

基于血浆中脂肪酸代谢谱及非线性判别分析方法的 糖尿病中医证候分型

徐文娟¹, 张良晓¹, 黄宇虹², 杨乾翎¹, 肖红斌^{1*}, 张德芹^{2*}

(1. 中国科学院分离分析化学重点实验室, 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023;

2. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要: 糖尿病是严重威胁人类健康的代谢综合征之一, 中医因在治疗糖尿病方面有着自身的优势和特色而广泛受到重视。该文以血浆中脂肪酸代谢谱及血脂代谢指标为研究对象, 结合化学计量学方法, 对5种糖尿病中医证候(气虚、阴虚、气阴两虚、热盛和血瘀)进行关联分析。通过正交信号校正的偏最小二乘(OSC-PLS)方法将5种证候与健康组较明显地区分开。同时, 采用非线性判别分析(ULDA)对健康组、中医虚证(气虚、阴虚、气阴两虚)、中医实证(热盛、血瘀)进行分析, 3组样本体现明显的聚类效果, 正判率达到95.7%。其中对分类贡献较大的标志物为二十碳二烯酸(C20:2)、二十碳五烯酸(C20:5)、甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白(HDL), 这一结果为辅助糖尿病中医临床诊断提供了重要的信息。

关键词: 脂肪酸代谢谱; 非线性判别分析; 糖尿病; 证候分型

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)09-0864-06

Plasma fatty acid metabolic profiles for traditional Chinese medicine syndrome differentiation in diabetic patients using uncorrelated linear discriminant analysis

XU Wenjuan¹, ZHANG Liangxiao¹, HUANG Yuhong², YANG Qianxu¹,
XIAO Hongbin^{1*}, ZHANG Deqin^{2*}

(1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of
Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences (CAS), Dalian 116023, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Diabetes is a common metabolic syndrome which presents a serious threat to human health. Traditional Chinese medicine (TCM) has been widely paid attention to its advantages and characteristics in the diagnosis and the treatment of diabetes. A strategy of classifying five TCM syndromes in diabetes (Qi-deficiency, Yin-deficiency, Qi- and Yin-deficiency, Damp heat and Blood stasis) was employed based on plasma fatty acid metabolic profiles, lipid metabolism indicators and chemometrics methods. Using orthogonal signal correction-partial least squares (OSC-PLS) method, the five syndromes were obviously distinguished from those of the health control, which confirmed there existed metabolite differences in different traditional Chinese medicine syndromes. Furthermore, a new method, uncorrelated linear discriminant analysis (ULDA), was applied in the discrimination of health control, TCM deficiency syndromes (Qi-deficiency, Yin-deficiency, Qi- and Yin-deficiency) and TCM empirical syndromes (Damp heat, Blood stasis), which demonstrated better clustering results, the correct rate reached 95.7%. The four potential biomarkers, C20:2, C20:5, triglycerides (TG) and high density lipoprotein (HDL), performed large contributions to the classification which can provide important information assisting TCM

* 通讯联系人: 肖红斌, 博士, 研究员, 主要研究方向为中药药效物质基础及作用机理研究. Tel: (0411) 84379756, E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn.

张德芹, 博士, 教授, 主要从事中药传统理论及临床应用研究. E-mail: deqin123@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(90709014).

收稿日期: 2012-04-21

clinical diagnosis.

Key words: fatty acid metabolic profiles; uncorrelated linear discriminant analysis (ULDA); diabetes; syndrome classification

中医是研究人体生理、病理以及疾病诊断和防治的一门学科,是通过长期医疗实践逐步形成并发展的医学理论体系^[1]。中医证候是机体在疾病发展过程中某一阶段的病理概括,是中医辨证论治的核心和精髓^[2]。探究证候实质是中医药现代化的关键问题之一。目前证候理论的发展面临着极大的挑战,其临床诊断很大程度上依赖于医生的经验,缺乏客观统一的标准。提高中医药诊疗体系的可信度与可重复性是中医学向现代化和科学化迈进的先决条件^[3]。因此,用现代科学理论和方法揭示证候的物质基础对更好地传承和发展中医药学至关重要。

