래의 목적을 이룰 수 없고, 너무 크면 raw spectrum 의 정보를 많이 잃게 될 것이기 때문이다. Bin 크기는 보통 0.04 또는 0.005 ppm 정도를 택한다. 만약 bin 크기를 0.04 ppm 을 택하면, 꽤 많은 spectrum 정보를 잃게 된다. 그런데도 0.04 ppm 을 택하는 이유는 spectrum alignment 를 생략하고자 하는 경우이다. 드물지만, 시료에 따라 spectra 를 alignment 시키는 것이 힘든 경우가 있기 때문이다. 반면, spectrum alignment 를 하고자 할 경우는 bin 크기를 보통 0.005 ppm 정도로 사용한다.

다른 한편, binning 은 spectrum 전 영역에 동일한 bin 크기로 할 수 행할 수도 있고, 좀 더 영리하게는 spectrum 의 영역에 따라 peak 이 있는 부분 및 peaks 이 분리되는 부분들을 고려하여 수행할 수도 있다.

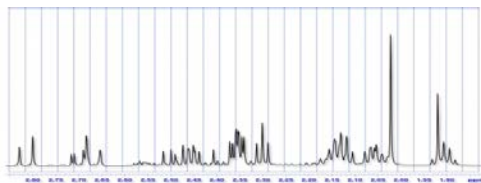


Figure 5. NMR spectrum binning

Spectrum alignment

Spectrum alignment 는 spectra 를 서로 비교 분석하기 위해서는 매우 중요한 processing 이다.

대사체학에 주로 사용되는 시료는 소변과 혈청 시료이다. 이들 시료는 일반적으로 사용되는 단일 화합물 시료와는 달리 많이 복잡하고 저분하다. 그래서 각 spectrum 마다 같은 대사물질이라고 할지라도 같은 peak 의 chemical shift(s) 가 조금씩 다른 경우가 대부분이다. 이를 보정해서 동일 대사물질의 chemical shift(s)는 같은 값을 가지도록 정렬하는 것이 spectrum alignment 이다.

Spectrum alignment 는 software 를 사용해야 하는데 많이 사용되는 소프트웨어는 icoshift¹, PECAN², COW³ 등이 있다.

한편 NMR 기반 대사체학은 1990 년도부터 본격적으로 활성화되어서 상대적으로 최신 학문이지만, 그 당시만해도 computer 의 성능이 지금에 비하면 상대적으로 많이 낮았기 때문에 data processing 의 첫 단계는 data size 를 줄이는 것이었다. 즉, binning 을 가장 먼저 했다. 그리고 그 뒤의 processing 을 진행했다. 그렇지만, 사실 spectrum alignment 를 가장 먼저 하는 것이 바람직하다. 왜냐하면, spectrum alignment 는 resolution 이 높을수록 더 정확한 결과를 얻을 수 있기 때문이다. 그래서 spectrum alignment 를 먼저 실행하고, binning 을 수행하는 것을 추천한다.

Normalization

앞에서 얻어진 spectrum table 은 $n \times m$ (n = the number of NMR spectra, m = the number of spectral points) 행렬 형태의 data 이다.

	빈수-1	빈수-2	빈수-3	빈수-m
시료-1									
시료-2									
시료-3									
⋮									
시료-n									

Figure 6. The format of raw data.

Figure 6 에서 ‘시료-1’, ‘시료-2’, ‘시료-n’ 행(row)은 각각 시료-1, 시료-2, 시료-n 의 NMR spectrum 을 m 개의 변수로 수치화하였음을 의미한다. 그리고 ‘변수-1’, ‘변수-2’, ‘변수-m’ 은 NMR spectrum 의 가로축의 첫 번째, 두 번째, m 번째 data point 에서 spectrum 의 높이 또는 intensity 값을 의미한다.

