

Appendix I. Parameters for analysis of UPLC/ToF MS data by using MarkerLynx V4.1

MarkerLynx Method Editor - MixturesNew_Ando.mim	
Property	Value
Function	1
Initial Retention Time	2.00
Final Retention Time	7.50
Low Mass	0.00
High Mass	0.00
Mass Tolerance	0.05
Mass Tolerance Absolute?	<input checked="" type="checkbox"/> YES
Use relative retention time?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
<input type="checkbox"/> Apex Track Peak Parameters	
Peak Width at 5% Height (seconds)	<input checked="" type="checkbox"/> 15.00
Peak-to-Peak Baseline Noise	<input checked="" type="checkbox"/> 0.00
<input type="checkbox"/> Collection Parameters	
Masses per retention time	20
Minimum intensity (as a percentage of the BPI)	1.00
Mass window	0.05
Retention time window	0.20
Noise elimination level	<input checked="" type="checkbox"/> 6.00
Deisotope data?	<input checked="" type="checkbox"/> NO

Appendix 2. Clinical data of male rats treated with APAP

APAP mg/kg	Sample No.	Body g	Liver		Kidney (left)		Kidney (right)		Urine mL
			g	g%	g	g%	g	g%	
0	01M01	212	7.02	3.31	0.80	0.38	0.80	0.37	10.71
	01M02	207	6.91	3.34	0.76	0.37	0.77	0.37	11.82
	01M03	220	7.10	3.23	0.83	0.38	0.78	0.35	10.72
	01M04	205	6.65	3.24	0.70	0.34	0.71	0.34	11.03
	01M05	202	6.02	2.98	0.79	0.39	0.79	0.39	10.64
	Mean	209.2	6.739	3.219	0.777	0.371	0.767	0.367	10.984
	S.D.	6.8	0.434	0.142	0.049	0.018	0.035	0.017	0.491
100	02M01	215	6.89	3.21	0.77	0.36	0.78	0.36	11.33
	02M02	226	7.67	3.39	0.83	0.37	0.83	0.37	11.12
	02M03	220	7.49	3.40	0.79	0.36	0.77	0.35	11.88
	02M04	223	7.43	3.33	0.85	0.38	0.87	0.39	12.71
	02M05	219	7.51	3.43	0.84	0.39	0.81	0.37	10.75
	Mean	220.7 *	7.399 *	3.352	0.817	0.370	0.811	0.368	11.558
	S.D.	4.3	0.300	0.089	0.034	0.012	0.039	0.014	0.763
500	03M01	197	6.27	3.19	0.79	0.40	0.75	0.38	10.82
	03M02	193	5.98	3.11	0.72	0.37	0.73	0.38	12.90
	03M03	198	6.16	3.11	0.79	0.40	0.74	0.37	12.52
	03M04	204	6.50	3.19	0.84	0.41	0.80	0.39	14.02
	03M05	208	6.55	3.15	0.77	0.37	0.76	0.37	15.81
	Mean	199.8	6.291	3.149	0.780	0.391	0.755	0.378	13.214 *
	S.D.	6.1	0.235	0.041	0.045	0.019	0.026	0.009	1.851
800	04M01	185	6.32	3.41	0.69	0.37	0.66	0.36	14.91
	04M02	193	7.00	3.63	0.78	0.41	0.73	0.38	14.73
	04M03	189	6.83	3.61	0.73	0.38	0.74	0.39	15.91
	04M04	201	6.81	3.39	0.82	0.41	0.78	0.39	12.33
	04M05	207	7.05	3.41	0.83	0.40	0.08	0.04	12.11
	Mean	194.9 **	6.803	3.492 **	0.770	0.395	0.598	0.310	13.998 **
	S.D.	8.6	0.290	0.119	0.059	0.015	0.291	0.152	1.686

Significantly different from control (APAP 0 mg/kg) group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett's test)

Appendix 3. Serum chemistry profile of male rats treated with APAP

APAP mg/kg	Sample No.	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T.BIL mg/dL	T.CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	T.PRO g/dL	ALB g/dL
0	01M01	94	30	1252	0.00	48	33	157	5.7	2.6
	01M02	120	51	1278	0.00	50	60	158	5.9	2.7
	01M03	100	31	1127	0.00	50	59	153	5.8	2.6
	01M04	109	38	1198	0.00	46	82	165	5.7	2.6
	01M05	108	37	1078	0.00	54	24	166	6.1	2.8
	Mean	106.2	37.4	1186.6	0.000	49.6	51.6	159.8	5.84	2.66
S.D.	9.86	8.38	83.83	0.0000	2.97	23.22	5.54	0.167	0.089	
100	02M01	113	49	1224	0.00	49	49	144	5.6	2.6
	02M02	92	33	1297	0.00	51	49	152	5.7	2.6
	02M03	80	36	1286	0.00	54	78	166	5.7	2.6
	02M04	101	36	1252	0.00	54	70	142	5.6	2.6
	02M05	92	36	1296	0.00	52	55	151	5.8	2.6
	Mean	95.6	38.0	1271	0.000	52.0	60.2	151	5.68	2.6
S.D.	12.26	6.28	32.00	0.0000	2.12	13.14	9.43	0.084	0.000	
500	03M01	101	48	1114	0.01	49	73	140	5.6	2.5
	03M02	297	142	1029	0.00	52	24	135	6.0	2.8
	03M03	310	199	1192	0.02	54	36	145	6.0	2.7
	03M04	113	55	1103	0.03	52	65	141	5.8	2.7
	03M05	146	74	1158	0.03	53	36	159	5.9	2.7
	Mean	193.4	103.6	1119.2	0.018	52.0	46.8	144	5.86	2.68
S.D.	101.95	65.01	61.71	0.0130	1.87	21.04	9.11	0.167	0.110	
800	04M01	1439	755	1260	0.05	45	98	142	5.9	2.7
	04M02	4300	2540	1353	0.06	65	25	150	6.3	2.9
	04M03	12410	6135	1292	0.11	66	26	127	5.9	2.8
	04M04	1218	778	1467	0.05	50	32	156	5.9	2.7
	04M05	2665	1279	1317	0.05	50	25	151	5.7	2.6
	Mean	4406.4 *	2297.4 *	1337.8 **	0.064 **	55.2	41.2	145.2	5.94	2.74
S.D.	4638.77	2264.44	79.85	0.0261	9.63	31.89	11.34	0.219	0.114	

APAP mg/kg	Sample No.	GLB g/dL	A/G	UN mg/dL	CRE mg/dL	Ca mg/dL	IP mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L
0	01M01	3.1	0.84	14.5	0.31	10.6	7.13	144	4.2	104
	01M02	3.2	0.83	17.1	0.32	10.7	7.15	145	4.8	104
	01M03	3.2	0.80	15.4	0.29	10.8	7.13	143	4.5	104
	01M04	3.1	0.85	17.6	0.33	10.8	7.07	143	4.6	104
	01M05	3.4	0.82	17.6	0.30	10.5	6.90	145	5.1	104
	Mean	3.200	0.828	16.44	0.310	10.68	7.076	144.0	4.64	104.0
S.D.	0.1225	0.0192	1.412	0.0158	0.130	0.1029	1.00	0.336	0.00	
100	02M01	3.1	0.84	15.2	0.32	10.7	6.56	142	4.5	104
	02M02	3.1	0.86	16.3	0.30	10.8	6.86	143	4.5	104
	02M03	3.1	0.84	16.9	0.30	10.9	6.92	145	4.6	103
	02M04	3.1	0.84	15.1	0.31	11.0	7.41	142	4.6	103
	02M05	3.2	0.79	17.5	0.28	10.9	7.65	144	4.6	104
	Mean	3.120	0.834	16.2	0.302	10.86	7.080	143.2	4.56	103.6
S.D.	0.0447	0.0261	1.049	0.0148	0.114	0.4411	1.30	0.055	0.55	
500	03M01	3.0	0.84	19.9	0.32	10.6	8.19	144	4.5	104
	03M02	3.3	0.85	18.1	0.29	10.6	9.25	147	4.6	100
	03M03	3.3	0.84	16.7	0.31	10.4	8.06	146	4.2	106
	03M04	3.1	0.85	17.6	0.29	10.5	8.41	145	4.4	104
	03M05	3.2	0.84	18.4	0.3	10.8	8.90	146	4.2	103
	Mean	3.180	0.844	18.14	0.302	10.58	8.562 **	145.6	4.38	103.4
S.D.	0.1304	0.0055	1.176	0.0130	0.148	0.5003	1.14	0.179	2.19	
800	04M01	3.1	0.87	18.8	0.32	10.5	9.55	143	4.7	100
	04M02	3.4	0.86	18.9	0.32	10.6	8.30	146	3.8	98
	04M03	3.1	0.91	21.1	0.34	10.0	7.50	143	4.0	103
	04M04	3.1	0.88	18.3	0.30	10.3	8.75	143	4.2	101
	04M05	3.0	0.87	18.8	0.33	10.2	8.23	144	5.0	105
	Mean	3.140	0.878 **	19.18 **	0.322	10.32 **	8.466 **	143.8	4.34	101.4
S.D.	0.1517	0.0192	1.099	0.0148	0.239	0.7537	1.30	0.498	2.70	

Significantly deferent from control (APAP 0 mg/kg) group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett's test)

Appendix 4. A list of metabolite peaks up-regulated in the urine of the male rat treated with APAP