随着生命科学技术的发展,多学科交叉与融合在解决复杂系统问题时发挥了巨大的作用,系统生物学^[4]的兴起为中医证候研究提供了新的策略。代谢组学从代谢网络终端的整体角度反映生物体的功能状况^[5,6],与中医学系统观、整体观等理论相吻合。将微观代谢变化与宏观病证相联系,有助于揭示中医证候本质。近几年,将代谢组学技术应用于中医证候研究已有报道。陆益红等^[7]应用气相色谱-质谱(GC-MS)技术对高血压患者血清内源性代谢物进行关联分析,利用马氏距离有效区分高血压3种证型并显示出疾病的发展过程。朱萱萱等^[8]研究不同证候冠心病患者的代谢差异,其中男性健康组、气虚血瘀证和痰阻心脉证,女性健康组、气虚血瘀证、痰阻心脉证和气阴两虚证都有较高的区分度。通过分析代谢物谱差异性以及筛选潜在的生物标志物,用客观定量指标规范证候临床诊断,可为揭示中医证候实质提供切实可行的途径。

糖尿病是严重危害人类健康的全球性流行病,其发病率和死亡率位居癌症、心脑血管病之后第三位^[9]。近年来针对糖尿病发病机理已开展广泛研究,逐步形成了脂毒说和炎症说两种观点^[10],然而临床上尚缺乏治疗糖尿病的有效途径。中医药在治疗糖尿病方面历史悠久,有完整的理论体系和丰富的临床经验^[11],而揭示证候诊断的物质基础是开展个性化治疗的前提。代谢组学技术为证候研究提供了方法学上的支持,能够有效规范证候临床诊断、疗效评价。脂类化合物作为重要的能源物质和信号传导分子,对调节生物体各项生理功能起着重要作用。近年来国内外针对糖尿病脂代谢异常及其与胰岛素抵抗相关性开展了大量工作^[12,13],但结合中医证候

的研究相对较少。本文利用代谢组学技术结合新的数据处理方法,探讨了游离脂肪酸以及血脂指标与中医证候的关系,为中医辨证的科学化和定量化提供一些依据。采用柱前衍生的高效液相色谱法(HPLC)^[14],测定了临床糖尿病患者的脂肪酸代谢谱,结合多种化学信息学方法,对健康组和糖尿病证候组进行区分,同时分析了健康组与中医虚证、中医实证之间的差异性,找到了与证候相关的生物标志物。希望通过我们的工作能够推动中医证候的代谢组学研究,以定性、定量的方式探索中医“证”的诊断和评价指标,为糖尿病的个性化诊断治疗提供一些参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱系统,配备 G1365C MWD 可变波长紫外检测器;脂肪酸标准品:棕榈酸(C16:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈油酸(C16:1)、十七酸(C17:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、 α -亚麻酸(α -C18:3)、 γ -亚麻酸(γ -C18:3)、二十二碳六烯酸(C22:6)、11,14-二十碳二烯酸(C20:2)、花生四烯酸(C20:4)、二十碳五烯酸(C20:5)(SIGMA公司); α -溴代苯乙酮、氢氧化钾、三氯乙酸、正己烷、18-冠醚-6、丙酮等试剂(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司);乙腈为色谱纯;超纯水(Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)制备)。

1.2 样品采集及预处理

根据目前我国国家食品药品监督管理局(SFDA)颁布的《中药新药治疗糖尿病的临床研究指导原则》,糖尿病中医证候诊断主要分为5种证型:阴虚热盛证、湿热困脾证、气阴两虚证、阴阳两虚、血瘀水停证和血瘀络证^[15],其中气虚、阴虚和气阴两虚属于中医虚证,热盛和血瘀属于中医实证;气虚、阴虚、气阴两虚、热盛、血瘀等基本证候特征是中医诊断及个性化治疗的基础。126份血浆样本由天津中医药大学附属医院提供,其中健康样本25例,糖尿病样本101例,按中医证候分为气虚(21例)、阴虚(19例)、气阴两虚(21例)、热盛(19例)、血瘀(21例)。本实验所入选的中医证候案例是对已经确诊的糖尿病患者(空腹血糖值(FPG) > 7

