

ESI-MS/MS를 이용한 아실카르니틴과 아미노산의 정량분석

김호현* · 한상범 · 윤혜란

(재) 서울의과학연구소

(2001. 8. 2. 접수)

Quantitative Analysis of Acylcarnitines and Amino Acids Using ESI-MS/MS

Hohyun Kim, Sang-Beom Han, Hye-Ran Yoon

Department of Special Biochemistry, Seoul Medical Science Institute (SCL),

7-14, Dongbinggo-dong, Yongsan-gu, Seoul, 140-809, KOREA

(Received Aug. 2, 2001)

요약 : 본 연구에서는 ESI-MS/MS를 이용해 혈액내에서 아실카르니틴과 아미노산을 신속하게 정량분석하는 방법을 개발하였다. 아실카르니틴과 아미노산은 3N butanolic hydrogen chloride를 사용하여 유도체화 과정을 거친 뒤 이중질량분석기로 분석하였다. 아실카르니틴은 precursor 85 ion scan을 사용하여 분석하였고, 아미노산들중 알라닌, 발린, 루신/이소루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신, 아스파르트산, 글루탐산 등은 neutral loss 102 scan, 오르니틴과 시트룰린은 neutral loss 119 scan, 글리신은 neutral loss 56 scan, 아르기닌은 neutral loss 161 scan 그리고 아르기니노석시닉산은 product ion 459 scan을 사용하여 분석하였다. 이 방법은 일반적인 액체 크로마토그래피나 아미노산 분석기에 비해서 시료의 전처리가 비교적 간단하며, 높은 감도와 좋은 재현성을 보여주었다.

Abstract : In this study, a new quantitative analytical method has been developed for the rapid determination of acylcarnitines and amino acids in human blood using electrospray ionization / tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Acylcarnitines and amino acids were analyzed by tandem mass spectrometry after conversion to their butylesters through treatment with 3N butanolic hydrogen chloride. Acylcarnitines were analyzed using precursor 85 ion scan and alanine, valine, leucine/isoleucine, methionine, phenylalanine, tyrosine, aspartic acid and glutamic acid were analyzed using neutral loss 102 scan, ornithine and citrulline were analyzed neutral loss 119 scan, glycine was analyzed using neutral loss 56 scan, arginine was analyzed using neutral loss 161 scan and argininosuccinic acid was analyzed product ion 459 scan. This method reduced sample preparation time compared to that with conventional amino acid analyzer and liquid chromatography, with high sensitivity and good reproducibility.

Key words : electrospray ionization, tandem mass spectrometry, acylcarnitine, amino acid

1. 서 론

아실카르니틴은 양쪽성 이온으로 극성이면서, 발색

단이 없는 비휘발성 화합물로 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)나 기체 크로마토그래피(GC)로 분석이 가능하다. 아실카르니틴을 브로모펜아실 에스테르로 유도체화하여 HPLC/UV로 검출할 경우, 유기산이 방해물질로 작용하고 정량한계(LOQ)가 높아진다¹. 그리고

★ Corresponding author

Phone : +82+(02)-790-6500 Ext.279, Fax : +82+(02)-790-6517

E-mail : novakim@scllab.co.kr

GC/MS로 분석시, 알칼리 가수분해한 후 유리된 산을 메틸에스테르로 만들거나, 염기를 촉매로하여 고리화를 한 후 demethylation된 유도체를 검출하는데² 이 또한 복잡한 전처리 과정이 필요하다. 또한 아미노산 분석을 위해서 현재 가장 널리 사용되고 있는 방법으로는 혈액으로부터 혈장을 분리해 제단백과정을 거친 뒤 아미노산 분석기를 사용하여 분석하는 방법이다. 하지만 이 방법 또한 많은 분석시간을 필요로 한다.