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg	
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P
40	3.4096	102.0544	4.2994	3.3539	2.18	0.2702	1.91	0.0823	2.72	0.0369
101	3.1146	109.0923	1.2426	1.4876	0.97	0.9719	3.19	0.0350	4.40	0.0385
229	2.3770	120.0754	1.7923	0.2855	1.01	0.9343	1.49	0.0184	1.70	0.0004
234	4.6190	124.0803	8.2642	2.0678	0.97	0.9412	1.82	0.0130	0.91	0.8740
235	4.8510	124.0803	5.3674	1.8869	0.99	0.9889	1.87	0.0280	0.53	0.4310
280	3.6064	392.2298	11.0117	2.6403	1.42	0.2409	1.19	0.4643	1.88	0.0307
296	2.0286	128.1026	2.1350	0.3156	1.29	0.0911	1.44	0.0018	1.84	0.0009
330	4.9236	130.0989	0.7062	0.9224	2.43	0.3928	2.79	0.1686	3.55	0.0097
332	3.1047	130.1548	0.6379	0.7605	3.52	0.0066	2.90	0.0225	1.88	0.2329
338	3.0936	396.1683	0.5317	0.6139	2.72	0.1857	8.00	0.1210	9.85	0.0003
362	2.0323	132.0973	4.1200	0.4776	1.26	0.1284	1.39	0.0007	1.71	0.0021
409	3.6839	402.2285	1.7594	2.0529	1.28	0.7773	6.47	0.0111	10.71	0.0007
412	3.4332	403.1628	1.0263	0.6902	1.84	0.0626	1.78	0.0693	2.20	0.0356
434	4.3168	403.2390	3.6112	0.7522	0.93	0.8889	1.50	0.0668	1.61	0.0233
437	3.4134	404.2356	3.0856	4.1798	1.07	0.9422	3.50	0.0824	5.50	0.0069
447	3.1127	405.2435	0.7035	0.8129	0.51	0.5453	2.92	0.1440	5.01	0.0008
489	4.4255	144.9827	6.5294	4.4101	0.82	0.6970	0.89	0.8217	2.12	0.0193
496	2.6800	407.2285	4.0049	1.6419	2.07	0.0274	1.94	0.0817	2.88	0.0094
503	2.6811	408.2315	0.9898	0.7473	2.32	0.0504	1.68	0.3894	3.01	0.0111
505	3.5745	408.2766	7.3000	1.0581	1.38	0.0113	3.41	1.6E-06	4.07	0.0107
584	4.1649	152.0548	3.5312	0.2619	0.92	0.2652	1.67	0.0040	1.78	0.0012
635	4.3194	420.2622	3.7607	0.4399	0.88	0.7893	1.55	0.0331	1.42	0.0193
644	2.0297	156.1010	2.3232	0.1990	1.24	0.1392	1.41	0.0003	1.65	0.0009
654	2.4272	161.0821	0.3056	0.3544	1.33	0.6713	2.47	0.0540	2.75	0.0294
671	2.4837	423.0704	1.1496	0.3838	1.10	0.6846	1.56	0.0463	1.09	0.8259
697	2.6438	425.2696	0.5844	0.1317	0.79	0.7322	0.52	0.4364	2.01	0.0002
711	2.3782	166.0873	1.5901	0.2003	0.80	0.5094	1.58	0.0005	1.79	0.0066
741	3.4184	169.0994	0.7059	0.8156	1.09	0.9162	2.78	0.0265	3.11	0.0139
786	3.5738	435.1328	2.3424	2.7695	3.77	0.3489	3.26	0.1568	3.41	0.0288
806	2.6882	173.1000	0.8802	0.6884	0.76	0.7112	2.12	0.0350	2.33	0.0262
807	3.1186	173.1183	8.4130	4.1957	1.09	0.7998	2.34	0.0202	2.50	0.0028
812	2.3155	174.1156	1.8666	2.1929	1.93	0.3301	8.15	0.0009	7.65	0.0003
857	2.3365	443.2496	0.5275	0.6190	0.97	0.9680	3.05	0.0274	6.44	0.0027
993	2.5149	186.1151	3.8774	4.6185	1.13	0.8883	3.40	0.0081	2.16	0.4349
1043	4.7951	464.3720	4.6281	0.8728	0.89	0.7435	1.42	0.0082	1.60	0.0014
1057	3.1160	190.1457	1.8749	1.4745	1.01	0.9912	2.48	0.0423	3.44	0.0460
1082	3.5535	473.2376	5.7874	0.8821	0.85	0.6418	1.28	0.0168	1.62	0.0076
1107	3.6038	475.2498	16.9984	3.2270	1.02	0.9013	1.51	0.0034	1.24	0.1233
1144	3.2174	479.1710	7.3168	2.4835	1.74	0.0170	1.57	0.0634	1.47	0.0620
1217	2.4835	200.1021	1.7522	0.4634	0.93	0.8599	1.48	0.0371	1.53	0.0161
1220	3.4924	200.1316	4.1849	0.8038	0.94	0.8527	1.70	0.0004	1.99	0.0009
1254	3.5305	201.1163	7.6408	0.8461	1.18	0.1479	2.10	0.0285	2.66	0.0349
1281	3.6292	202.1483	3.3063	4.0519	1.41	0.6163	3.03	0.0415	3.11	0.0280
1323	2.4415	205.1457	1.6293	1.8876	1.13	0.8854	2.96	0.0217	3.18	0.0197
1332	2.1792	517.1843	8.1993	2.9823	1.63	0.0172	2.76	0.0028	1.32	0.3063
1396	2.1918	537.0661	1.7071	1.9771	0.62	0.6738	3.16	0.0311	2.92	0.0183
1420	2.3538	211.1338	1.2876	2.0407	1.41	0.7305	4.05	0.0275	0.51	0.6251
1443	2.0330	212.0789	2.7629	0.5639	1.20	0.1441	1.50	0.0069	1.67	0.0103
1448	2.8090	213.0928	0.9861	0.7328	2.10	0.2428	4.22	0.0002	4.25	0.0008
1449	3.4349	213.1151	5.6341	0.8997	1.10	0.4212	1.52	0.0028	1.57	0.0057
1487	2.0281	215.1415	10.2056	0.7296	1.28	0.1022	1.49	1.6E-05	1.76	4.8E-05
1512	3.3154	216.1241	0.3807	0.4396	1.27	0.7879	4.32	0.0044	4.48	0.0080
1541	2.9338	218.1232	6.4620	2.3758	0.77	0.5090	3.51	0.0001	3.47	0.0002
1546	2.3511	219.1244	11.2301	2.5073	1.11	0.5487	1.51	0.0481	1.69	0.0754
1568	2.3519	220.1266	0.7106	0.8587	1.54	0.5249	2.58	0.0596	3.00	0.0411
1569	3.5075	220.1397	66.0974	26.2289	1.17	0.5283	2.26	0.0026	2.23	0.0031
1576	3.5086	221.1447	8.1754	2.5279	1.20	0.4066	2.36	0.0022	2.18	0.0023
1583	3.3145	222.1139	1.6171	1.9727	1.26	0.7955	3.88	0.0051	4.01	0.0092
1602	3.5827	222.1454	5.6855	0.5249	1.03	0.7189	1.49	0.0104	1.57	0.0070
1620	2.1865	586.2206	5.5499	4.5605	2.02	0.1277	6.32	0.0007	3.11	0.0450
1701	4.6490	226.0158	2.3124	2.7757	1.04	0.9644	2.81	0.0432	3.07	0.0229
1857	2.4851	235.1390	1.4150	0.5804	1.06	0.9043	1.76	0.0343	1.68	0.0221

Colored column shows peak up-regulated significantly (fold change > 1.5, P < 0.05).

Appendix 4. Continued

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg	
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P
1878	2.1849	664.1351	2.0484	2.4478	0.54	0.5927	4.16	0.0122	2.49	0.0878
2091	3.6423	246.1603	9.0910	1.6033	1.01	0.9341	1.57	0.0058	1.64	0.0112
2112	2.6491	247.1083	2.1469	1.4318	1.21	0.7080	1.91	0.0394	2.22	0.0223
2120	3.7008	248.1612	19.8518	3.0849	1.16	0.2549	1.93	0.0085	2.12	0.0030
2122	2.1773	249.0795	17.8432	6.0180	1.35	0.1189	2.53	0.0077	1.55	0.0376
2127	3.7283	249.1737	3.1002	0.6014	1.18	0.1937	1.72	0.0417	1.94	0.0074
2145	2.1764	250.0955	1.5461	1.8132	1.49	0.6772	3.67	0.1221	2.78	0.0422
2275	3.4695	257.1421	0.2146	0.2526	5.31	0.2562	11.90	1.1E-05	12.15	0.0001
2336	3.5084	261.1654	8.6939	2.3329	1.25	0.2954	2.30	0.0012	2.26	0.0003
2369	2.4851	264.1643	4.8234	1.0589	0.93	0.8559	3.06	0.0007	3.36	0.0017
2459	2.4354	270.0817	0.6235	0.7235	0.47	0.5060	11.80	0.0713	28.23	0.0145
2468	3.5215	271.1215	3.0881	0.4126	0.82	0.5564	2.10	0.0006	2.18	0.0214
2481	3.7249	272.1737	3.5075	0.8295	1.13	0.5224	2.12	0.0007	2.23	0.0011
2500	3.8021	274.1850	11.4070	8.6952	1.53	0.2367	1.88	0.0747	2.04	0.0449
2510	2.0692	276.1302	16.3004	6.3425	1.15	0.5811	1.56	0.0383	1.74	0.0536
2516	2.0586	277.1317	1.5132	1.7979	1.04	0.9607	3.15	0.0204	1.96	0.4970
2522	2.4419	278.1428	5.5365	6.5513	1.08	0.9319	4.30	0.0020	4.28	0.0021
2531	2.4222	279.1508	0.6449	0.7506	1.52	0.5454	5.49	0.0005	4.93	0.0722
2611	2.2887	286.0754	5.3382	0.1820	1.09	0.6079	1.40	0.0723	2.05	0.0322
2637	3.6875	288.2232	3.8777	0.6834	1.39	0.0454	1.23	0.0737	1.56	0.0078
2644	3.7208	289.1958	3.9243	1.1893	1.21	0.3057	2.17	0.0068	2.53	0.0029
2652	3.4614	290.1813	7.5052	2.0947	1.17	0.4982	2.66	0.0005	2.84	0.0009
2669	3.5191	292.2012	2.5572	1.8626	0.89	0.8678	2.23	0.0247	2.53	0.0096
2677	2.1767	293.1272	4.4629	0.5101	1.76	0.0129	1.33	0.5417	1.23	0.0979
2717	3.8177	298.1824	0.8600	0.9958	0.97	0.9722	2.59	0.0402	2.43	0.2029
2740	2.1802	302.1310	26.3944	1.4237	1.14	0.2231	2.64	0.0157	1.56	0.1254
2741	3.1789	302.1509	6.6203	0.2544	1.02	0.5196	1.89	0.0081	2.30	0.0526
2749	2.1846	303.1331	3.3397	2.3542	1.19	0.7478	3.36	0.0021	1.89	0.1217
2758	3.4295	304.1594	6.6369	2.2592	1.13	0.5751	2.56	0.0033	2.85	0.0075
2761	3.1270	304.2173	3.6003	0.7316	1.28	0.0650	2.11	0.0008	2.53	0.0002
2787	3.6884	307.2000	15.0851	4.4862	1.29	0.3469	2.27	0.0037	1.30	0.1188
2809	3.6078	310.2026	4.1168	2.8086	0.81	0.7633	4.96	0.0007	4.72	0.0001
2823	3.6905	312.2144	4.6823	0.6668	1.11	0.4178	1.91	0.0014	2.10	0.0007
2853	4.4729	315.3410	8.7058	0.5977	1.19	0.0380	1.41	0.0002	1.69	2.4E-05
2858	3.5987	316.1977	4.9247	3.3665	1.33	0.4808	2.66	0.0058	2.57	0.0060
2859	2.7784	316.2124	3.2702	2.2872	1.23	0.6833	1.95	0.0644	1.97	0.0407
2861	2.0576	316.2131	1.9315	0.2929	0.92	0.8163	1.74	0.0068	1.87	0.0273
2864	3.7768	316.2288	2.6247	1.7722	1.36	0.3461	1.66	0.1982	2.41	0.0176
2984	3.7499	332.1468	9.1305	2.6854	0.99	0.9567	1.80	0.0076	1.75	0.0505
2987	4.3781	332.2829	1.5784	1.8243	1.41	0.6140	2.70	0.0400	2.79	0.0509
3071	2.9300	344.2070	0.6150	0.7208	0.47	0.5063	3.68	0.0060	3.87	0.0042
3075	2.1874	345.1308	1.3107	1.5303	2.81	0.1794	10.90	0.0011	5.25	0.0255
3082	3.3169	346.2239	0.6377	0.7414	1.32	0.7523	2.36	0.2227	3.85	0.0091
3088	2.0281	347.2181	3.6904	0.4054	1.57	0.0391	1.99	5.2E-06	2.54	0.0043
3106	2.3054	350.0870	2.0232	1.8153	2.39	0.0566	3.69	0.0073	3.98	0.0028
3151	3.6261	356.2459	5.6724	7.1114	3.08	0.0182	1.72	0.3457	1.53	0.4760

Colored column shows peak up-regulated significantly (fold change > 1.5, $P < 0.05$).

Appendix 5. A list of metabolite peaks down-regulated in the urine of the male rat treated with APAP