mmol/L) 按照中医临床诊断方法(如主证、次证、舌脉等)进行证候确诊分型。血浆样本在使用前置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻保存。实验时将血浆样本于室温下解冻,精密量取 0.5 mL 血浆于 10 mL 离心管中,加入内标十七酸 $50\text{ }\mu\text{L}$ 和蛋白质沉淀剂三氯乙酸 $100\text{ }\mu\text{L}$, 混合液中加入正己烷 2 mL , 涡旋振荡 2 min , 离心 ($12\ 000\text{ r/min}$) 10 min 。小心取出上清液, 重复提取 3 次, 合并上清液。向提取液中加入 $80\text{ }\mu\text{L}$ 0.05 mol/L KOH 乙醇溶液, 用高纯氮气吹干, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 20 g/L α -溴代苯乙酮(作为衍生试剂)、 $600\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈, 同时加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 10 g/L 18-冠醚-6(作为相转移催化剂), 加塞密封试管, 混合摇匀, 于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 40 min , 用氮气吹干浓缩至 1 mL , 用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后立即进行测定。实验所用玻璃器皿均事先用丙酮漂洗并烘干, 以防止有外来的脂肪酸(如肥皂等)干扰。

与此同时, 采用临床分析测试方法测定了与脂代谢相关的血脂指标中各成分(如总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL))的含量, 以用于数据处理过程中辅助中医证候分型研究。

1.3 HPLC 条件

Waters Symmetry C18 色谱柱 ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 柱温 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: A 相为乙腈, B 相为纯水; 梯度条件: A 相起始为 74% , 40 min 升至 84% , 50 min 升至 95% , 保持 6 min ; 流速为 1.0 mL/min ; 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$; 检测波长为 242 nm 。十七酸作为内标物, 配制成 2 g/L 丙酮溶液; 12 种待测脂肪酸混合溶液中 α -C18:3、 γ -C18:3、C22:6、C14:0、C18:2、C16:1、C16:0、C18:1、C20:2、C18:0 的质量浓度为 0.04 g/L , C20:5、C20:4 的质量浓度为 0.024 g/L 。

1.4 数据处理方法

偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 是代谢组学中最常用的一种有监督的数据处理方法。正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC) 是一种有效的分析信号预处理方法, 其主要是通过剔除数据矩阵中与分类无关的信息, 提高判别效果。本文采用 OSC-PLS-DA 模型来区分健康样本与 5 种中医证候样本, 以及健康样本与中医虚证、中医实证样本间代谢轮廓差异, 探究糖尿病中医临床证状与脂肪酸代谢之间的相关关系。数据处理过程中选择 3 个主成分作为线性判别分析(LDA) 的变量, OSC-PLS-LDA 的模型识别能力通过 5 倍交叉验证进行评估。

非线性判别分析(uncorrelated linear discriminant analysis, ULDA) 是一种有效的判别分析方法, 它试图找到一个满足 S -正交条件的转换矩阵, 并通过该矩阵将原始数据 X 转换到低维空间^[16]。对于一个 $n \times p$ 维的数据的矩阵 X , 其中 n 代表样本数, 而 p 则代表变量数。ULDA 的目标是找到一个线性变换矩阵(transformation matrix) $G(p \times k)$, 使得低维空间数据矩阵 Z 可以通过高维空间原始数据矩阵 X 表示, 即: $Z = XG$, 其中无关判别向量(uncorrelated discriminant vectors, UDVs) 相互正交, 能够在低维空间使组间样本最大化的分离。根据 ULDA 理论, 最佳 UDVs 是 $k - 1$, 其中 k 表示样品中的分组数。同时, 变换矩阵 G 实质上是原始变量组合成新的分类变量的组合系数, 可以反映原始变量对新变量的贡献, 可用于生物标志物的筛选。

本文涉及的数据处理中, OSC-PLS-LDA 和 ULDA 等方法均在 MATLAB 7.1 环境下运行。

2 结果与讨论

2.1 血浆中脂肪酸分析方法的评价

II 型糖尿病的病因、发病机制复杂, 至今还没有统一的结论, 其中胰岛素抵抗和胰岛 β -细胞分泌缺陷是 II 型糖尿病发病机制的两个主要环节。游离脂肪酸在胰岛素抵抗和 II 型糖尿病发生、发展中的重要作用日益受到重视, 也成为近年来国内外研究的热点。本文以 α -溴代苯乙酮为衍生化试剂, 十七酸为内标物, 建立了糖尿病患者血浆中游离脂肪酸代谢谱的分析方法, 获得了 12 种脂肪酸的定量分析结果(见图 1)。与之前三乙胺衍生体系^[17]相比较, 加入 18-冠醚-6 作为相转移催化剂有效地改善了脂肪酸衍生过程的重复性, 尤其是 C16:1 的重复性(用