이와 같이 약 10여년전만해도 환자의 체액으로부터 과도하게 분비되는 비정상적인 대사물을 GC/MS나 아미노산 분석기로 분석하는 방법이 가장 효과적이고 일반적인 분석법이었다^{3,5}. 유전성대사질환 진단에 GC/MS를 처음으로 적용한 예일대학의 Tanaka 등은 1967년 GC/MS를 이용하여 최초로 다양한 대사체 분석을 통한 체계적인 연구를 하였고, 이후 GC/MS를 이용한 진단은 Jellum 및 Charmers 등에 의해 체계적인 진단방법으로² 발전하게 되었다. 그러나 위에서 언급한바와 같이 GC/MS를 이용하여 대사질환을 진단할 경우 시료 전처리 및 분석시간이 길다는 점과 휘발성이 없는 많은 생체 대사물질들의 확인이 어렵다는 단점이 있다.

따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 도입된 것이 FAB-MS를 이용한 분석이다^{6,8}. 하지만 FAB-MS 또한 문제점이 여전히 남아 있다. FAB-MS에 의한 혈장 중 아실카르니틴 분석법은 정량한계가 상당히 높게 나타났다. 이후 FAB-MS/MS⁹, continuous flow FAB-MS¹⁰, secondary ion MS¹¹ 등 아실카르니틴 및 아미노산 분석을 위해 다양한 기법이 보고되고 있다.

본 연구에서 아실카르니틴 및 아미노산의 부틸에스테르는(Fig. 1) 이미 양전하를 가지고 있으므로 이동상에 따로 검출이 용이하도록 소량의 초산이나 trifluoroacetic acid 등과 같은 첨가제를 넣지 않아도 positive ESI-MS/MS 분석에 적합하다.

탠덤질량분석기(MS/MS)에서 선구이온(precursor ion) scan을 이용할 경우, 특징적인 딸이온으로 분열되는 모든 어미이온들의 스펙트럼을 얻을 수 있으므로 혼합물중 같은 딸이온을 내는 화합물군을 분류할 수 있으며, 아실카르니틴 분석의 경우 m/z 85를 갖는(Fig. 2) precursor scan을 사용하여 분석하였다. Neutral loss scan을 이용할 경우, Q1과 Q3가 항상 일정한 질량차를 가지는 화합물군을 확인 분류할 수 있으며, 아미노산 분석의 경우 m/z 56, 102(Fig. 2), 119, 161을 갖는 neutral loss scan을 사용하여 분석하였다. 그리고 아르

기니노석시닉산의 경우 product ion scan을 사용하여 분석하였다.

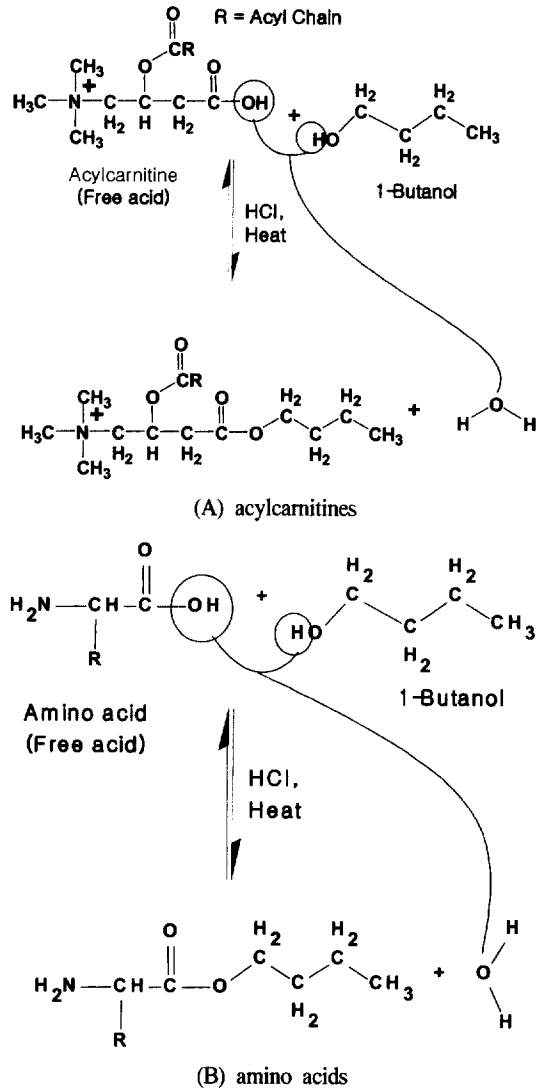


Fig. 1. Butyl esterification of acylcarnitines and amino acids.