Spectrum 을 서로 비교하기 위해서는, 또는 행과 행의 data 를 비교하기 위해서는 표준화 과정이 필요하다. 왜냐하면, 대사물질의 농도가 시료마다 많은 차이가 날 수 있기 때문이다. 이 문제를 해결하기 위해서 spectrum table 에 대해서 normalization 을 수행하게 된다. 대표적인 방법으로는 ‘integral normalization’ 또는 ‘normalization to constant sum (CS)’⁴⁻⁹, probabilistic quotient normalization (PQN)¹⁰, histogram matching (HM)¹¹ 등이 있다. NMR 기반 대사체학 연구 초창기부터 지금까지 가장 보편적으로 사용되고 있는 것이 CS 방법이다. 그러나 몇몇 특정 대사물질의 농도가 상대적으로 아주 높은 경우에 CS 방법은 다변량 분석 결과를 왜곡시킬 수 있다. 그래서 그 대안으로 PQN 과 HM 방법이 제안되었는데, 이 중 HM 방법이 가장 효과적이라는 연구 결과가 있다.¹¹

Scaling

앞에서 기술한 일련의 과정을 통해서 얻은 spectrum table ($n \times m$)은 n 개의 spectrum 과 m 개의 spectral points 를 갖고 있는데, 이 m 개의 points 는 다변량 분석에서 m 개의 변수가 된다. 다변량 분석은 각 변수의 공분산(covariance) 계산을 통해서 $m \times m$ 공분산 행렬을 만드는 것으로 시작한다. 그래서 각 변수의 분산(variance) 값이 크면 더 많은 영향력을 미치게 되는데, 각각 변수는 특별한 이유가 없다면, 같은 영향력을 미치게 해야 하는 것이 좋다. 왜냐하면, 다변량 분석을 하는 이유 중의 하나가 어떤 변수가 중요한 변수인지를 찾는 것이기 때문이다.

각 변수가 같은 가중치를 갖게 하기 위해서, 각 변수를 그 변수의 표준편차로 나누어 주면 된다. 이는 모든 변수의 분산 값을 1 이 되게 만든다. 이를 UV (unit variance) scaling 이라고 한다. 실험적인 특성을 고려하지 않고 이론적으로만 생각할 경우, 모든 경우에 UV scaling 을 사용하는 것이 좋다. 그렇지만, NMR spectrum 에서 signal to noise ratio 가 낮은 부분에 해당되는 변수는 가중치를 줄여 주는 것이 더 바람직할 수도 있다. 이때 사용하는 대표적인 방법이 Pareto scaling 이다. 계산 방법은 각 변수를 그 변수의 표준편차의 이분의 일 승으로 나누어 주면 된다 (즉, 변수 / $\sqrt{\text{표준편차}}$). 보통 NMR spectra 의 다변량 분석의 경우는 보통 Pareto scaling 을 사용하는 경우가 많다. 이 외에도 Range scaling, Vast scaling, Level scaling 등이 있다.^{4,12,13}

Multivariate Analysis

Multivariate analysis 는 다변량 분석이라고 부른다. 다변량(multivariate)은 변량이 여러 개라는 의미인데, 여기서 변량은 종속변수(dependent variable)를 의미한다.

다변량 분석은 보통 비교해야 할 개체 수보다 수보다는 고려해야 할 변수의 수가 훨씬 많은 경우에 사용하는 분석 방법이다. 즉, Figure 6 에서 spectrum table 의 행의 개수 (n) 보다는 열의 개수 (m)가 상대적으로 매우 클 때 ($n \ll m$) 사용된다.

우리가 일반적으로 분석 하는 data 의 경우는 비교하고자 하는 변량 (variate or dependent variable)이 보통 하나인 경우가 많은데, 이를 univariate analysis (단변량 분석)이라고 한다. 이 경우는 $m = 1$ 이고, 대개 $n > 2$ 이다. 즉 $n > m$ 경우 이다.