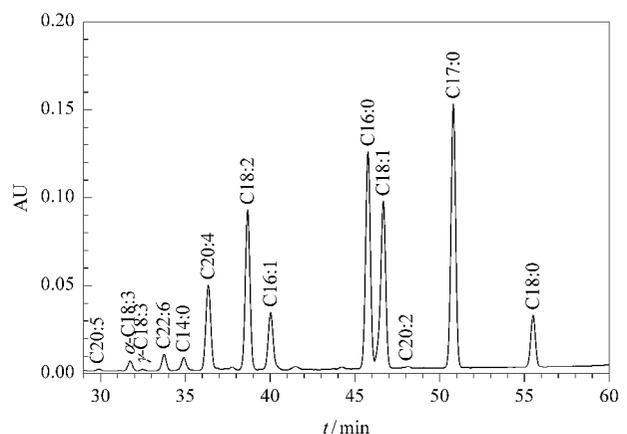


图 1 糖尿病患者血浆中脂肪酸的 HPLC 谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of plasma fatty acids in diabetic patients

相对标准偏差 (RSD) 表示) 从 24.79% 提高到 8.35% ,保证了本方法定量的准确性。表 1 给出了其他方法学数据考察结果 ,结果表明本方法满足生物样本测定要求 ,定量结果准确可靠。

表 1 血浆中脂肪酸柱前衍生高效液相色谱分析方法的评价 (n=5)

Table 1 Method validation of pre-column derivatization for fatty acid analysis by HPLC (n=5)

Fatty acid	Precision (RSD) /%	Repeatability (RSD) /%	Recovery / %	Linearity (R^2)
C14:0	1.31	2.23	96.1	0.996
C16:0	1.08	10.14	102.8	0.993
C16:1	1.16	8.35	93.2	0.995
C18:0	1.90	5.47	95.8	0.991
C18:1	0.97	5.55	102.5	0.994
C18:2	2.52	2.49	97.8	0.993
α -C18:3	1.18	1.23	98.4	0.997
γ -C18:3	1.36	3.46	95.2	0.997
C20:2	1.13	1.82	98.8	0.994
C20:4	1.07	1.87	100.1	0.994
C20:5	1.23	1.30	102.0	0.995
C22:6	1.38	2.19	94.6	0.993

2.2 数据处理结果

参与数据处理的变量为 12 种脂肪酸含量以及 4 个临床血脂指标 (TC、TG、HDL、LDL)。希望通过代谢组学数据处理方法 ,将微观的代谢物谱与中医证候相结合 ,挖掘不同证候与健康以及证候之间的差异性 ,寻找到与证候相关的标志物 ,有效规范临床中医诊断。

2.2.1 健康组与中医 5 种证候组

数据处理首先从健康组与中医 5 种证候组入手 ,通过 OSC-PLS 方法对 5 组样本进行分型。在 PLS 之前运用 OSC 滤噪可以有效提高预测能力 ,降低 PLS 结果的复杂性 ,极大简化模型的可解释性^[18,19]。图 2 给出了气虚、阴虚、气阴两虚、热盛、血瘀 5 组分别与健康组的 OSC-PLS 散点图。从图 2 中可以看出 ,除热盛组样本以外 ,其他 4 种证候组均与健康组样本较好地地区分开。OSC-PLS 模型参数及预测结果见表 2。数据分析结果表明 ,脂肪酸在糖尿病代谢异常的发生和发展过程中起了重要的作用 ,与中医证候之间有着紧密的相关性。

