

## Supplementary Materials

### Ratio Analysis NMR Spectroscopy (RANSY) for Selective Metabolite Identification in Complex Samples

Siwei Wei<sup>1</sup>, Jian Zhang<sup>1</sup>, Lingyan Liu<sup>2</sup>, Tao Ye<sup>1</sup>, G. A. Nagana Gowda<sup>1</sup>,

Fariba Tayyari<sup>1</sup>, and Daniel Raftery<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Chemistry, Purdue University, 560 Oval Drive, West Lafayette, Indiana 47907, and* <sup>2</sup>*Weldon School of Biomedical Engineering, Purdue University, 206 S. Martin Jischke Drive, West Lafayette, IN 47907*

\*Corresponding author:

Tel: [\(765\)494-6070](tel:(765)494-6070)

Fax: (765)494-0239

Email: [raftery@purdue.edu](mailto:raftery@purdue.edu)

Supplementary figures and tables:

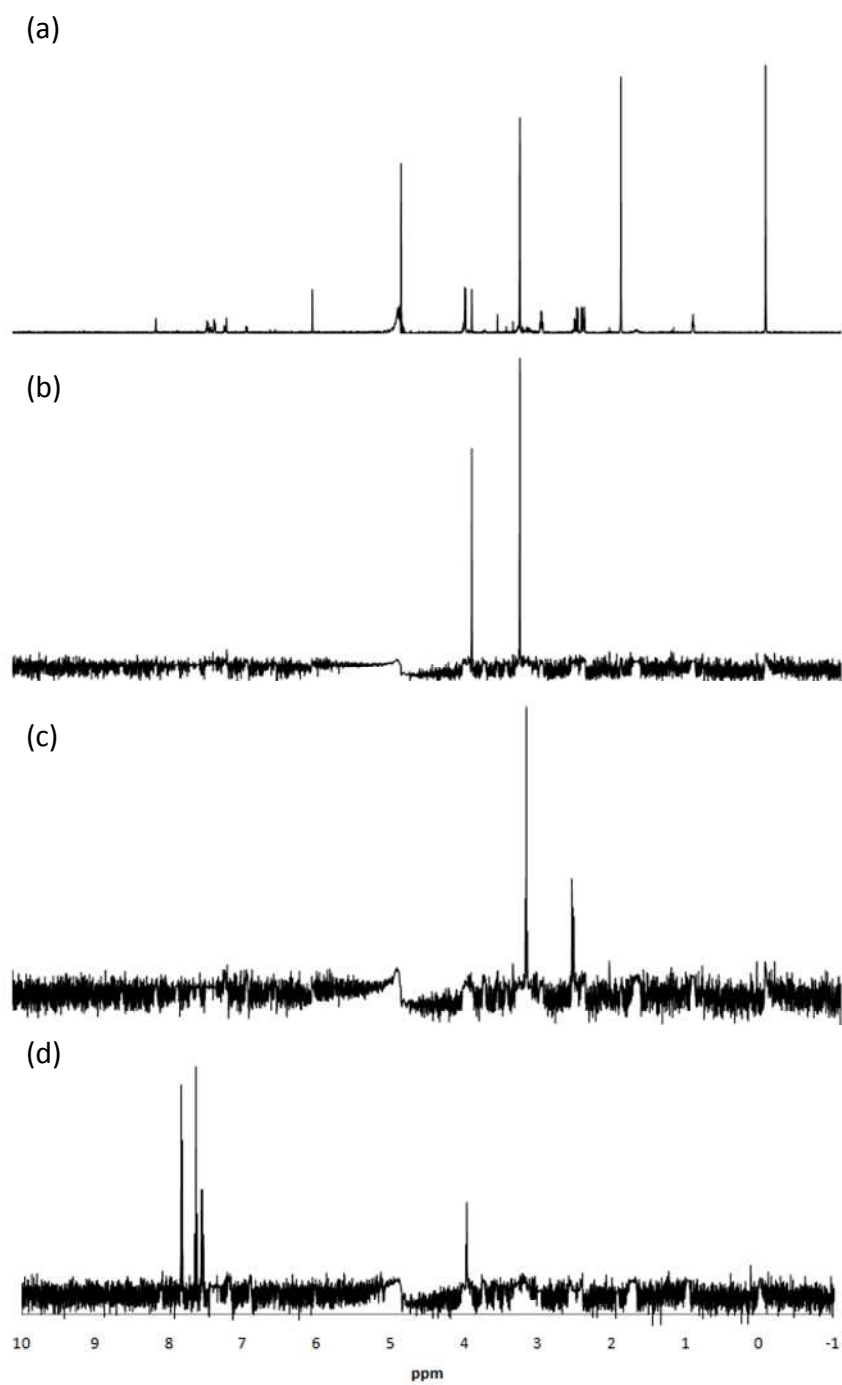
Table S-1	Concentrations of 33 metabolites in 15 samples.
Table S-2	Concentrations of 15 metabolites in 10 samples with a larger concentration range.
Figure S-1	Selective detection of betaine, $\beta$ -alanine and hippuric acid by the RANSY method.
Table S-3	Peak assignment for 33 derivatized metabolites in 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ spectra
Figure S-2	RANSY spectra of valine generated from different number of samples.
Supplementary Codes	R codes for RANSY