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg	
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P
5	4.1399	100.0640	1.0846	0.0979	0.80	0.5227	0.64	0.1954	0.00	0.0002
59	2.7281	375.0288	2.5031	0.6243	0.50	0.1703	0.26	0.0028	0.22	0.0059
98	3.9332	107.0516	0.6091	0.0879	0.00	0.0008	1.07	0.3857	0.23	0.0173
115	4.7947	379.3697	7.5409	0.5419	0.59	0.1322	0.66	0.0004	0.50	3.3E-05
117	2.9615	380.0366	15.5816	2.2215	0.43	0.0701	0.35	0.0033	0.24	0.0004
122	2.9639	381.0389	3.3533	0.8047	0.68	0.2525	0.35	0.0087	0.22	0.0015
127	2.9686	382.0381	2.0987	0.1765	0.94	0.4948	0.37	0.0031	0.18	0.0003
137	4.8870	114.0744	11.3861	3.5334	0.04	0.0010	0.67	0.1304	0.57	0.1906
189	2.7587	387.2013	8.3607	1.7507	0.38	0.0450	0.23	0.0036	1.09	0.6279
210	2.7518	388.2063	1.7171	0.5188	0.42	0.0890	0.12	0.0036	1.15	0.4779
246	4.2208	390.3047	1.4555	0.1564	0.20	0.0075	0.43	0.1026	0.24	0.0487
369	4.2223	399.2510	3.5432	0.4435	0.40	0.0451	0.41	0.0542	0.61	0.1130
374	2.8026	400.1558	2.0228	0.3822	1.08	0.4573	0.25	0.0044	0.00	0.0018
389	3.6415	135.1153	9.3922	0.9154	1.10	0.4074	0.75	0.0045	0.62	0.0022
394	2.0395	139.0367	7.3338	0.7600	0.99	0.9261	0.43	4.7E-05	0.46	0.0012
419	3.8892	140.0210	1.0257	0.2604	0.21	0.0191	0.50	0.1698	0.71	0.3237
436	3.5037	404.1939	11.4613	1.5515	1.05	0.6463	0.68	0.0048	0.64	0.0095
441	3.7606	405.1122	2.1518	0.1489	1.23	0.0072	0.35	0.0494	0.00	0.0001
464	2.1172	405.2474	17.1809	0.6820	1.08	0.4364	0.49	0.0001	0.60	0.0008
470	2.1161	406.2431	5.5954	0.2884	1.07	0.2118	0.00	3.8E-05	0.14	0.0078
479	2.1443	407.2283	3.6115	0.8065	0.55	0.2424	0.00	0.0029	0.92	0.8365
526	2.1593	149.0852	8.5187	0.4910	1.10	0.3411	0.66	0.0004	0.76	0.0051
533	4.6841	409.2860	6.5043	0.4063	0.96	0.3709	0.61	0.1569	0.00	0.0001
539	3.6183	410.1832	105.9906	16.3059	1.19	0.1692	0.67	0.0227	0.62	0.0576
599	2.1441	415.2546	8.6355	0.9499	1.07	0.4181	0.39	4.2E-05	0.41	0.0005
600	3.7770	415.3922	1.7839	0.2717	0.50	0.1411	0.00	0.0010	0.00	0.0010
601	2.7267	416.0540	2.5340	0.3985	0.46	0.1034	0.15	0.0004	0.19	0.0012
604	2.0781	417.1206	3.7062	2.0399	0.46	0.1624	0.00	0.0359	0.13	0.0290
613	2.0365	153.0533	12.9141	1.1238	0.97	0.6749	0.38	0.0001	0.45	0.0005
614	2.8474	153.0895	2.6874	0.3035	0.50	0.1862	0.00	0.0004	0.00	0.0004
666	2.1137	422.2762	5.7231	0.5828	1.15	0.4281	0.50	0.0278	0.64	0.0006
717	3.3814	167.1082	2.6672	0.5307	1.03	0.9328	0.45	0.0323	0.37	0.0144
742	3.1832	169.1235	2.5640	0.1469	0.80	0.5214	0.33	0.0396	0.34	0.0450
744	3.5620	169.1272	2.5082	0.3205	0.24	0.0238	0.00	0.0006	0.00	0.0006
753	4.6738	429.2431	20.7215	3.5481	0.98	0.8310	0.67	0.0343	0.65	0.0228
762	2.1428	432.2817	25.4010	1.8619	0.94	0.3221	0.47	1.5E-05	0.46	0.0009
766	2.1459	433.2856	5.5038	0.7010	0.93	0.3659	0.45	0.0002	0.45	0.0022
819	3.8456	438.3620	0.8648	0.0755	0.45	0.1267	0.00	0.0002	0.00	0.0002
843	3.1167	176.0729	37.9922	4.7031	1.30	0.0956	0.67	0.0088	0.66	0.0027
863	3.5531	445.1168	12.3916	1.3329	0.86	0.6745	0.59	0.0004	0.64	0.1316
870	3.1168	177.0792	5.0169	1.0251	1.32	0.0916	0.66	0.0265	0.62	0.0145
878	2.0396	180.0672	8.3300	1.0153	1.01	0.9075	0.44	0.0002	0.50	0.0021
884	3.5537	446.1213	2.8110	0.3327	0.90	0.7815	0.00	0.0005	0.50	0.1861
885	2.2060	446.2609	7.8936	0.4795	0.68	0.2644	0.22	0.0001	0.31	0.0011
894	2.2188	447.2632	1.7564	0.0970	0.68	0.2482	0.00	4.6E-05	0.00	4.6E-05
910	2.0466	181.0945	2.2541	0.4800	0.79	0.4888	0.00	0.0026	0.16	0.0049
935	2.3811	182.1304	23.9768	2.7256	0.96	0.7413	0.47	0.0003	0.45	0.0020
956	2.1452	453.2131	2.9114	0.4203	1.24	0.0498	0.00	0.0008	0.00	0.0008
960	2.3054	183.1086	3.4181	0.6159	0.93	0.6157	0.44	0.0271	0.81	0.2007
975	4.5937	186.0124	3.6272	0.3335	0.67	0.2454	0.39	0.0704	0.00	0.0002
987	4.7953	457.2734	3.2607	0.2831	0.70	0.2951	0.16	0.0021	0.39	0.0683
1005	3.1774	187.1336	4.0540	0.2868	1.14	0.1831	0.00	0.0001	0.35	0.0533
1010	2.1132	459.1696	5.7924	1.2541	1.23	0.2660	0.58	0.0269	0.65	0.0437
1011	2.3920	459.2797	4.5781	0.7236	1.09	0.3733	0.38	0.0036	0.40	0.0011
1029	4.4699	188.9613	21.2886	3.6815	0.55	0.0028	0.42	0.0057	0.29	0.0033
1060	4.4741	190.9610	19.4812	3.4013	0.57	0.0044	0.44	0.0008	0.30	0.0032
1078	2.2205	471.5423	1.4681	0.0668	0.75	0.3958	0.16	0.0119	0.22	0.0383
1112	2.3925	476.3063	19.1175	2.3356	1.02	0.7941	0.36	0.0001	0.36	0.0001
1119	2.3929	477.3090	4.3467	0.6538	1.03	0.7539	0.39	0.0002	0.40	0.0007
1122	2.3590	195.0671	2.0848	0.2335	1.09	0.5525	0.00	0.0004	0.00	0.0004
1151	4.3739	481.1620	3.3660	0.5232	0.73	0.3726	0.28	0.0497	0.00	0.0010
1154	2.0429	196.0632	40.2200	2.8576	1.06	0.4946	0.56	4.5E-05	0.62	0.0002

Colored column shows peak down-regulated significantly (fold change < 0.67, P < 0.05).

Appendix 5. Continued

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg	
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P
1156	3.1772	196.1040	25398	03457	0.51	0.1906	0.30	0.0013	0.58	0.4284
1159	2.0414	197.0678	4.7538	05933	1.07	0.4532	0.59	0.0016	0.70	0.0049
1169	2.1719	482.2054	8.3736	1.4356	0.98	0.9355	0.18	0.0055	0.25	0.0046
1174	2.7327	486.0457	1.5371	02681	0.43	0.0756	0.00	0.0014	0.16	0.0035
1178	3.2657	487.2188	7.6893	08745	1.36	0.0436	0.21	0.0009	0.26	0.0038
1182	2.8860	489.0792	1.3294	00774	0.74	0.3617	0.21	0.0062	0.00	0.0001
1202	2.9708	490.0513	1.2600	0.1424	1.01	0.8142	0.32	0.0136	0.00	0.0004
1206	2.4532	490.2863	4.2131	0.1928	0.78	0.4626	0.31	0.0057	0.46	0.0077
1208	2.9705	491.0533	2.6551	02269	0.80	0.5063	0.46	0.0157	0.39	0.0040
1219	2.0673	200.1306	2.1476	03291	1.16	0.3559	0.00	0.0010	0.35	0.0231
1256	3.1831	201.1508	2.8806	02500	1.09	0.2296	0.66	0.0003	0.51	0.0647
1267	2.3967	497.2383	1.3478	02273	1.01	0.9881	0.00	0.0013	0.00	0.0013
1291	2.8493	204.0707	2.3830	06651	1.33	0.1126	0.90	0.5676	0.58	0.0321
1306	4.1719	508.4516	1.3414	0.1503	0.41	0.0829	0.16	0.0029	0.15	0.0019
1314	3.6657	204.1766	7.0550	0.4657	0.89	0.1713	0.79	0.0065	0.46	0.0382
1324	3.1824	205.1460	2.7464	03163	1.32	0.0071	0.59	0.0006	0.47	0.0198
1352	4.4889	207.1625	3.0499	00280	0.24	0.0487	0.89	0.0558	0.99	0.7949
1360	3.8439	522.3077	1.8438	06592	1.37	0.1973	0.00	0.0113	0.09	0.0037
1371	2.8063	533.2627	3.8029	1.0814	1.31	0.1683	0.00	0.0059	0.07	0.0012
1375	2.6823	534.3133	2.9533	0.4770	0.99	0.9089	0.17	0.0006	0.34	0.0035
1377	2.1132	208.1347	6.7174	03364	1.07	0.3051	0.67	0.0020	0.76	0.0038
1383	2.0372	209.1201	4.7764	06332	0.96	0.5750	0.62	0.0053	0.57	0.0037
1419	3.7024	211.1336	3.7565	05590	0.59	0.3154	0.00	0.0009	0.00	0.0009
1452	3.6210	213.1568	4.0266	1.6372	0.83	0.6456	0.19	0.0252	0.00	0.0161
1461	2.8035	550.2888	3.2329	1.1937	1.32	0.2519	0.00	0.0123	0.00	0.0123
1480	3.5842	214.1478	2.16210	1.3388	0.96	0.5526	0.39	4.3E-06	0.42	0.0007
1486	3.5692	215.1360	10.4709	1.7149	0.85	0.1510	0.58	0.0041	0.51	0.0016
1498	2.9602	558.0681	1.4954	0.1706	0.75	0.4133	0.00	0.0004	0.00	0.0004
1516	3.6550	216.1638	20.5382	3.8346	1.06	0.7050	0.42	0.0012	0.49	0.0137
1518	3.1221	217.1001	3.0328	05659	1.32	0.1859	0.60	0.0184	0.13	0.0016
1530	2.8510	565.2525	3.2794	05981	1.05	0.7115	0.00	0.0016	0.06	0.0001
1567	4.2598	576.3609	5.0112	1.5310	0.89	0.7493	0.98	0.9432	0.19	0.0050
1622	2.1418	586.3120	2.6720	0.2411	1.23	0.0773	0.00	0.0002	0.00	0.0002
1653	4.3086	591.4317	2.2466	02509	0.48	0.1573	0.55	0.2594	0.00	0.0004
1662	3.2606	597.2203	16.8524	3.8868	1.36	0.0818	0.61	0.0192	0.59	0.0349
1709	2.7289	226.1580	13.2231	2.0140	0.40	0.0465	0.36	0.0032	0.40	0.0221
1739	2.7374	227.1575	2.4861	0.4911	0.83	0.5763	0.15	0.0007	0.31	0.0238
1748	3.2634	615.2546	12.5001	2.3887	1.06	0.6039	0.70	0.0288	0.63	0.0102
1763	3.1825	228.1617	3.4567	02530	1.18	0.0849	0.61	0.0003	0.50	0.0630
1769	3.5164	229.1480	2.1921	0.3739	1.13	0.2326	0.83	0.7322	0.60	0.0219
1771	3.7138	229.1465	8.7417	0.1370	1.03	0.5060	0.79	3.6E-05	0.67	0.0063
1792	3.2558	230.1411	9.2692	0.4361	1.22	0.0609	0.49	1.1E-06	0.50	0.0004
1794	3.7656	230.1782	21.6012	1.3395	0.93	0.6773	0.41	3.2E-06	0.45	0.0024
1805	2.7982	232.0998	1.9350	0.0909	1.11	0.0599	0.17	0.0152	0.39	0.0742
1807	2.3902	232.1595	1.5392	0.1336	0.53	0.2159	0.00	0.0002	0.00	0.0002
1839	2.1640	235.0985	3.8515	0.7245	1.13	0.2790	0.46	0.1155	0.46	0.0238
1856	3.8402	235.1346	3.3626	0.3709	1.05	0.4622	0.10	0.0003	0.15	0.0019
1863	3.4879	236.1689	8.4142	0.4801	1.04	0.7421	0.45	1.8E-05	0.44	3.0E-05
1890	4.1346	237.2312	5.8236	0.7188	0.64	0.0095	0.65	0.0079	0.56	0.0019
1896	2.7313	239.0580	1.9440	0.1443	0.54	0.2432	0.13	0.0007	0.25	0.0025
1900	3.1187	239.1407	24.8603	1.4537	1.18	0.0715	0.53	1.8E-05	0.53	0.0931
1924	3.1134	240.1464	3.8266	0.4930	1.13	0.2486	0.25	0.0033	0.38	0.0381
1925	2.8515	240.1468	4.0271	0.2849	0.49	0.1779	0.56	0.0001	0.59	0.0082
1927	2.0824	241.0962	17.1823	2.9255	1.14	0.3182	0.56	0.0123	0.75	0.0645
1931	4.3804	241.2306	2.3881	0.2336	0.20	0.0229	1.02	0.6992	0.00	0.0003
1954	3.6198	242.1134	7.6905	1.3223	0.95	0.6543	0.37	0.0362	0.48	0.0284
2060	2.9319	245.2105	1.4153	0.1624	0.77	0.4822	0.17	0.0033	0.52	0.2127
2147	3.7103	250.1518	5.9493	1.4445	0.72	0.3450	0.55	0.0139	0.63	0.0447
2149	4.1336	250.2395	2.0789	0.3800	0.68	0.2448	0.73	0.1136	0.47	0.0262
2158	2.1690	252.0889	5.4360	0.1585	0.79	0.5051	0.00	6.8E-06	0.82	0.2754
2179	2.1009	252.1734	1.7430	0.2362	1.07	0.5934	0.00	0.0007	0.27	0.0055
2181	2.8469	253.1120	2.5197	0.2427	0.54	0.2422	0.46	0.0167	0.56	0.1105

Colored column shows peak down-regulated significantly (fold change < 0.67, P < 0.05).