2.2.2 健康组与中医虚证组、中医实证组

糖尿病属中医学消渴范畴 ,消渴以阴虚为本 ,燥热为标 ,其中气虚、阴虚、气阴两虚为中医虚证 ,是糖尿病的病因 ;而热盛、血瘀为中医实证 ,是糖尿病病理表现。如果能够利用代谢组学方法将这两类病证分开 ,筛选出相关的标志物 ,有利于更好地掌握患者的病情发展 ,及时给出有效的治疗方案。

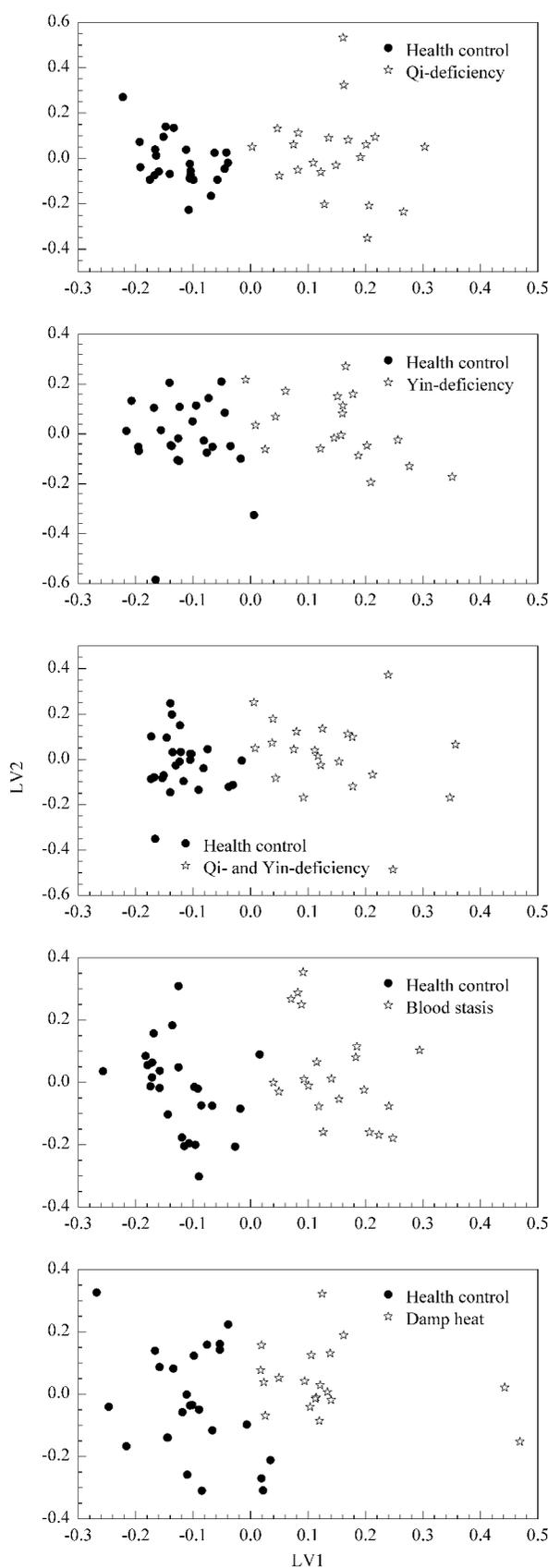


图 2 健康组与 5 种不同中医证候组的 OSC-PLS 模型的得分矩阵图

Fig. 2 OSC-PLS score plots of five TCM syndromes and health control

表 2 健康组与 5 种不同中医证候组的 OSC-PLS 模型参数
Table 2 Parameters of OSC-PLS model for five TCM syndromes and health control

Parameter	Qi-deficiency	Yin-deficiency	Qi- and Yin-deficiency	Blood stasis	Damp heat
$R^2 X$	0.684	0.677	0.724	0.667	0.552
$R^2 Y$	0.837	0.778	0.779	0.858	0.67
Prediction	1	0.955	0.978	0.978	0.909
Recognition	0.976	0.948	1	0.98	0.974
Correct rate	0.982	0.968	0.993	0.98	0.968