Name	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
acetic acid	0.08	0.1	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.1	0.06	0.08	0.06	0.1	0.1	0.1
cis-aconitic acid	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.06	0.08	0.08	0.08	0.1	0.08	0.08	0.1	0.06	0.08
$\beta$ -alanine	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.1	0.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.1	0.1	0.06
betaine	0.1	0.08	0.08	0.06	0.08	0.08	0.14	0.14	0.06	0.1	0.14	0.1	0.1	0.1	0.06
citric acid	0.36	0.16	0.26	0.24	0.26	0.16	0.26	0.22	0.3	0.48	0.26	0.48	0.5	0.22	0.46
L-cysteine	0.1	0.14	0.14	0.12	0.08	0.14	0.08	0.1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.1	0.14
formic acid	0.24	0.4	0.3	0.5	0.32	0.32	0.32	0.14	0.4	0.2	0.4	0.24	0.12	0.28	0.28
fumaric acid	0.1	0.08	0.1	0.08	0.06	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0.08	0.06	0.1
glucuronic acid	0.4	0.32	0.24	0.22	0.16	0.12	0.48	0.46	0.38	0.34	0.32	0.14	0.38	0.26	0.34
L-glutamic acid	0.1	0.08	0.1	0.08	0.08	0.06	0.08	0.1	0.1	0.1	0.1	0.06	0.08	0.1	0.08
Glycine	0.46	0.38	0.12	0.16	0.4	0.12	0.34	0.44	0.48	0.5	0.28	0.5	0.42	0.12	0.4
guanidineacetic acid	0.1	0.08	0.08	0.08	0.1	0.1	0.1	0.08	0.1	0.08	0.08	0.06	0.1	0.1	0.08
hippuric acid	0.08	0.06	0.06	0.1	0.06	0.08	0.1	0.1	0.08	0.06	0.08	0.1	0.06	0.08	0.08
L-histidine	0.14	0.14	0.14	0.08	0.06	0.12	0.08	0.1	0.1	0.14	0.14	0.1	0.12	0.12	0.1
4-hydroxy-L-proline	0.08	0.08	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.06	0.1	0.08	0.08	0.1	0.06	0.08	0.1
isocitric acid	0.08	0.03	0.08	0.1	0.06	0.1	0.08	0.1	0.08	0.08	0.08	0.1	0.08	0.06	0.08
L-lactic acid	1.7	1.34	1.96	1.44	1.76	1.7	1.7	1.88	1.92	1.46	1.5	1.38	1.58	1.4	1.88
L-leucine	0.12	0.1	0.22	0.2	0.18	0.18	0.2	0.22	0.22	0.28	0.16	0.18	0.1	0.22	0.08
maleic acid	0.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.1	0.06	0.06	0.08	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.06
malic acid	0.08	0.1	0.1	0.08	0.06	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08	0.06	0.08	0.06
malonic acid	0.08	0.08	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.06	0.1	0.08	0.08	0.1	0.06	0.08	0.1
L-mandelic acid	0.12	0.14	0.12	0.12	0.16	0.1	0.12	0.14	0.14	0.12	0.12	0.14	0.12	0.12	0.08
L-methionine	0.08	0.08	0.1	0.1	0.08	0.06	0.1	0.1	0.1	0.08	0.08	0.1	0.08	0.06	0.08
methylmalonic acid	0.1	0.08	0.1	0.1	0.1	0.1	0.08	0.06	0.1	0.1	0.08	0.08	0.08	0.1	0.1
octanoic acid	0.08	0.1	0.1	0.06	0.08	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0.06	0.08	0.1	0.1	0.08
oxalic acid	0.1	0.08	0.08	0.1	0.06	0.1	0.1	0.1	0.1	0.06	0.06	0.08	0.1	0.08	0.06
L-phenylalanine	0.14	0.06	0.12	0.12	0.14	0.1	0.08	0.12	0.08	0.12	0.1	0.06	0.1	0.12	0.12
propionic acid	0.06	0.1	0.1	0.1	0.08	0.08	0.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.08	0.08	0.08
suberic acid	0.1	0.1	0.1	0.1	0.06	0.1	0.1	0.1	0.1	0.08	0.06	0.08	0.08	0.06	0.08
succinic acid	0.08	0.08	0.06	0.08	0.08	0.08	0.1	0.06	0.08	0.1	0.06	0.1	0.1	0.08	0.1
L-threonine	0.24	0.2	0.24	0.3	0.14	0.22	0.14	0.26	0.28	0.1	0.1	0.28	0.22	0.16	0.1
L-tryptophan	0.1	0.08	0.08	0.1	0.08	0.08	0.1	0.1	0.08	0.08	0.08	0.06	0.08	0.1	0.06
L-tyrosine	0.08	0.06	0.1	0.1	0.08	0.06	0.06	0.1	0.1	0.1	0.1	0.08	0.1	0.08	0.08