본 연구에서는 유기산, 지방산, 아미노산대사이상질환을 진단하고자하는 목적으로, 이들을 진단할 수 있는 지표가 되는 아실카르니틴과 아미노산을 ESI-MS/MS로 위와 같은 여러 가지 scan 방법을 사용하여 정량분석하였다. 이 방법은 기존의 방법에 비해 빠른 분석시간과 고감도, 그리고 좋은 재현성을 보여 주었기에 이를 보고하고자 한다.

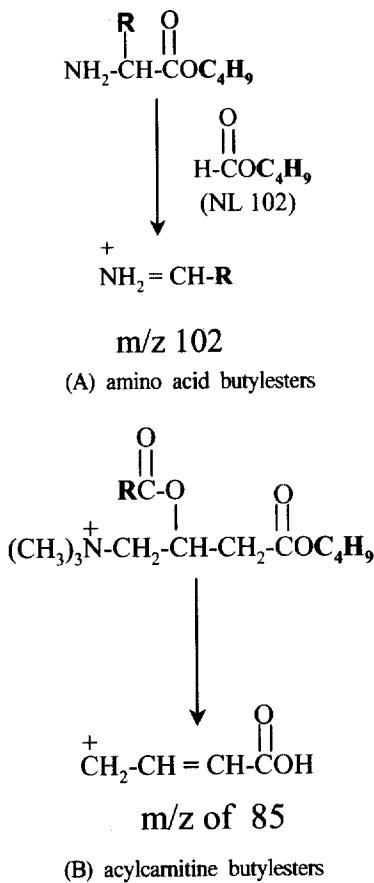


Fig. 2. CID fragmentation pattern of acylcarnitine and amino acid butylesters. (A) Common neutral loss ion of m/z 102 from CID of amino acid butylesters, (B) Common precursor ion of m/z 85 from CID of acylcarnitine butylesters.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

본 연구에서 사용한 아실카르니틴 내부표준물질(아세틸카르니틴-d₃, 프로피오닐카르니틴-d₃, 부틸카르니틴-d₃, 옥타노일카르니틴-d₃, 헥사데카노일카르니틴-d₃)은 Adelaide(women's and children's hospital adelaide, Australia)로부터 지원을 받았고, 아미노산 내부표준물질(글리신-d₂, 알라닌-d₄, 발린-d₈, 루이신-d₃, 메티오닌-d₃, 페닐알라닌-d₅, 타이로신-d₆, 아스파르트산-d₃, 글루탐산-d₃, 오르니틴-d₂, 시트룰린-d₂, 아르기닌-d₃)은 Cambridge Isotope Laboratories Inc.(MA, USA)로부터 구입하였다. 부틸에스테르화를 위해 사용한 3N butanolic hydrogen

chloride는 REGIS사(IL, USA)로부터 구입하였다. 그리고 아세토니트릴, 물, 메탄올 등의 용매는 Fisher scientific으로부터 구입하여 사용하였다.

그리고 본 연구에서 사용한 electrospray ionization tandem mass spectrometer로는 Wallac사(Wallac Perkin-Elmer, USA)에서 나온 API 2000 모델을 사용하였으며, 이동상을 흘려주기 위해 사용한 펌프로는 PerkinElmer에서 나온 series 200 마이크로펌프를 사용하였다. 그리고 시료를 텐델질량분석기(MS/MS)에 주입하기 위하여 PerkinElmer series 200 autosampler를 사용하였으며, 부틸에스테르화 과정을 위해 wallac사의 incubator/shaker를 사용하였다. 본 연구에서 사용한 전체적인 시스템은 Fig. 3에 나타내었다.