다변량 분석은 크게 비지도 분석 (unsupervised analysis)과 지도 분석 (supervised analysis)으로 나눌 수 있다. 비

지도 분석의 의미는 분석 시 감독 또는 지도를 받지 않는다는 것이다. 계산 측면에서는 분석에 영향을 미칠 어떤 추가 정보도 이용하지 않았다는 것을 의미한다. 가장 대표적인 비지도 분석에는 주성분 분석 (PCA, Principal Component Analysis) 있다. 반면 지도 분석의 기본은 비지도 분석과 거의 같지만, 분석하고자 하는 자료 이외에 추가 정보를 이용하여 자료를 분석한다는 것이다. 지도 분석은 주로 판별 분석(discriminant analysis)에 많이 활용된다. 대표적인 지도 분석에는 (O)PLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis)가 있다.

Principal component analysis

PCA (주성분) 분석에는 두 가지 주요 목적이 있다. 그 중 첫 번째는 변수 (variable) 또는 변량 (variate)의 수를 줄이는 것이다. 이를 차원 축소 (dimension reduction)이라고도 한다. 변수를 줄이면 data의 차원이 낮아지기 때문이다. 예를 {x, y, z} 세 개의 변수로 data의 상태를 표현하는 경우 3 차원 data라고 하고, {x, y} 두 개의 변수로 data의 상태를 표현하는 경우 2 차원 data라고 한다.

변수의 개수를 줄여서 (또는 차원을 낮추어) 얻는 장점은 시각적으로 쉽게 data를 표현하고 분석할 수 있다는 것이다. 이런 이유로 보통 m 개의 변수에서 2, 3 개의 변수로 차원을 낮추어 분석한다.

PCA (주성분) 분석의 두 번째 주요 목적은 최대한의 정보를 새로운 변수에 담는 것이다. 대부분이 그렇듯이 얻는 것이 있으면 잃는 것도 있다. 차원 축소로 인해서 원본 data의 정보 (information)도 부분적으로 잃게 된다. 예를 들어, 10,000 개의 변수로 data를 표현하던 것을 2 개의 변수로 data를 표현하는 것은 특수한 경우를 제외 한다면 가능하지 않을 것이다. 주성분 (principle component)을 찾는다는 것은 원본 data의 정보를 최대한 담을 수 있는 새로운 변수 또는 성분을 찾는다는 것이다. 여

기서는 변수, 차원, 성분, 축을 모두 서로 같은 의미로 사용했다. 예를 들어 Figure 7에서 왼쪽이 원본 data라고 하자. 이 data는 두 개의 변수, 또는 두 개의 성분으로(XC1, XC2) 정보를 담고 있다. 임의의 수학적 계산을 통해서 figure 7에서 왼쪽과 같은 새로운 성분을(PC-1, PC-2) 찾았다고 하자. 두 그림의 차이를 보면 XC1과 XC2의 성분을 사용해서 data를 표현할 때는 XC1 성분과 XC2 성분 모두가 거의 동등하게 중요한데, PC1 성분과 PC2 성분으로 표현할 경우 PC2 성분은 상대적으로 훨씬 덜 중요한 성분이 된다.

왜냐하면, data가 PC2 성분은 크기의 변화가 거의 없기 때문이다. PC1 성분과 같이 기존의 여러 성분으로 표현되던 정보를 최대한 많이 담을 수 있는 새로운 성분을 주성분이라고 한다. 수학적으로는 spectrum table의 공분산 (covariance) 행렬을 구하고, 그 공분산 행렬의 고유벡터(eigenvector)를 구하면 된다. 즉 spectrum table의 공분산 행렬의 고유벡터가 주성분이 된다. 가장 큰 고유값(eigenvalue)을 갖는 고유벡터가 가장 많은 정보를 담을 수 있는 주성분이 된다. NMR spectra의 주성분 분석의 경우, 기존 1000 ~ 10,000 개 성분에서 새로운 2 ~ 3 개의 주성분으로 변환할 경우, 저자의 경험에 따르면 대개 원본 data의 정보의 10 ~ 60 % 정도를 담을 수 있다.