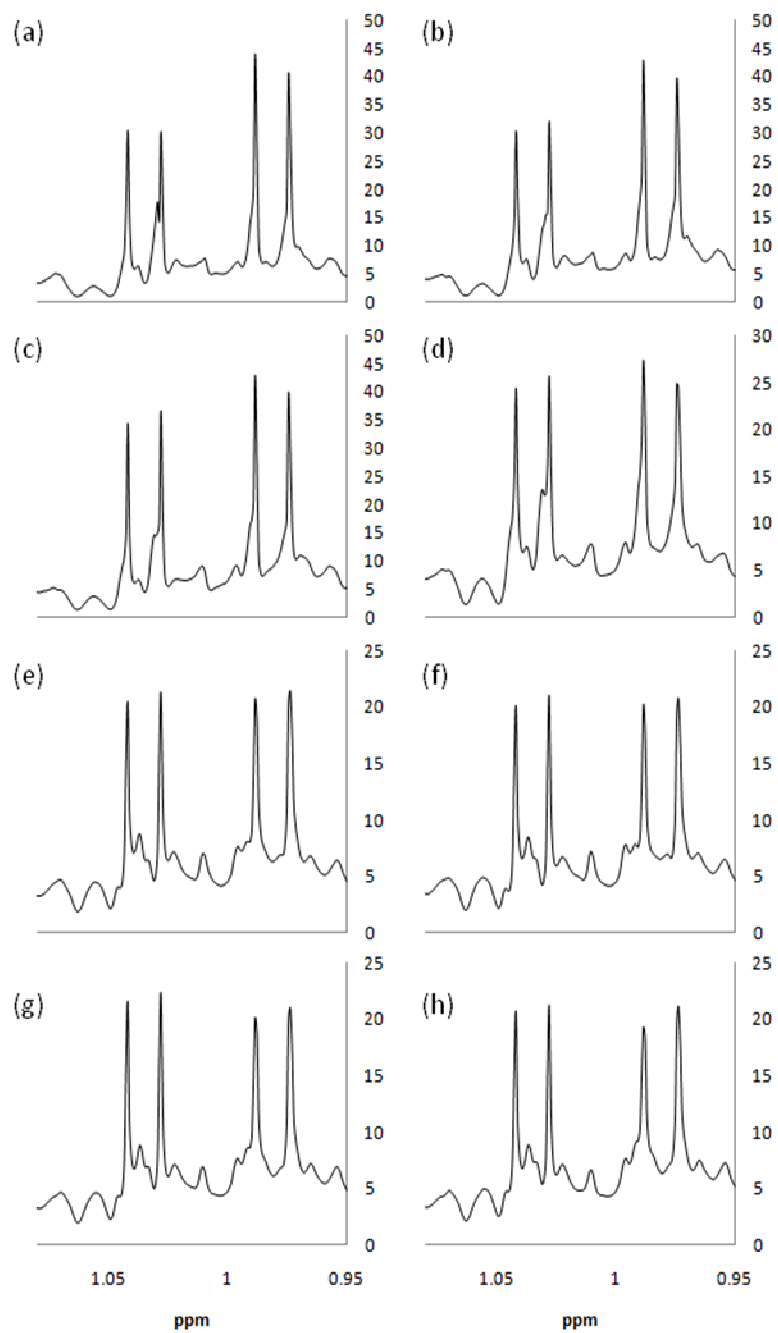
**Table S-1:** Experimental design for the 33 standard mixtures (S1-S15). Units for all metabolite concentrations are mM.