Appendix 5. Continued

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg	
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P
2183	3.8347	253.1478	31.5830	3.0753	1.02	0.7347	0.62	0.0006	0.49	0.0015
2185	3.8063	253.1545	13.5019	2.9418	0.70	0.0419	0.13	0.0007	0.42	0.0051
2209	2.2189	254.0674	3.3883	0.2659	0.79	0.4863	0.11	0.0002	0.00	0.0001
2211	3.5331	254.0908	3.2452	0.5621	0.84	0.6041	0.00	0.0014	0.00	0.0014
2213	3.8395	254.1508	4.9859	0.6896	1.05	0.5444	0.62	0.0026	0.50	0.0052
2241	3.5899	255.1706	5.9069	0.2389	0.86	0.3228	0.30	0.0265	0.00	1.8E-05
2243	2.4635	255.1947	2.4834	0.6270	0.43	0.0880	0.33	0.0076	0.34	0.0079
2247	2.7634	256.0974	2.4351	0.2271	0.64	0.2097	0.28	0.0005	0.30	0.0010
2249	2.4008	256.1543	4.6073	0.2061	1.19	0.0518	0.62	4.3E-05	0.56	0.0003
2254	2.3442	257.0661	2.3811	0.2373	1.19	0.0833	0.26	0.0033	0.18	0.0042
2261	4.6734	819.5168	22.8484	4.8438	0.87	0.3996	0.58	0.0268	0.58	0.0433
2263	4.6726	820.5209	11.0458	2.0481	0.92	0.5070	0.24	0.0246	0.22	0.0184
2277	2.5157	257.1506	2.6058	0.0912	0.56	0.1701	0.30	0.0054	0.27	0.0217
2279	3.6508	257.1845	8.7345	1.1984	1.06	0.6649	0.26	0.0045	0.55	0.0044
2299	3.2632	839.2454	5.8022	1.3552	1.13	0.4346	0.16	0.0048	0.30	0.0155
2345	2.0699	263.1508	13.8966	0.8321	1.10	0.0406	0.63	2.7E-05	0.61	0.0002
2351	2.7017	264.1270	6.0349	0.4878	1.15	0.0775	0.41	1.8E-05	0.40	0.0004
2368	3.7910	264.1632	6.0321	1.9492	1.24	0.2859	0.46	0.0293	0.52	0.0402
2375	2.8472	265.1197	5.4406	0.3512	0.91	0.2306	0.30	0.0006	0.11	0.0002
2381	3.7721	265.1778	2.3916	0.3219	1.15	0.2834	0.15	0.0019	0.26	0.0044
2382	3.5078	266.0514	6.3569	2.2239	0.86	0.7110	0.00	0.0106	0.00	0.0106
2410	2.7983	267.1368	64.1077	3.5892	1.22	0.0327	0.41	1.3E-06	0.41	0.0002
2411	3.6902	267.1716	18.2998	4.1761	0.42	0.0716	0.00	0.0031	0.07	0.0003
2428	3.2622	949.2433	10.0446	3.2299	1.01	0.9390	0.68	0.1196	0.53	0.0352
2436	3.5129	268.1595	4.2609	0.3459	0.46	0.1351	0.40	0.0797	0.16	0.0118
2437	2.8013	268.1421	10.3915	0.5833	1.13	0.1695	0.36	1.8E-06	0.35	2.4E-05
2445	3.7561	269.1398	50.0708	1.7636	1.22	0.0554	0.65	3.3E-05	0.72	0.0004
2447	3.5811	269.1484	11.7596	0.8083	0.51	0.2009	0.38	0.0038	0.50	0.0003
2454	3.5374	986.8456	3.3450	1.0412	0.23	0.0311	1.18	0.7099	0.35	0.1425
2458	2.0991	270.0813	19.0373	1.2509	1.21	0.1076	0.26	0.0003	0.00	0.0001
2466	2.1135	271.0769	2.9082	0.2671	1.24	0.1852	0.00	0.0002	0.00	0.0002
2497	2.4018	274.0760	1.5992	0.1768	1.03	0.7945	0.59	0.0012	0.44	0.0132
2509	2.4743	276.0907	1.3305	0.1926	0.67	0.2074	0.00	0.0008	0.00	0.0008
2511	3.5605	276.1784	3.2277	0.2619	0.45	0.1219	0.00	0.0001	0.00	0.0001
2553	2.7164	280.1186	1.3900	0.3463	1.12	0.5191	0.18	0.0103	0.40	0.0694
2560	2.0610	280.1771	15.0117	0.4178	1.02	0.5527	0.54	2.0E-07	0.48	2.8E-05
2573	3.7408	281.1767	6.6671	2.1054	1.35	0.0794	0.53	0.0569	0.51	0.0325
2575	2.0608	281.1823	2.0988	0.1731	0.94	0.3412	0.00	0.0002	0.00	0.0002
2578	3.4367	282.1538	3.3331	0.5146	1.22	0.3644	0.66	0.0116	0.61	0.1458
2589	2.8447	283.1338	24.2920	1.2405	0.97	0.6474	0.63	0.0003	0.64	0.0574
2594	4.3960	283.2810	4.0853	0.4974	0.18	0.0053	0.26	0.0618	0.22	0.0133
2598	3.5512	284.1527	10.7794	2.4891	0.86	0.3100	0.20	0.0010	0.00	0.0032
2641	2.8087	289.1173	2.7785	0.3102	1.17	0.1496	0.59	0.0014	0.65	0.0405
2645	4.3483	289.2380	2.2566	0.2121	0.41	0.0865	0.23	0.0430	0.21	0.0305
2648	2.5358	290.1074	6.8331	0.2376	0.81	0.5421	0.89	0.0412	0.57	0.0343
2651	3.6465	290.1456	13.8191	2.1305	1.21	0.1508	0.67	0.0323	0.84	0.2558
2657	3.8148	291.1149	2.9175	0.4795	1.18	0.2480	0.34	0.0216	0.49	0.0625
2659	2.0882	291.1401	1.5074	0.2658	1.19	0.2179	0.00	0.0015	0.51	0.1747
2661	2.4624	291.2176	10.0792	1.4491	0.76	0.4061	0.36	0.0046	0.41	0.0004
2667	3.6681	292.1586	4.5100	1.2221	1.08	0.6891	0.00	0.0051	0.19	0.0137
2670	2.4596	292.2210	1.8285	0.2645	0.70	0.2773	0.24	0.0027	0.00	0.0008
2686	2.1999	294.1442	3.7600	0.0578	0.94	0.8584	0.00	1.0E-06	0.30	0.0316
2699	4.0659	297.1449	1.3298	0.1865	1.25	0.0469	0.79	0.0407	0.37	0.0342
2700	2.0652	297.1460	9.0690	0.3033	0.94	0.8577	0.17	0.0034	0.35	0.0325
2701	2.3290	297.1460	28.4044	2.4185	1.12	0.2019	0.62	0.0015	0.59	0.0166
2702	3.1835	297.1461	22.1560	1.8580	1.18	0.0701	0.41	1.5E-05	0.37	0.0043
2706	3.6020	297.1626	10.8875	0.6600	1.11	0.3815	0.18	0.0002	0.22	0.0006
2715	3.1830	298.1494	4.1244	0.4264	1.10	0.2111	0.39	0.0001	0.34	0.0035
2718	4.1685	298.2185	5.3825	0.4751	0.90	0.2898	0.57	0.0055	0.47	0.0008
2733	2.0625	301.1064	4.2140	0.3115	1.18	0.0134	0.61	0.0001	0.66	0.0040
2737	2.1220	301.2126	24.3075	0.9795	0.99	0.9089	0.43	5.1E-06	0.39	0.0048
2744	2.1340	302.2128	4.7833	0.1637	1.02	0.7125	0.24	0.0122	0.23	0.0090

Colored column shows peak down-regulated significantly (fold change < 0.67, P < 0.05).

Appendix 5. Continued

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg	
			Average	S.D.	Fold change	<i>P</i>	Fold change	<i>P</i>	Fold change	<i>P</i>
2754	2.2550	303.2281	5.0869	3.4778	0.64	0.5037	0.56	0.2927	0.11	0.0467
2767	2.8196	305.0990	2.8406	0.3827	1.13	0.3945	0.40	0.0002	0.50	0.0088
2773	3.5861	305.2375	7.2103	0.8974	1.10	0.3935	0.55	0.0598	0.35	0.0209
2777	3.4859	306.1738	6.4287	0.2971	1.11	0.3634	0.65	0.0036	0.72	0.0560
2779	2.6848	306.2298	1.5162	0.3053	0.94	0.6162	0.00	0.0022	0.14	0.0027
2780	4.4127	306.2912	11.1571	1.4688	0.65	0.0263	1.07	0.4609	0.96	0.7006
2793	4.1698	308.1990	22.8686	1.0374	0.87	0.3636	0.49	0.0291	0.45	0.0001
2796	2.4621	308.2447	3.4845	0.4890	0.72	0.3177	0.30	0.0013	0.36	0.0001
2802	3.6060	309.1826	5.2449	0.4116	0.81	0.5427	0.00	0.0001	0.00	0.0001
2803	2.6026	309.1909	1.1385	0.1703	0.51	0.2180	0.00	0.0009	0.00	0.0009
2804	4.1733	309.2024	3.6948	0.3667	0.70	0.3114	0.45	0.0290	0.37	0.0034
2813	2.1360	311.1093	3.8448	0.4670	1.10	0.2790	0.48	0.0024	0.49	0.0017
2814	3.7041	311.1514	5.1038	0.3014	0.81	0.5446	0.65	0.0001	0.49	0.0546
2824	4.1711	312.2314	6.9718	0.6533	1.08	0.4739	0.27	0.0694	0.00	0.0002
2833	2.4633	313.1980	1.3752	0.2298	0.75	0.3797	0.51	0.0463	0.24	0.0223
2841	2.3306	314.1728	2.8757	0.3811	1.13	0.1094	0.00	0.0006	0.00	0.0006
2849	4.1344	315.1955	2.3403	0.4947	1.37	0.1056	0.00	0.0025	0.29	0.0626
2875	3.7035	318.1313	7.2899	1.0800	0.74	0.3418	0.33	0.0024	0.22	0.0019
2882	2.3504	319.1371	5.8024	0.4204	1.32	0.0290	0.56	0.0010	0.57	0.0030
2883	3.5614	319.1700	3.1084	0.1561	0.50	0.1855	0.25	0.0581	0.00	3.5E-05
2891	2.1538	320.1792	3.8133	0.2408	1.12	0.3391	0.65	0.0002	0.68	0.0035
2916	2.7213	324.1914	1.2646	0.0724	1.19	0.0297	0.00	0.0001	0.00	0.0001
2925	3.5027	325.1462	4.4339	0.2730	0.62	0.3685	0.00	0.0001	0.21	0.0309
2935	3.7094	326.1969	13.4411	2.1070	0.78	0.3911	0.58	0.0754	0.56	0.0181
2950	3.6863	328.1236	3.9444	0.4234	0.54	0.2333	0.19	0.0058	0.68	0.2571
2953	3.1026	328.2120	22.5205	3.6826	1.14	0.2137	0.12	0.0009	0.11	0.0007
2963	3.1003	329.2149	4.3015	0.8669	1.16	0.2521	0.00	0.0022	0.16	0.0046
2967	4.1836	330.1799	2.5802	0.2636	0.85	0.2020	0.56	0.0085	0.50	0.0034
2971	4.2111	330.2641	2.7499	0.3361	0.44	0.1159	0.45	0.1274	0.21	0.0123
2975	2.3090	331.2227	1.5905	0.1610	0.81	0.5310	0.00	0.0003	0.00	0.0003
2977	2.0557	332.0334	3.1716	0.5498	0.96	0.7645	0.11	0.0008	0.13	0.0013
3009	3.6488	334.1392	13.9861	0.6852	0.91	0.3058	0.06	4.6E-07	0.09	3.6E-07
3011	2.7937	335.0272	11.7232	2.9430	1.03	0.8521	0.56	0.0370	0.51	0.0181
3019	2.8012	336.0280	1.8269	0.6009	1.32	0.2898	0.21	0.0080	0.17	0.0121
3022	2.5030	336.1426	1.7137	0.3563	0.83	0.5983	0.44	0.0229	0.64	0.0370
3027	2.1579	337.1439	3.3506	0.1002	1.08	0.2519	0.39	0.0203	0.29	0.0236
3060	4.2508	343.1657	3.0748	0.6358	0.49	0.1439	0.63	0.1989	0.24	0.0258
3064	4.1380	344.1042	2.0103	0.3312	0.68	0.0089	0.51	0.0412	0.45	0.0187
3074	3.6324	345.1043	7.2191	1.4702	0.96	0.7208	0.24	0.0051	0.19	0.0020
3077	4.2183	345.2464	9.4726	1.3364	0.36	0.0259	0.30	0.0101	0.29	0.0075
3084	4.2175	346.2516	1.9956	0.3197	0.39	0.0457	0.16	0.0037	0.14	0.0018
3122	3.1147	353.0690	4.0555	1.2207	1.13	0.5631	0.51	0.0263	0.11	0.0029
3135	4.1709	354.2411	6.6154	0.2739	0.90	0.3778	0.52	0.0380	0.49	0.0003
3182	2.6825	360.1616	1.8930	0.2138	1.01	0.9068	0.11	0.0004	0.47	0.0224
3183	4.2138	360.1818	5.8834	0.5675	0.42	0.0990	0.42	0.1060	0.14	0.0011
3190	4.2113	361.1861	1.2495	0.0974	0.50	0.1900	0.32	0.1280	0.00	0.0001
3245	4.1384	368.1050	2.0029	0.2963	0.35	0.0254	0.64	0.0037	0.45	0.0174