首先利用 OSC-PLS 对健康、中医虚证和中医实证 3 组样本进行数据处理。从图 3 的结果可以看出 3 组样本的分型结果并不理想,只有健康样本与中医实证样本之间得到了相对较好的分型;而健康样本与中医虚证样本之间以及中医虚证样本与中医实证样本之间重叠严重,很难区分开。判别模型参数 $R^2 X$ 与 $R^2 Y$ 分别为 0.469 和 0.461,模型的预测率和识别率分别为 67.54% 和 72.39%。OSC-PLS 结果也在意料之中,因为对于中医虚证、中医实证这种同一疾病不同程度或不同状态是很难用简单的模型进行分类的,其代谢谱的差异性要比健康与患病之间小得多,因此需要建立更加稳健的模型进行分类。基于这样的思想,我们引入了代谢组学中一种比较新的数据处理方法 ULDA 来解决代谢谱之间差异性比较小的情况下的分组问题^[20-21]。图 4 是 ULDA 处理的结果,从图 4 中可以看出 3 组样本具有明显的分组效果,ULDA 模型的预测率和识别率分别为 92.11% 和 95.34%,与 OSC-PLS 的结果相比有明显的提高。数据处理结果也表明健康、中医虚证、中医实证之间确实存在着代谢层面的差异,而这种差异性能较好地通过脂肪酸代谢谱以及血脂指标反映出来,也有力证明了将代谢组学应用于中医证候研究具有一定的优势和可行性。此外,通过数据处理找到了与健康、中医虚证以及中医实证分型相关的代谢标志物。C20:2、C20:5、TG 和 HDL 承载着分

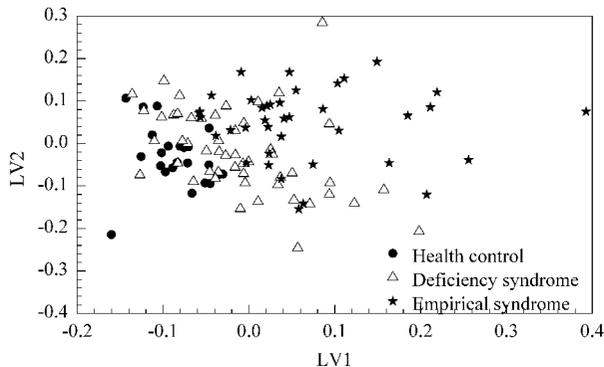


图 3 健康、中医虚证、中医实证 3 组 OSC-PLS 模型的得分矩阵图
Fig. 3 OSC-PLS score plots of TCM deficiency syndrome, TCM empirical syndrome and health control

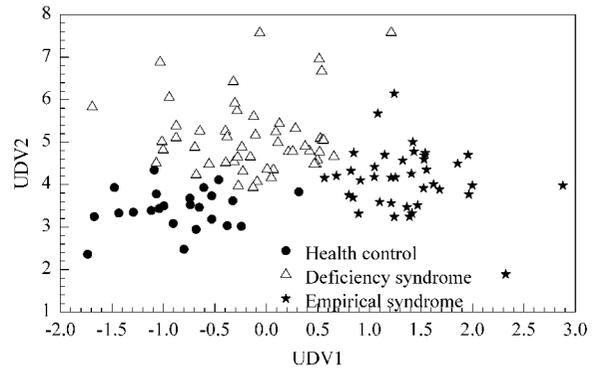


图 4 健康、中医虚证、中医实证 3 组 ULDA 模型的得分矩阵图
Fig. 4 ULDA score plots of TCM deficiency syndrome, TCM empirical syndrome and health control

组的重要信息(见图 5),对分类结果影响较大。为验证所选潜在生物标志物的可靠性,采用 t -检验方法验证 4 个标志物是否存在显著性的组间差异。 t -检验结果表明,中医虚证与健康组、中医实证与健康组的 4 个标志物均表现出显著性差异 $p < 0.0001$;此外,对于中医虚证与中医实证之间同样存在显著性差异,其中 C20:2 与 HDL 的 $p < 0.05$,与 C20:5 的 $p < 0.005$,与 TG 的 $p < 0.0001$ 。 t -检验结果也说明了 ULDA 所选标志物确实存在组间差异性,可以作为辅助临床诊断的潜在标志物。