Name	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
acetic acid	2	0.1	0.06	0.4	0.08	0.08	0.08	0.8	0.03	0.06
cis-aconitic acid	0.08	1.6	0.03	0.1	2	0.06	0.08	0.08	1	0.1
$\beta$ -alanine	0.06	0.03	2	0.06	0.08	1.2	0.08	0.08	0.08	0.4
betaine	0.4	0.1	0.8	0.1	0.03	0.1	0.1	2	0.08	1.6
citric acid	0.03	0.1	0.1	0.1	0.8	0.1	0.1	0.4	2	0.08
glycine	0.14	0.06	0.08	0.1	0.06	1.2	0.4	0.03	0.12	2
glycolic acid	0.03	2	1.2	0.4	0.06	0.1	0.08	0.08	0.08	0.08
hippuric acid	0.03	0.08	0.4	1.2	2	0.08	0.14	0.14	0.06	0.1
L-histidine	0.4	2	0.8	0.24	0.03	0.16	0.26	0.22	0.3	0.48
isocitric acid	2	0.03	0.14	0.12	0.8	0.14	0.08	0.1	0.4	0.12
L-leucine	0.2	0.4	0.1	0.2	0.03	2	1.6	0.16	0.36	0.2
maleic acid	0.4	0.4	0.03	2	0.06	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1
L-phenylalanine	0.4	2	0.24	0.22	0.16	0.12	0.03	0.4	0.1	0.34
succinic acid	0.1	0.03	0.1	0.08	0.08	1.6	2	0.1	0.8	0.4
L-tyrosine	0.8	0.03	1.2	0.16	0.4	0.12	1.6	0.44	0.16	2

**Table S-2:** Experimental design for the 15 standard mixtures (S1-S10). Units for all metabolite concentrations are mM.



**Figure S-1:** (a)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of a mixture of 15 standard compounds; (b)-(d) Selective detection of (b) betaine, (c)  $\beta$ -alanine and (d) hippuric acid by the RANSY method; (b), (c) and (d) were generated from 10  $^1\text{H}$  NMR spectra of mixtures, and the driving peaks are the same as in Figure 1.



**Figure S-2:** RANSY spectra of valine calculated for different sample numbers ( $n$ ): (a)  $n=5$ ; (b)  $n=7$ ; (c)  $n=10$ ; (d)  $n=15$ ; (e)  $n=20$ ; (f)  $n=30$ ; (g)  $n=40$ ; and (h)  $n=80$ .

<b>Name</b>	<b>Peak No.</b>
acetic acid	29
<i>cis</i> -aconitic acid	20,21,22
beta-alanine	31
betaine	24
citric acid	5,6,7
L-cysteine	43
formic acid	27
fumaric acid	25
glucuronic acid	3,4
L-glutamic acid*	8
glycine	40
guanidineacetic acid	44
hippuric acid	41
L-histidine	45
4-hydroxyl-L-proline*	9
isocitric acid	11,12,13,14
L-lactic acid	1,2,47
L-leucine	15
maleic acid	26
malic acid	17,18
malonic acid	28
L-mandelic acid	23
L-methionine	39
methylmalonic acid	32
octanoic acid	30
oxalic acid*	19
L-phenylalanine	37
propionic acid	34
suberic acid	42
succinic acid	33
L-threonine	35
L-tryptophan	38
L-tyrosine	36

**Table S-3:** 33 metabolites assigned by RANSY in the mixtures and their peak numbers in Figure 4(a). The metabolites with asterisks have one peak missing.

## Supplementary Codes:

```
setwd("C:\\research\\RANSY_paper\\1d")
```

```
#####peak driving RANSY
```

```
data=read.csv("ransy1d.csv",head=F)
```

```
drive=read.csv("citric.csv",head=F)
```

```
ppm=data[,1]
```

```
data=data[,-1]
```

```
a=nrow(data)+1
```

```
data=as.matrix(data)
```

```
drive=as.matrix(drive)
```

```
b=nrow(data)
```

```
data=rbind(data,drive)
```

```
ratio=array(0,dim=c(1,b))
```

```
####mean/sd####
```

```
ratio=array(0,dim=c(1,b))
```

```
for (i in 1:b)
```

```
{ratio[1,i]=mean(data[i,]/data[a,])/sd(data[i,]/data[a,])}
```

```
ratio_r=cbind(ppm,t(ratio))
```

```
write.csv(ratio_r,"citric_ratio.csv",col.names=F,row.names=F)
```

```
#####2d#####
```

```
data=read.csv("C:\\research\\RANSY_paper\\2d\\ransy2d1.csv",head=FALSE)
```

```
data=as.matrix(data)
```

```
a=nrow(data)
```

```
b=ncol(data)
ratio=array(0,dim=c(a,a))
for ( i in 1:a) {for (j in 1:a) {
ratio[i,j]=mean(data[i,]/data[j,])/sd(data[i,]/data[j,])} }
write.csv(ratio,"C:\\research\\RANSY_paper\\2d\\ransyresult1.csv")
```