Colored column shows peak down-regulated significantly (fold change < 0.67, *P* < 0.05).

Appendix 6. A list of metabolite peaks correlated with Log ALT in the urine of the male rat treated with APAP

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg		Spearman's rank correlation coefficient (P < 0.05)
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P	
84	3.5142	376.2722	2.1208	2.4496	0.57	0.6133	1.86	0.3542	2.66	0.0605	0.6912
101	3.1146	109.0923	1.2426	1.4876	0.97	0.9719	3.19	0.0350	4.40	0.0385	0.8632
121	4.4005	380.3385	11.2364	2.5042	0.98	0.9557	1.40	0.0735	1.44	0.0134	0.5809
133	4.8325	113.0652	0.7931	0.9622	1.57	0.6219	3.41	0.1176	3.07	0.1498	0.5706
180	2.3442	385.1861	3.7096	1.8298	0.99	0.9708	1.35	0.6512	2.12	0.1653	0.5074
190	3.4142	387.2018	3.5072	5.4292	1.16	0.8928	1.55	0.7171	4.44	0.0598	0.6794
194	3.7778	116.0669	0.4144	0.4823	0.45	0.4207	1.64	0.4610	1.78	0.4131	0.6765
229	2.377	120.0754	1.7923	0.2855	1.01	0.9343	1.49	0.0184	1.70	0.0004	0.7221
241	3.4815	390.1904	1.1964	1.3846	0.51	0.5474	2.19	0.1025	2.39	0.0611	0.6721
249	3.4326	391.1086	2.9401	0.3820	0.86	0.1177	1.12	0.2473	1.17	0.0670	0.6779
296	2.0286	128.1026	2.1350	0.3156	1.29	0.0911	1.44	0.0018	1.84	0.0009	0.7926
298	2.4023	129.0889	3.2116	2.3216	1.29	0.4835	1.88	0.0594	1.74	0.1304	0.6191
330	4.9236	130.0889	0.7062	0.9224	2.43	0.3928	2.79	0.1686	3.55	0.0097	0.5162
338	3.0936	396.1683	0.5317	0.6139	2.72	0.1857	8.00	0.1210	9.85	0.0003	0.8074
362	2.0323	132.0873	4.1200	0.4776	1.26	0.1284	1.39	0.0007	1.71	0.0021	0.7162
390	4.4324	136.0206	2.1095	1.4186	0.61	0.4488	1.03	0.9521	1.35	0.3787	0.5691
409	3.6839	402.2285	1.7594	2.0529	1.28	0.7773	6.47	0.0111	10.71	0.0007	0.9015
412	3.4332	403.1628	1.0263	0.6902	1.84	0.0626	1.78	0.0693	2.20	0.0356	0.6574
414	2.6603	403.1957	0.7657	0.8967	1.36	0.7339	0.88	0.8879	2.77	0.1601	0.5824
434	4.3168	403.239	3.6112	0.7522	0.93	0.8889	1.50	0.0668	1.61	0.0233	0.6250
437	3.4134	404.2356	3.0856	4.1798	1.07	0.9422	3.50	0.0824	5.50	0.0069	0.8426
447	3.1127	405.2435	0.7035	0.8129	0.51	0.5453	2.92	0.1440	5.01	0.0008	0.8412
489	4.4255	144.9827	6.5294	4.4101	0.82	0.6970	0.89	0.8217	2.12	0.0193	0.6285
496	2.68	407.2285	4.0049	1.6419	2.07	0.0274	1.94	0.0817	2.88	0.0094	0.6397
503	2.6811	408.2315	0.9898	0.7473	2.32	0.0504	1.68	0.3894	3.01	0.0111	0.6059
505	3.5745	408.2766	7.3000	1.0581	1.38	0.0113	3.41	0.0000	4.07	0.0107	0.8221
581	4.3828	152.0486	17.4509	0.6625	0.81	0.5405	1.40	0.0004	1.41	0.0000	0.7603
584	4.1649	152.0548	3.5312	0.2619	0.92	0.2652	1.67	0.0040	1.78	0.0012	0.7603
590	4.379	152.5504	3.0854	0.2528	0.74	0.3968	1.26	0.0145	1.26	0.0012	0.7191
611	4.3803	153.0466	6.9649	0.2428	1.13	0.2630	1.43	0.0152	1.38	0.0000	0.7574
633	2.3685	420.2245	0.6185	0.8298	0.46	0.5332	1.82	0.5945	2.53	0.3405	0.5103
635	4.3194	420.2622	3.7607	0.4399	0.88	0.7893	1.55	0.0331	1.42	0.0193	0.5985
636	4.7923	420.3226	4.6695	0.3959	0.72	0.3276	1.04	0.3704	1.04	0.4507	0.5897
644	2.0297	156.101	2.3232	0.1990	1.24	0.1392	1.41	0.0003	1.65	0.0009	0.7309
654	2.4272	161.0821	0.3056	0.3544	1.33	0.6713	2.47	0.0540	2.75	0.0294	0.7353
661	2.3588	422.0634	0.5888	0.6946	0.00	0.1839	1.68	0.4600	1.63	0.4753	0.5897
694	4.4024	424.365	9.3448	2.4646	0.84	0.6867	1.43	0.0866	1.48	0.0138	0.5426
697	2.6438	425.2696	0.5844	0.1317	0.79	0.7322	0.52	0.4364	2.01	0.0002	0.5250
711	2.3782	168.0873	1.5901	0.2003	0.80	0.5094	1.58	0.0005	1.79	0.0066	0.7044
741	3.4184	169.0894	0.7059	0.8156	1.09	0.9162	2.78	0.0265	3.11	0.0139	0.8574
751	2.4112	170.1092	2.1500	1.8911	0.89	0.8569	1.69	0.3783	1.68	0.3902	0.5456
765	2.4961	433.2072	0.6584	0.7818	1.60	0.5491	3.31	0.0908	3.48	0.0800	0.6382
777	4.4315	171.1027	1.2744	1.4773	0.90	0.9023	2.10	0.1543	1.08	0.9291	0.5500
786	3.5738	435.1328	2.3424	2.7695	3.77	0.3489	3.26	0.1568	3.41	0.0288	0.5838
802	3.9376	172.1688	0.7202	0.8359	1.26	0.7872	1.75	0.3975	2.38	0.0980	0.5721
806	2.6882	173.1	0.8802	0.6894	0.76	0.7112	2.12	0.0350	2.33	0.0262	0.8176
807	3.1186	173.1183	8.4130	4.1957	1.09	0.7998	2.34	0.0202	2.50	0.0028	0.8015
812	2.3155	174.1156	1.8666	2.1929	1.93	0.3301	8.15	0.0009	7.65	0.0003	0.8147
832	4.6498	174.1297	5.9893	0.7499	1.07	0.4203	1.27	0.1055	1.22	0.0257	0.5426
857	2.3365	443.2436	0.5275	0.6190	0.97	0.9680	3.05	0.0274	6.44	0.0027	0.9338
869	3.9361	177.056	7.6888	0.4708	0.85	0.6325	1.07	0.1055	1.14	0.0061	0.5162
897	4.3993	181.0177	6.3122	0.5141	1.08	0.4239	1.27	0.0103	1.48	0.0001	0.8191
993	2.5149	186.1151	3.8774	4.6185	1.13	0.8883	3.40	0.0081	2.16	0.4349	0.5941
1017	3.3889	461.2323	0.4073	0.4717	0.47	0.4986	0.48	0.5125	2.24	0.2380	0.5044
1043	4.7951	464.372	4.6281	0.8728	0.89	0.7435	1.42	0.0082	1.60	0.0014	0.8721
1050	3.3978	466.1716	1.2605	1.6065	1.00	0.9993	1.69	0.3382	2.61	0.1147	0.5456
1057	3.116	190.1457	1.8749	1.4745	1.01	0.9912	2.48	0.0423	3.44	0.0460	0.7882
1064	3.7852	191.167	3.7948	0.6388	1.10	0.3573	1.29	0.0195	1.28	0.0219	0.6682
1071	2.7006	193.0831	0.8395	0.9792	1.15	0.8712	0.71	0.7664	2.44	0.0544	0.5471
1082	3.5535	473.2376	5.7874	0.8821	0.85	0.6418	1.28	0.0168	1.62	0.0076	0.8250
1094	2.8266	193.1618	0.6970	0.8272	1.37	0.7339	1.55	0.5248	2.72	0.0823	0.6162
1107	3.6038	475.2498	16.9984	3.2270	1.02	0.9013	1.51	0.0034	1.24	0.1233	0.5221
1160	2.9198	197.0836	2.3526	0.4826	0.98	0.8767	1.25	0.0670	1.32	0.0947	0.7191
1192	2.4736	199.1059	16.2347	5.0361	0.91	0.8147	1.38	0.0913	1.38	0.0786	0.5485
1199	4.4646	199.1837	7.3602	0.6780	0.87	0.0776	1.06	0.3331	0.99	0.8408	0.5074
1217	2.4835	200.1201	1.7522	0.4634	0.93	0.8599	1.48	0.0371	1.53	0.0161	0.6888
1220	3.4924	200.1316	4.1849	0.8038	0.94	0.8527	1.70	0.0004	1.99	0.0009	0.8838

Colored column shows peak up-regulated significantly (fold change > 1.5, P < 0.05) by treatment with APAP.