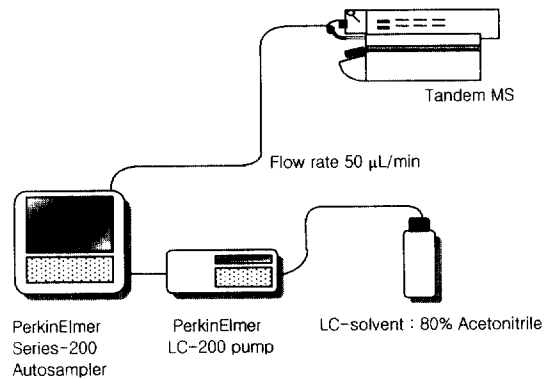


Fig. 3. Schematic diagram of on-line system.

2.2. 실험방법

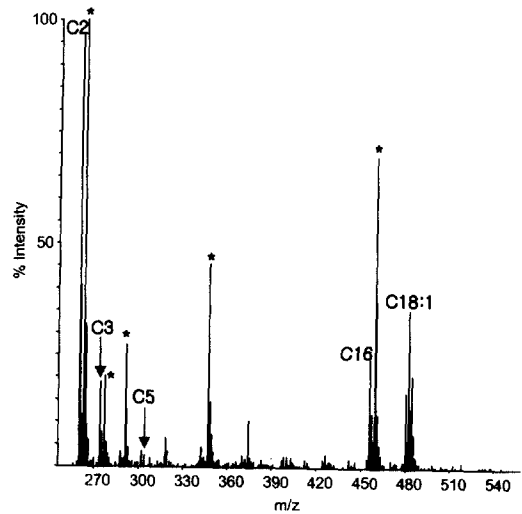
우선 혈액을 혈액여지(filter paper, Schleicher and Schunel, S&S #903; Dassel, Germany)에 75 µL를 적신 뒤 24시간동안 실온에서 건조시킨다. 완전히 건조된 혈액여지는 DBS puncher를 이용하여 3.2 mm(1/8") 크기로 천공하고, 이를 96-well microplate에 담는다. 일반적으로 3.2 mm 크기의 혈액여지는 3 µL의 혈액을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 혈액 spot이 담긴 96-well microplate에 아실카르니틴과 아미노산의 내부표준물질이 섞인 80 % 메탄올 용액을 150 µL 넣은 뒤 incubator/shaker에서 30분간 흔들어준다. 흔들어줌이 끝난 후에는 60 °C에서 질소를 이용하여 완전히 건조시켰다. 이와 같이 시료를 추출한 뒤 다음으로 는 유도체화 과정을 거친다. 유도체화는 앞에서 추출한 후 완전히 건조시킨 96-well microplate에 3N butanolic hydrogen chloride를 150 µL씩 넣고, 60 °C

하에서 20분간 incubator/shaker에서 흔들어준다. 이렇게 하여 유도체화 과정을 끝낸 뒤, 앞 방법과 동일한 방법으로 완전히 건조시킨다. 그리고 마지막으로 80% 아세트니트릴 150 μ L를 96-well microplate에 넣어 주고, 30분간 incubator/shaker에서 흔들어준다. 이렇게 하여 전처리가 모두 끝나면 autosampler를 이용하여 텐덱질량분석기에 시료를 주입하였다. 이동상으로는 80% 아세트니트릴을 사용하였고, 시료의 주입량은 2 μ L, 이동상의 유속은 50 μ L/min, 충돌가스로는 고순도 질소를 사용하였다. 아실카르니틴 프로파일을 얻기 위해서 m/z 250-550의 범위에서 precursor ion 85 scan을 하도록 설정하였고, 아미노산 프로파일을 얻기 위해서 m/z 120-300의 범위에서 neutral loss 102 scan, m/z 120-300의 범위에서 neutral loss 119 scan, m/z 90-180의 범위에서 neutral loss 56 scan, m/z 190-280의 범위에서 neutral loss 161 scan 그리고 혈액내에서 아르기니노석시닉산이 나오는지 알아보기 위해 product 459 scan을 하였다. 또한 회수율 및 재현성 실험을 위해 아세틸카르니틴, 페닐알라닌, 시트룰린에 대해서 실험하였다.