예를 들어 1000 개의 성분에서 새로운 2 개의 주성분으로 원본 data 정보의 40 % 정도를 담았다고 하자. 이 때 새로운 두 개의 주성분은 2 차원 그래프를 통해서 시각적으로 쉽게 표현될 수 있다. 이는 data 분석을 매우 직관적이고 쉽게 해 준다.

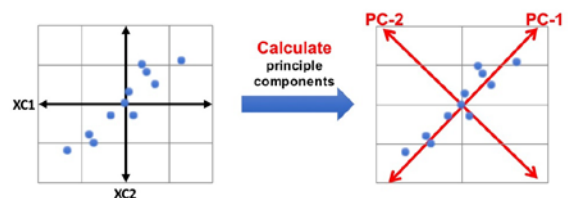


Figure 7. Calculation of principle components.

Scatter plot

PCA 분석의 대표적인 결과는 보통 두 개의 주성분을 이용해서 2 차원 그래프에서 각 spectrum 을 하나의 점으로 표시하는 것이다 (Figure 8). 그리고 Figure 8B 같이 점으로 data 를 표현하는 것을 scatter plot 이라고 한다. 예를 들어 Figure 8B 에서 녹색 둥근 점은 정상군의 혈액 시료이고 빨간색 세모 점은 질환군의 혈액 시료이다. 이처럼 scatter plot 은 정상군과 질환군 사이의 metabolic profile 에 차이가 있다는 것을 한눈에 파악할 수 있게 해 준다.

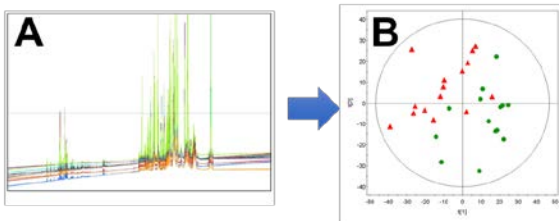


Figure 8. PCA scatter plot.

Loading plot

PCA 분석 후 scatter plot 을 통해서 그룹 간에 차이가 있다고 판단될 때, 어떤 변수 또는 peak 때문에 차이를 보이는지에 대한 정보를 얻을 수 있는 가장 기초적인 정보를 제공해 주는 것이 loading plot 이다. Loading 값은 주성분을 만드는데 기존 변수가 공헌한 정도를 말한다. 예를 들어서 0.5 ~ 20.5 ppm 영역을 가지는 spectrum 을 1.0 ppm 크기로 binning 을 했다면 총 20 개의 변수를 얻게 된다. 그리고 각각의 변수가 주성분을 만드는데 만약 Figure 9 처럼 공헌을 했다면, 3 과 10 ppm 근처에 있는 peak 이 주로 영향을 미쳤다는 것을 의미하게 된다.

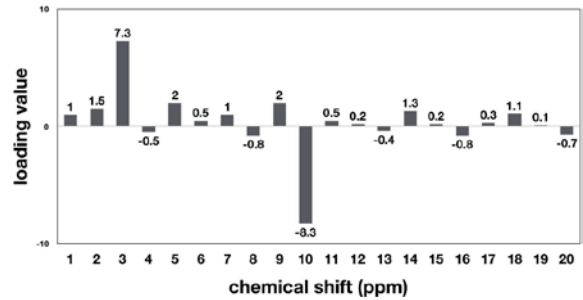


Figure 9. PCA loading plot.