Appendix 6. Continued

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg		Spearman's rank correlation coefficient (P < 0.05)
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P	
1225	4.1393	200.2071	33.0909	3.1781	1.05	0.4532	1.15	0.0525	1.17	0.0232	0.6397
1252	2.3522	201.1137	9.6403	2.4404	1.10	0.6239	1.43	0.0559	1.73	0.0520	0.7074
1254	3.5305	201.1163	7.6408	0.8461	1.18	0.1479	2.10	0.0285	2.66	0.0349	0.8132
1259	4.139	201.2117	45.726	0.4327	1.06	0.4105	1.09	0.2080	1.22	0.0399	0.5868
1277	4.3146	502.3764	5.0479	0.8823	0.72	0.3667	1.14	0.2983	1.23	0.0848	0.5397
1281	3.6292	202.1483	3.3063	4.0519	1.41	0.6163	3.03	0.0415	3.11	0.0280	0.7941
1297	4.7947	503.3879	3.8602	2.6340	0.98	0.9698	1.56	0.2001	1.46	0.2745	0.6294
1303	4.7924	506.388	3.7726	0.1849	0.67	0.2437	1.07	0.0761	1.05	0.3076	0.6721
1312	4.1772	204.1423	6.4421	0.7393	1.00	0.9491	1.05	0.4172	1.21	0.0345	0.7750
1319	2.0811	205.1045	2.2643	2.6150	0.59	0.6381	2.50	0.3749	2.50	0.2871	0.5838
1323	2.4415	205.1457	1.6293	1.8876	1.13	0.8854	2.96	0.0217	3.18	0.0197	0.8426
1358	2.3821	208.0989	17.1608	1.3933	1.14	0.0605	1.44	0.0044	1.47	0.0006	0.7368
1378	3.8053	208.193	0.9438	0.6348	0.36	0.2408	1.62	0.1609	1.14	0.7988	0.5632
1380	3.9366	209.0839	1.0178	0.1301	0.69	0.2488	1.05	0.5747	1.09	0.2514	0.5603
1396	2.1918	537.0661	1.7071	1.9771	0.62	0.6738	3.16	0.0311	2.92	0.0183	0.7191
1418	4.4298	211.126	11.1884	0.5530	0.86	0.0637	1.03	0.5703	1.04	0.3107	0.5456
1443	2.033	212.0789	2.7629	0.5639	1.20	0.1441	1.50	0.0069	1.67	0.0103	0.8574
1448	2.809	213.0928	0.9861	0.7328	2.10	0.2428	4.22	0.0002	4.25	0.0008	0.7912
1449	3.4349	213.1151	5.6341	0.8997	1.10	0.4212	1.52	0.0028	1.57	0.0057	0.7632
1454	3.939	213.1982	3.2063	2.7725	0.44	0.3088	1.57	0.2986	1.57	0.2841	0.6441
1462	3.265	551.0825	5.7503	0.4286	0.98	0.7215	1.15	0.0117	1.10	0.1135	0.7132
1466	2.1605	552.3246	2.2965	1.5463	0.70	0.5883	1.32	0.5884	1.11	0.8405	0.5544
1487	2.0281	215.1415	10.2056	0.7296	1.28	0.1022	1.49	0.0000	1.76	0.0000	0.8015
1512	3.3154	216.1241	0.3807	0.4396	1.27	0.7879	4.32	0.0044	4.48	0.0060	0.8221
1519	2.4787	217.1088	15.1352	4.4039	1.00	0.9953	1.42	0.0440	1.41	0.0517	0.5338
1538	4.0228	217.1762	2.2099	0.7677	0.42	0.1154	0.85	0.6755	1.25	0.2404	0.7088
1541	2.9338	218.1232	6.4620	2.3758	0.77	0.5090	3.51	0.0001	3.47	0.0002	0.8044
1546	2.3511	219.1244	11.2301	2.5073	1.11	0.5487	1.51	0.0481	1.69	0.0754	0.6662
1568	2.3519	220.1266	0.7106	0.8587	1.54	0.5249	2.58	0.0596	3.00	0.0411	0.7647
1569	3.5075	220.1397	66.0974	26.2289	1.17	0.5283	2.26	0.0026	2.23	0.0031	0.7515
1576	3.5086	221.1447	8.1754	2.5279	1.20	0.4066	2.36	0.0022	2.18	0.0023	0.7544
1583	3.3145	222.1139	1.6171	1.9727	1.26	0.7955	3.88	0.0051	4.01	0.0092	0.8485
1602	3.5827	222.1454	5.6855	0.5249	1.03	0.7189	1.49	0.0104	1.57	0.0070	0.8426
1614	2.2225	223.0996	7.9556	0.8075	0.83	0.5816	1.26	0.0112	1.21	0.0570	0.5721
1646	4.0336	224.1249	0.7542	0.5082	1.34	0.6482	1.59	0.4785	2.08	0.1384	0.5294
1661	4.931	596.5186	0.6611	0.7651	1.03	0.9713	2.12	0.1491	2.08	0.1573	0.6250
1680	3.8887	597.3661	1.0515	1.1745	0.35	0.3188	1.24	0.7013	1.39	0.5405	0.6588
1700	4.4317	226.0156	9.6990	0.9393	1.13	0.0911	1.45	0.0006	1.44	0.0002	0.7926
1701	4.649	226.0158	2.3124	2.7757	1.04	0.9644	2.81	0.0432	3.07	0.0229	0.6397
1743	4.4258	228.0117	3.9368	0.2120	1.09	0.2085	1.41	0.0010	1.42	0.0004	0.7838
1837	2.4835	234.1373	13.9733	4.7281	0.97	0.9409	1.52	0.1001	1.47	0.0636	0.5632
1857	2.4851	235.139	1.4150	0.5804	1.06	0.9043	1.76	0.0343	1.68	0.0221	0.5897
1862	2.349	236.1523	3.3317	0.5760	1.08	0.6324	1.46	0.0352	1.67	0.1437	0.7191
1878	2.1849	664.1351	2.0484	2.4478	0.54	0.5927	4.16	0.0122	2.49	0.0878	0.5132
1958	4.1403	242.2309	2.0689	1.4046	1.45	0.2526	1.56	0.1613	1.57	0.1557	0.5191
2007	4.6813	708.513	5.5351	0.2518	1.11	0.1826	1.23	0.0032	1.37	0.0000	0.8162
2091	3.6423	246.1603	9.0910	1.6033	1.01	0.9341	1.57	0.0058	1.64	0.0112	0.8485
2112	2.6491	247.1083	2.1469	1.4318	1.21	0.7080	1.91	0.0394	2.22	0.0223	0.7118
2120	3.7008	248.1612	19.8518	3.0849	1.16	0.2549	1.93	0.0085	2.12	0.0030	0.8368
2127	3.7283	249.1737	3.1002	0.6014	1.18	0.1937	1.72	0.0417	1.94	0.0074	0.7868
2144	3.8929	249.2089	3.5397	2.3998	0.80	0.4463	1.03	0.9591	1.30	0.4459	0.5456
2145	2.1764	250.0955	1.5461	1.8132	1.49	0.6772	3.67	0.1221	2.78	0.0422	0.5456
2187	4.1015	253.1818	4.0615	4.6907	0.40	0.4251	1.93	0.2066	2.02	0.1753	0.6191
2275	3.4695	257.1421	0.2146	0.2526	5.31	0.2562	11.90	0.0000	12.15	0.0001	0.6691
2284	3.9013	258.2814	4.2191	3.1715	0.60	0.4684	0.82	0.7812	1.81	0.0849	0.6985
2285	3.7676	258.2821	0.7823	0.9088	1.84	0.3660	2.62	0.0663	2.56	0.0733	0.5382
2309	3.9011	259.2865	0.7252	0.5407	0.58	0.4428	1.08	0.8977	1.98	0.0558	0.7191
2314	3.5648	260.2274	10.3826	0.5951	0.81	0.5702	1.19	0.2347	1.31	0.1459	0.5897
2315	4.0814	260.2318	1.9240	2.4236	0.10	0.2474	0.53	0.5121	0.81	0.8059	0.5515
2336	3.5084	261.1654	8.6939	2.3329	1.25	0.2954	2.30	0.0012	2.26	0.0003	0.8074
2369	2.4851	264.1643	4.8234	1.0589	0.93	0.8559	3.06	0.0007	3.36	0.0017	0.8397
2404	3.8919	266.2341	2.6998	1.8224	0.59	0.4235	1.03	0.9571	1.29	0.4485	0.5838
2459	2.4354	270.0817	0.6235	0.7235	0.47	0.5060	11.80	0.0713	28.23	0.0145	0.8279
2465	4.4738	270.2866	42.4787	5.2590	0.92	0.3637	0.98	0.8126	1.08	0.3994	0.6397
2468	3.5215	271.1215	3.0881	0.4126	0.82	0.5564	2.10	0.0006	2.18	0.0214	0.7897
2481	3.7249	272.1737	3.5075	0.8295	1.13	0.5224	2.12	0.0007	2.23	0.0011	0.8662
2487	3.4077	273.1147	3.4423	2.8721	1.24	0.5948	1.38	0.4301	2.11	0.1285	0.5191

Colored column shows peak up-regulated significantly (fold change > 1.5, $P < 0.05$) by treatment with APAP.

Appendix 6. Continued

Peak No.	Retention time	Mass	Control		APAP 100 mg/kg		APAP 500 mg/kg		APAP 800 mg/kg		Spearman's rank correlation coefficient (P < 0.05)
			Average	S.D.	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P	
2500	3.8021	274.185	11.4070	8.6952	1.53	0.2367	1.88	0.0747	2.04	0.0449	0.7309
2510	2.0692	276.1302	16.3004	6.3425	1.15	0.5811	1.56	0.0383	1.74	0.0536	0.6868
2516	2.0586	277.1317	15.132	1.7979	1.04	0.9607	3.15	0.0204	1.96	0.4970	0.6118
2522	2.4419	278.1428	5.5365	6.5513	1.08	0.9319	4.30	0.0020	4.28	0.0021	0.7838
2531	2.4222	279.1508	0.6449	0.7506	1.52	0.5454	5.49	0.0005	4.93	0.0722	0.6603
2534	4.4221	279.1614	19.8615	2.2279	0.68	0.0922	1.13	0.0990	0.99	0.8510	0.5485
2611	2.2887	286.0754	5.3382	0.1820	1.09	0.6079	1.40	0.0723	2.05	0.0322	0.8103
2612	3.8502	286.0953	1.2887	0.1142	0.76	0.4245	1.29	0.0288	1.41	0.0014	0.7868
2637	3.6875	288.2232	3.8777	0.6834	1.39	0.0454	1.23	0.0737	1.56	0.0078	0.5868
2644	3.7208	289.1958	3.9243	1.1893	1.21	0.3057	2.17	0.0068	2.53	0.0029	0.8485
2652	3.4614	290.1813	7.5052	2.0947	1.17	0.4982	2.66	0.0005	2.84	0.0009	0.8338
2669	3.5191	292.2012	2.5572	1.8626	0.89	0.8678	2.23	0.0247	2.53	0.0096	0.8706
2671	4.4002	292.2875	7.6878	0.9864	0.92	0.7828	1.25	0.1251	1.18	0.1845	0.5221
2717	3.8177	298.1824	0.8600	0.9958	0.97	0.9722	2.59	0.0402	2.43	0.2029	0.6985
2741	3.1789	302.1509	6.6203	0.2544	1.02	0.5196	1.89	0.0081	2.30	0.0526	0.8838
2758	3.4295	304.1594	6.6369	2.2592	1.13	0.5751	2.56	0.0033	2.85	0.0075	0.8044
2761	3.127	304.2173	3.6003	0.7316	1.28	0.0650	2.11	0.0008	2.53	0.0002	0.8544
2789	3.1231	305.1504	1.3814	0.2373	0.55	0.2275	1.45	0.4404	2.07	0.0659	0.6765
2809	3.6078	310.2026	4.1168	2.8086	0.81	0.7633	4.96	0.0007	4.72	0.0001	0.8206
2823	3.6905	312.2144	4.6823	0.6668	1.11	0.4178	1.91	0.0014	2.10	0.0007	0.8074
2836	4.474	313.3206	5.0348	4.1928	1.14	0.7910	0.45	0.4035	1.85	0.1325	0.5338
2837	2.3556	314.0693	0.6244	0.7239	0.64	0.6933	2.45	0.0572	2.52	0.0529	0.6838
2844	3.7642	314.2342	18.9291	1.7993	1.24	0.1148	1.27	0.0492	1.50	0.0022	0.6868
2853	4.4729	315.341	8.7058	0.5977	1.19	0.0380	1.41	0.0002	1.69	0.0000	0.8750
2858	3.5987	316.1977	4.9247	3.3665	1.33	0.4808	2.66	0.0058	2.57	0.0060	0.7868
2859	2.7784	316.2124	3.2702	2.2872	1.23	0.6833	1.95	0.0644	1.97	0.0407	0.6176
2861	2.0576	316.2131	1.9315	0.2929	0.92	0.8163	1.74	0.0068	1.87	0.0273	0.7544
2864	3.7768	316.2288	2.6247	1.7722	1.36	0.3461	1.66	0.1982	2.41	0.0176	0.6250
2920	4.4785	324.2387	2.9149	1.9777	0.00	0.0601	0.91	0.8928	2.19	0.0514	0.6206
2928	4.2614	325.23	4.0459	0.6557	1.26	0.0816	1.40	0.0232	1.40	0.0225	0.6956
2965	3.6829	330.1372	1.8281	2.1269	0.57	0.6167	2.42	0.0580	2.68	0.0609	0.8662
2984	3.7499	332.1468	9.1305	2.6854	0.99	0.9567	1.80	0.0076	1.75	0.0505	0.7044
2987	4.3781	332.2829	1.5784	1.8243	1.41	0.6140	2.70	0.0400	2.79	0.0509	0.7500
3055	3.9049	342.2655	0.5466	0.3791	0.76	0.6891	0.53	0.3557	1.64	0.1337	0.5250
3061	3.8857	343.2957	2.3988	0.3539	0.46	0.1012	1.13	0.2376	1.07	0.5503	0.5382
3071	2.93	344.207	0.6150	0.7208	0.47	0.5063	3.68	0.0060	3.87	0.0042	0.8368
3075	2.1874	345.1308	1.3107	1.5303	2.81	0.1794	10.90	0.0011	5.25	0.0255	0.5618
3082	3.3169	346.2239	0.6377	0.7414	1.32	0.7523	2.36	0.2227	3.85	0.0091	0.7632
3088	2.0281	347.2181	3.6904	0.4054	1.57	0.0391	1.99	0.0000	2.54	0.0043	0.8103
3106	2.3054	350.087	2.0232	1.8153	2.39	0.0566	3.69	0.0073	3.98	0.0028	0.7956
3252	3.4174	369.1873	3.6085	3.1884	0.93	0.9146	1.50	0.6695	2.80	0.0768	0.5353