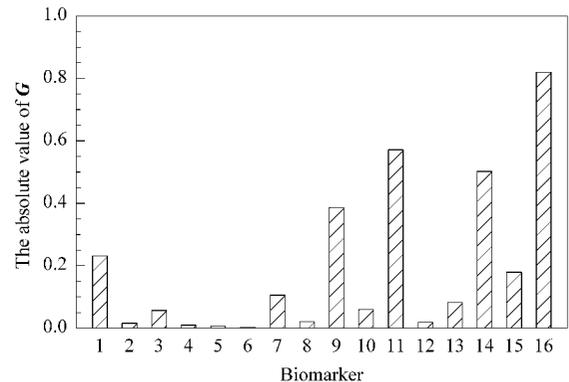


图 5 健康组、中医虚证、中医实证 3 组的 ULDA 标志物图
Fig. 5 Biomarkers based on ULDA of TCM deficiency syndrome and health control

1. C14:0; 2. C16:0; 3. C16:1; 4. C18:0; 5. C18:1; 6. C18:2; 7. α -C18:3; 8. γ -C18:3; 9. C20:2; 10. C20:4; 11. C20:5; 12. C22:6; 13. TC; 14. TG; 15. LDL; 16. HDL.

3 结论

中医证候是中医整体观和辩证观的体现,是中医基础研究的关键性问题。本研究将代谢组学理念与技术用于中医证候的研究,是中医证候本质方面研究的一项新突破。通过对糖尿病中医证候患者血浆中脂肪酸代谢谱的定量研究,并结合非线性判别分析的数据处理方法,筛选出与证候相关的潜在生物标志物,可以有效提高中医诊疗的科学性、客观性,减少人为因素的误诊。将代谢组学与中医证候相结合,为中医个性化诊疗体系的发展提供了新的思路,将有力地推动中医药现代化的进程。

参考文献:

- [1] Zhang A H, Sun H, Wang Z G, et al. *Planta Medica*, 2010, 76: 2026
- [2] Pan Z Q, Fang Z Q. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine* (潘志强, 方肇勤. 中国中医药信息杂志), 2009, 16(1): 104
- [3] Li F L, Liang R. *Journal of Liaoning Traditional Chinese Medicine* (李方玲, 梁嵘. 辽宁中医杂志), 2006, 33(4): 386
- [4] Kitano H. *Science*, 2002, 295(5560): 1662
- [5] Nicholson J K, Lindon J C. *Nature*, 2008, 455: 1054
- [6] Xu G W, Yang J. *Chinese Journal of Chromatography* (许国旺, 杨军. 色谱), 2003, 21(4): 316
- [7] Lu Y H, Hao H P, Wang G J, et al. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (陆益红, 郝海平, 王广基, 等. 中国临床药理学与治疗学), 2007, 12(10): 1144
- [8] Zhu X X, Wang G J, A J Y, et al. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine* (朱萱萱, 王广基, 阿基业, 等. 中华中医药学刊), 2009, 27(6): 1267
- [9] Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. *Diabetes Res Clin Pr*, 2010, 87(6): 4
- [10] Taubes G. *Science*, 2009, 325: 256
- [11] Ning G, Hong J, Bi Y F, et al. *Diabetes*, 2009, 1: 163
- [12] Yi L Z, Yuan D L, Che Z H, et al. *Metabolomics*, 2008, 4: 30
- [13] Zhao S M, Zheng H, Lu X, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (赵素敏, 郑虹, 路鑫, 等. 色谱), 2011, 29(4): 307
- [14] Mehta A, Oeser A M, Carlson M G. *J Chromatogr B*, 1998, 719: 9
- [15] Zheng X Y. *Guiding Principles for Clinical Research on Traditional Chinese Medicine New Drugs*. Beijing: China Medical Science and Technology Press (郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则. 北京: 中国医药科技出版社), 2002
- [16] Zhang M G, Tong P J, Wang W M, et al. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2011, 105: 207
- [17] Xu W J, Huang Y H, Wang L X, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (徐文娟, 黄宇虹, 王龙星, 等. 色谱), 2010, 28(6): 547
- [18] Wold S, Trygg J, Berglund A, et al. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2001, 58: 131
- [19] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469
- [20] Ye J, Janardan R, Li Q, et al. *IEEE Trans Knowl Data Eng*, 2006, 18: 1312
- [21] Yuan D L, Liang Y Z, Yi L Z, et al. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2008, 93: 70