결론 및 논의

대사체 연구에서 통계 분석은 중요한 비중을 차지하고 있다. 정확한 통계 분석을 위해서는 자료의 특성을 잘 고려하여 전처리를 하여야 한다. 이때 다양한 분석 방법과 여러 조건을 사용해 보면서 자료 및 분석 방법의 특성을 잘 파악하는 것이 중요하다. 다양한 대사체 자료에 매번 하나의 분석법과 하나의 조건으로 대사체를 분석한다면 잘못된 결론을 얻을 수도 있다. 이를 피하기 위해서 다양한 대사체 연구 논문들을 참고하는 것이 많은 도움이 될 것이다.¹⁴⁻¹⁸ 한편 대부분 연구자들에게 단변량 분석은 익숙하지만, 다변량 분석은 생소할 뿐만 아니라 그 개념을 정확하게 이해하기는 결코 쉽지 않다고 생각한다. 이 논문에서 충분히 다루지는 못했지만, 다변량 분석의 주성분 분석은 대사체 분석 외에도 다양한 분야에서 사용되고 있는 매우 유용한 분석법이다.

끝으로, 지난 두 편의 논문과^{19,20} 함께 이번 논문을 마무리하면서 꼭 강조하고 싶은 것이 있다. 대사체학의 연구 신뢰성을 높이기 위해서는 NMR 실험과 자료 및 통계 분석도 중요하지만 연구에서 가장 선행되는 실험 디자인을 비롯한 시료의 채취, 보관, 전처리가 매우 신중하게 관리되고 수행되어야 한다. 신중하게 얻은 신뢰할만한 시료, 정확한 실험, 섬세한 자료 분석은 이전에 보지 못한 정보들을 보게 해 줄 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2015년부터 2017년까지 이화여자대학교-한국기초과학연구원 간 학연공동연구센터 사업(DRC-14-1-KBSI)의 재정적 지원으로 진행되었다

References

1. A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **92**, 411 (1956)
2. K. H. Hausser and D. Stehlik, *Adv. Magn. Reson.* **127**, 79 (1968)
3. E. R. McCarney, B. D. Armstrong, R. Kausik, and S. Han, *Langmuir* **24**, 10062 (2008)
4. C. P. Poole, *Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques*, Dover Publications (1983)
5. S. I. Kwon, *PhD dissertation* "Multiferroic $\text{Ba}_{0.5}\text{Sr}_{1.5}\text{Zn}_2(\text{Fe}_{1-x}\text{Al}_x)_{12}\text{O}_{22}$ investigated by ^{57}Fe nuclear magnetic resonance" (2014)
6. B. D. Armstrong and S. Han, *J. Chem. Phys.* **127**, 104508 (2007)
7. J. M. Franck, A. Pavlova, J. A. Scott, and S. Han, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **74**, 33 (2013)
8. A. Doll, E. Bordignon, B. Joseph, R. Tschaggelar, and G. Jeschke, *J. Magn. Reson.* **222**, 34 (2012)
9. M. E. Bollard, E. G. Stanley, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, and E. Holmes, *NMR Biomed* **18**, 143 (2005)
10. F. Dieterle, A. Ross, G. Schlotterbeck, and H. Senn, *Anal. Chem.* **78**, 4281 (2006)
11. R. J. O. Torgrip, K. M. Åberg, E. Alm, I. Schuppe-Koistinen, and J. Lindberg, *Metabolomics* **4**, 114 (2008)
12. R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. van der Werf, *BMC Genomics* **7**, 1 (2006)
13. H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, H. Antti, M. E. Bollard, O. Beckonert, E. Holmes, J. C. Lindon, and J. K. Nicholson, *Anal. Chim. Acta* **490**, 265 (2003)
14. D. Yoon, M. Lee, S. Kim, and S. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **17**, 1 (2013)
15. 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)
16. S.-J. Hur, H.-W. Lee, A.-H. Shin, and S. J. Park, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **18**, 10 (2014)
17. D. Yoon, J. Choi, H. Choi, and S. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **20**, 13 (2016)
18. 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)
19. Y.-S. Jung, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 96 (2017)
20. Y.-S. Jung, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **22**, 10 (2018)