Colored column shows peak up-regulated significantly (fold change > 1.5, P < 0.05) by treatment with APAP.

厚生労働科学研究費補助金(トキシコゲノミクス研究事業)

分担研究報告書

分担研究課題:メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発
ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

分担研究者:宮田直樹

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、LC/MS/MS や MALDI TOF/TOF-MS/MS などのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行っている。昨年度は、フラレーン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラレーンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラレーン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成し、合成した一連の活性カルボン酸誘導体（アミノ基修飾試薬）を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラレーンを導入したペプチド類の TOF-MS 分析を行い、誘導体化体が効率良く検出できることを確認した。今年度は、メタボロミクス・プロテオミクスの定量的な解析に有用な試薬として、重水素化体が容易に得られるピリジン環をもつ誘導体化試薬の開発を行った。その結果、今回合成した新規 N 末端誘導体化試薬は、ペプチドとの反応性が良くリン酸化ペプチドの検出や PSD モードによるアミノ酸配列解析を容易にすることができることを見出した。また、別途合成した安定同位体標識体を用いるとその質量差から MS による相対的定量に利用できることが分かった。これらの結果より、今回開発した誘導体化試薬は N 末端修飾試薬としてタンパク質の同定や相対的定量、リン酸化部位の同定に有効であることがわかり、定量的リン酸化プロテオーム解析によく用いられている ICAT (Isotope coded affinity tag) 法と比べても、これらの N 末端修飾試薬は合成が容易で有用である。また、イオン化効率を向上させる構造をもつためペプチド混合物のままリン酸化ペプチドを検出できる可能性があり、リン酸化ペプチドを精製することなく検出し、同定できることが期待できる。

また、化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響を解析し、メタボロミクス・プロテオミクス研究に役立つ知見を得る目的で、毒性が報告されている化合物としてエダラボン（脳梗塞急性期治療薬、腎毒性）をモデル化合物として選び、脂溶性/水溶性を制御した一連の化合物の合成し、活性酸素消去能を比較し、導入した置換基と酸化還元電位ならびに活性酸素消去能との相関を明らかにした。

研究協力者

中川秀彦 名古屋市立大学大学院
薬学研究科助教授
鈴木孝禎 名古屋市立大学大学院
薬学研究科助手
幸田光復 武蔵野大学薬学部教授
津元裕樹 武蔵野大学薬学部助手
名古屋市立大学大学院
薬学研究科研究員

A. まえがき

本研究事業「非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発」の分担研究課題「メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発」および「タボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究」を担当している。

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、LC/MS/MS や MALDI TOF/TOF-MS/MS などのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行っている。昨年度は、フラレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体（アミノ基修飾試薬）を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラレンを導入したペプチド類の TOF-MS 分析を行い、誘

導体化体が効率良く検出できることを確認した。

今年度は、メタボロミクス・プロテオミクスの定量的な解析に有用な試薬として、重水素化体が容易に得られるピリジン環をもつ誘導体化試薬の開発を行った。その結果、今回合成した新規 N 末端誘導体化試薬は、ペプチドとの反応性が良くリン酸化ペプチドの検出や PSD モードによるアミノ酸配列解析を容易にすることができると見出した。また、別途合成した安定同位体標識体を用いるとその質量差から MS による相対的定量に利用できると分かった。これらの結果より、今回開発した誘導体化試薬は N 末端修飾試薬としてタンパク質の同定や相対的定量、リン酸化部位の同定に有効であることがわかり、定量的リン酸化プロテオーム解析によく用いられている ICAT (Isotope coded affinity tag) 法と比べても、これらの N 末端修飾試薬は合成が容易で有用である。また、イオン化効率を向上させる構造をもつためペプチド混合物のままでリン酸化ペプチドを検出できる可能性があり、リン酸化ペプチドを精製することなく検出し、同定できることが期待できる。以下、この研究成果について報告する。

メタボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響を解析する研究では、毒性が報告されている化合物としてエダラボン（脳梗塞急性期治療薬、腎毒性）をモデル化合物として選び、脂溶性/水溶性を制御した一連の化合物の合成し、活性酸

素消去能を比較し、導入した置換基と酸化還元電位ならびに活性酸素消去能との相関を明らかにした。この結果は、最終年度にまとめて報告する予定である。

本年度は、メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発に関する研究成果を報告する。

B. 研究目的

生体内の機能はタンパク質の量的変動だけでなく、リン酸化等の翻訳後修飾による質的変動によっても調節される。翻訳後修飾に関する情報はゲノム解析では得られないため、実際に機能しているタンパク質を解析するプロテオーム解析が盛んに行われている。ペプチドやタンパク質の同定には Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) や Electrospray Ionization (ESI) といったソフトイオン化法を用いた質量分析法 (mass spectrometry; MS) が用いられるが、リン酸化ペプチドは強い負イオンを有するため、感度の良い正イオン検出モードで測定した場合、他のペプチド鎖に比べて感度が著しく下がってしまう。それゆえ、検出感度を向上させることが大きな課題となっている。また、MS は安定同位体標識を利用して正常と異常など異なる状態にある組織や細胞でのタンパク質発現の定量研究においても重要な役割を果たす。

そこで、すべてのペプチドに存在する N 末端のアミノ基にイオン化効率を向上させるような化合物を化学修飾させれば、イオン化効率の悪いリン酸化ペプチドなどの検出を容易にするが可能になる。ま

た、N 末端を修飾することにより、MS/MS によりアミノ酸配列を解析する際、N 末端由来のピークが C 末端由来のピークに対して相対的に大きくなること、また、N 末端由来のピークのみ分子量が変化することから MS/MS によるアミノ酸配列解析が容易になることが期待できる。さらに、分子量の異なる試薬を用いることにより、発現量に差のあるタンパク質の同定や相対的定量を行うことも可能になる (図 1)。

すでに我々は、ペプチドの N 末端修飾試薬として、活性ニコチン酸誘導体がソフトイオン化に適した誘導体化試薬であることを報告している (*Chem. Pharm. Bull.*, **51(12)**, 1399(2003))。今年度は、この知見に基づいて行った最近の研究展開の結果を報告する。

C. 研究方法と結果

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発は、分担研究代表者 宮田が指導し、武蔵野大学幸田光復教授の協力のもとで、名古屋市立大学薬学研究科の中川秀彦助教授、鈴木孝禎助手、津元裕樹研究員、および、大学院生が研究を遂行した。

1. N 末端修飾試薬の合成

近年、Munchback らは、ニコチン酸誘導体 (図 2, 化合物 1) を用いることによりタンパク質の定量と配列解析が容易になることを報告した。これは、塩基性のピリジン環をペプチドに導入することによりピリジン環の窒素がプロトン化されてカチオン性となり、その結果、修飾されたペプチドのカチオン性が増すために

イオン化しやすくなったと考えられる。しかし、化合物が高価であることや、彼らの化合物の組み合わせでは質量差が4のダブルピークしか得られないため多価イオンが得られるESIではピークが複雑となる。そこで、同位体標識体が容易に得られ、数種類の質量差が得られる化合物を合成した(図2)。

化合物 **2**, **4**, **5** は重水素置換体を容易に得るためにピリジン環の窒素の α -位にメチル基を導入した化合物であり、化合物 **3** と **6** は、それらの重水素置換体である。これらにより安定同位体による質量差が3Da (化合物 **2** と **3**) と6Da (化合物 **5** と **6**) の試薬の組み合わせが得られた。ESIでは多価イオンが得られるため6Da 差の組み合わせはESIを用いた相対的定量に有効である。なお、化合物 **2-6**, **13**, **14** は新規化合物である(図3, 図4)。

2. N末端修飾試薬としての利用

試薬の反応性を検討した(図5)。Bradykininを用いて検討した結果、化合物 **2-6**, **13**, **14** は、すでにMSによるタンパク質の同定や定量に用いられている化合物 **1** と比べて同程度の反応性を示し、特徴的な同位体分布を利用してアミノ酸配列解析に利用されている化合物 **7** と **8** に比べると2倍以上反応性が良いことが分かった(図6)。

次に、化合物 **2** を用いて合成リン酸化ペプチド **1** (TNAS(PO₃H₂)YSPRAK) の修飾を行った結果、修飾前のスペクトルでは m/z 1174 ($[M+H]^+$) は検出されにくかったのに対して、修飾後のスペクトルではN末端とLys残基が修飾されたdi修飾体 (m/z 1412) とmono修飾体 (m/z 1293) が

明確に検出された(図7)。

次に、MALDI-TOF/MSのPSD(post source decay)モードを用いてアミノ酸配列解析への利用を検討した。図8にLeucine-Enkephalin(YGGFL)について修飾前と化合物 **2,5** による修飾後の測定結果を示す。修飾後のスペクトル(b, c)では、全体的にフラグメントイオンのピーク強度が上がり、修飾前のスペクトル(a)では検出されていなかったN末端由来のa1, b1フラグメントイオンのピークを検出できた。また、N末端由来のピークのみ分子量が変化することを確認した。

次に、MSのピーク強度を比較することでペプチドの相対的定量ができるかどうかを試みた(図10)。Bradykininをモデルに検討した結果を図11, 図12に示す。濃度比が1:0.5から1:5のペプチド溶液を分子量の異なる化合物 **5** (2,6-CH₃) と化合物 **6** (2,6-CD₃) で別々に修飾し、混合後、MALDI-TOF/MSを測定した。図11に示したように修飾後のペプチドピークは試薬の分子量差である6Da 差のダブルピークで検出され、そのピーク比はペプチド濃度によって変化した。理論値と実測値をプロットした結果、傾きが約1の直線となり、MSのピーク強度比からペプチドの相対的定量ができることが分かった(図12)。

D. 結論と考察

本研究事業では、「メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発」および「タボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究」を担当している。

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、

1. 新規N末端修飾試薬として化合物**2-6**, **13**, **14**を合成した。
2. 化合物**2-6**, **13**, **14**はペプチドとの反応性が良く、化合物**1**と同様に、リン酸化ペプチドの検出やPSDモードによるアミノ酸配列解析を容易にすることを明らかにした。
3. 化合物**2**と**3**で3Daの、化合物**5**と**6**で6Daの安定同位体による質量差が得られ、MSによる相対的定量に利用できることを実証した。

これらの結果より、化合物**2-6**, **13**, **14**はN末端修飾試薬としてタンパク質の同定や相対的定量、リン酸化部位の同定に有効である。

定量的リン酸化プロテオーム解析によく用いられているICAT (Isotope coded affinity tag) 法と比べて、これらのN末端修飾試薬**1-14**は合成が容易であり、安価であるという利点がある。また、イオン化効率を向上させる構造をもつためペプチド混合物のままリン酸化ペプチドを検出できる可能性があり、リン酸化ペプチドを精製することなく検出し、同定できることが期待できる。

これらの誘導体化試薬は、メタボロミクス・プロテオミクス解析に有効利用できると思われる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hidehiko Nakagawa, Ryo Ohyama, Ayako Kimata, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata. Hydroxyl radical scavenging by edaravone derivatives: Efficient scavenging by 3-methyl-1-(pyridin-2-yl)-5-pyrazolone with an intramolecular base. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16(23)**, 5939-5942 (2006).

2) Takayoshi Suzuki, Keiko Imai, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, 2-Anilinobenzamides as SIRT Inhibitors. *ChemMedChem*, **1**, 1059-1062 (2006),

3) Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Yukihiro Itoh, Shinya Hisakawa, Satoko Maeda, Minoru Yoshida, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate. *J. Med. Chem.*, **49(16)**, 4809-4812 (2006).

4) Shinya Usui, Hiroki Fujieda, Takayoshi Suzuki, Naoaki Yoshida, Hidehiko Nakagawa and Naoki Miyata, Identification of novel PPARalpha ligands by the structural modification of a PPARgamma ligand, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**, 3249-3254 (2006).

5) Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Rational design of non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*, **6(5)**, 515-526 (2006).

6) Hakamata W, Nakanishi I, Masuda Y, Shimizu T, Higuchi H, Nakamura Y, Saito S, Urano S, Oku T, Ozawa T, Ikota N, Miyata N, Okuda H, Fukuhara K. Planar Catechin Analogues with Alkyl Side Chains: A Potent Antioxidant and an

alpha-Glucosidase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(20), 6524-6525 (2006)

7) Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. *Curr. Med. Chem.*, **13**(8), 935-58 (2006)

8) Fukuhara K, Nagakawa M, Nakanishi I, Ohkubo K, Imai K, Urano S, Fukuzumi S, Ozawa T, Ikota N, Mochizuki M, Miyata N, Okuda H. Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(5), 1437-43 (2006).

9) Shizuka Ban, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Novel mitochondria-localizing TEMPO derivative for measurement of cellular oxidative stress in mitochondria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2055-2058 (2007).

10) Takayoshi Suzuki, Shinya Hisakawa, Yukihiro Itoh, Sakiko Maruyama, Mineko Kurotaki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Identification of a potent and stable antiproliferative agent by the prodrug formation of a thiolate histone deacetylase inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1558-1561 (2007).

11) Shizuka Ban, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Novel membrane-localizing TEMPO derivatives for measurement of cellular oxidative stress at the cell membrane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1451-1454 (2007).

2. 関連する学会発表

1) Hiroki Tsumoto, Katsumasa Takahashi, Kohfuku Koda, Takayoshi Suzuki,

Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Application of C60-based amine-labeling reagents to MALDI-TOF MS analysis, The 30th Fullerene-Nanotubes General Symposium. (Nagoya), 2P-5

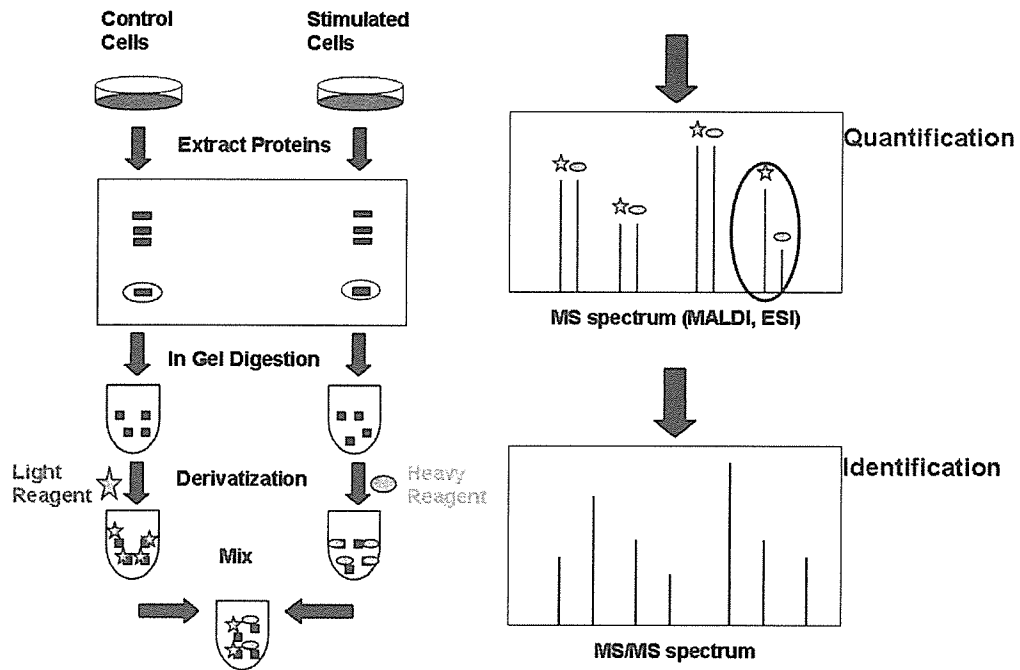
2) 津元裕樹、高橋克昌、幸田光復、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、フラーレン C60 の特性を利用したタンパク質の MALDI-TOF MS 分析, 日本薬学会第 126 年会. 2006 年 (仙台) .

3) 中川秀彦, 大山 亮, 木全絢子, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 分子内塩基を有する高活性エタラボン誘導体, 第 32 回反応と合成の進歩シンポジウム. 2006 年 (広島) .

4) 大山亮, 木全絢子, 中川秀彦, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 新規エタラボン誘導体の脂質膜中でのヒドロキシルラジカル消去能, 日本薬学会第 126 年会. 2006 年 (仙台) .

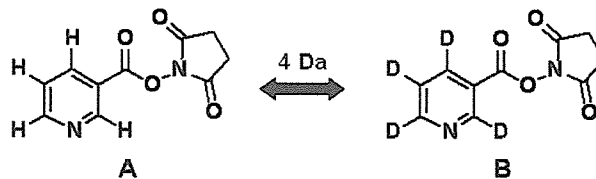
Mass Spectrometry for Proteomics

1

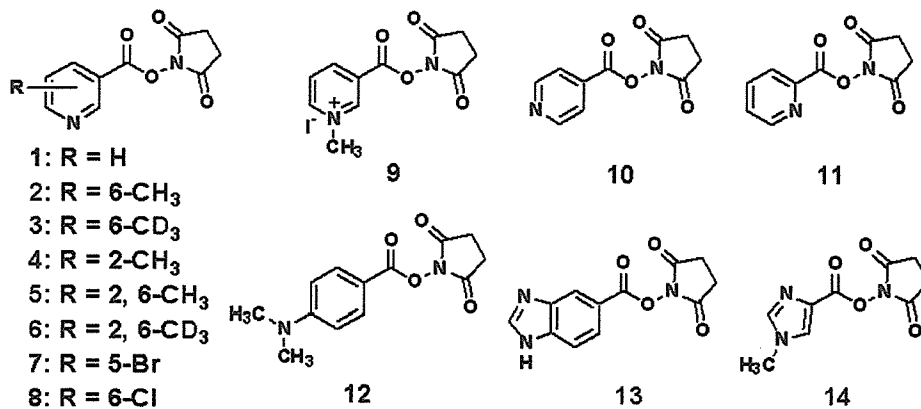


Design of N-Terminal Labeling Reagents

2



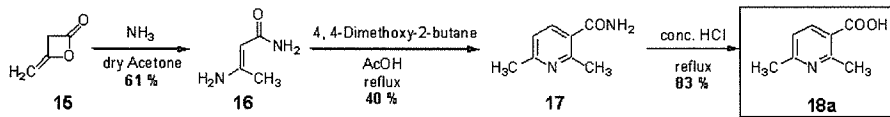
Munchback et. al. *Anal. Chem.*, 2000, 72, 4047-4057



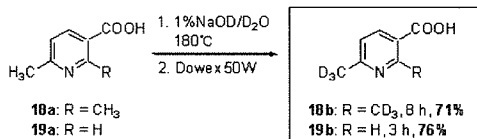
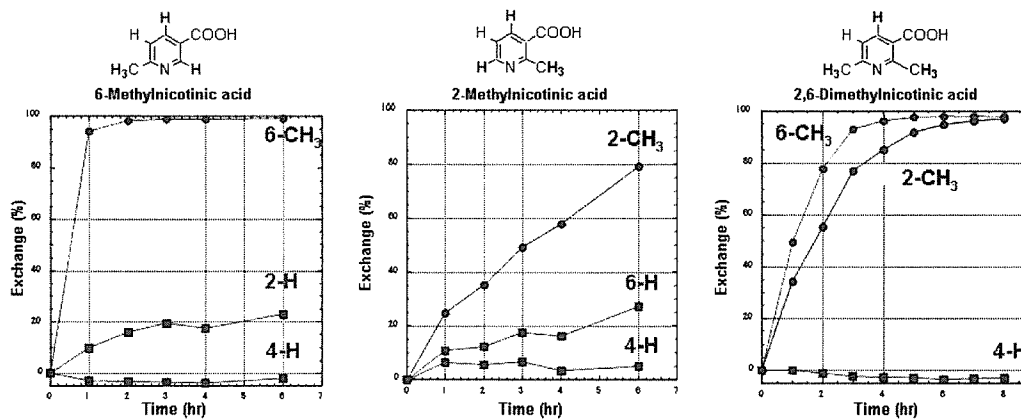
M7

Synthesis of Nicotinic Acid Derivatives

3



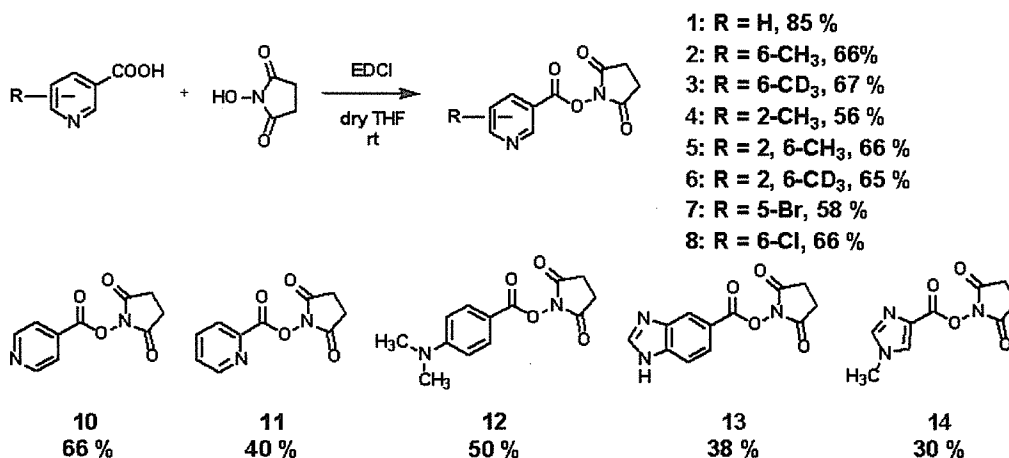
Scheme 1. Synthesis of 2,6-Dimethylnicotinic Acid (18a).



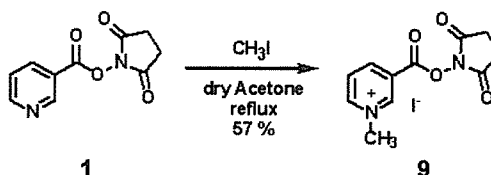
Scheme 2. Synthesis of Deuterium-labeled Nicotinic Acid Derivatives (18b, 19b).

Synthesis of *N*-Terminal Labeling Reagents

4



Scheme 3. Synthesis of 1-(nicotinoyloxy)succinimide derivatives and analogs.



Scheme 4. Synthesis of *N*-Methylnicotinic Acid NHS Ester (9).