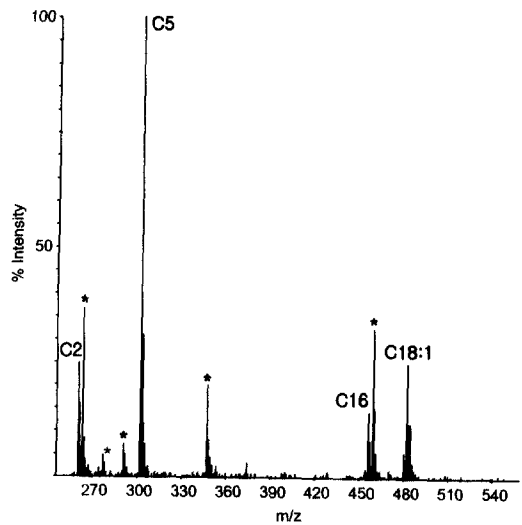
3. 결과 및 고찰

아실카르니틴 분석(precursor ion 85 scan)의 최적 MS/MS 조건은 declustering potential(DP)이 40.0 V, focusing potential(FP)이 391.0 V, entrance potential(EP)이 -9.0 V, collision cell entrance potential(CEP)이 18 V, collision energy(CE)가 43 V, collision cell exit potential(CXP)이 2 V, deflector(DF)가 -150 V, channel electron multiplier(CEM)가 2000 V, collision activated dissociation gas(CAD)가 6 psi, curtain gas(CUR)가 25 psi, nebulizer gas(NG)가 15 psi, auxiliary gas(AG)가 40 psi, ionspray voltage(ISV)가 5500 V 그리고 ion source 온도는 200 $^{\circ}$ C이다. 다음의 Fig. 4 (A)는 위의 MS/MS 최적조건하에서 얻은 정상인의 스펙트럼이고, Fig. 4 (B)는 isovaleric aciduria라는 유기산대사이상질환 환자의 스펙트럼이다. Fig. 4 (B) 환자의 스펙트럼에서 보듯이 환자의 경우 이소발레릴카르니틴(C5)이 정상인에 비해 상당히 많이 증가함을 알 수 있다. 그리고 스펙트럼에서 *로 표시된 것은 아실카르니틴의 내부표준물질들로 순서대로 아세틸카르니틴(C2-d₃), 프로피오닐카르니틴(C3-d₃), 부티릴카르니틴(C4-d₃), 옥타

노일카르니틴(C8-d₃), 헥사데카노일카르니틴(C16-d₃) 등이다. Fig. 4에서 보듯이 ESI-MS/MS 방법을 이용한 아실카르니틴 분석은 임상학적으로 유기산 및 지방산 대사이상질환을 신속·정확하게 진단할 수 있는 방법이 될 수 있다.



(A) Normal



(B) Isovaleric aciduria

Fig. 4. Blood acylcarnitine profiles obtained by ESI-MS/MS analysis, scanning for precursor ion of m/z 85. (A) normal, (B) a case of isovaleric aciduria(IVA).

다음으로 아미노산들중 알라닌, 발린, 루신/이소루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신, 아스파르트산, 글

루탐산 분석(neutral loss 102 scan)의 최적 MS/MS 조건은 declustering potential(DP)이 25.0 V, focusing potential(FP)이 391.0 V, entrance potential(EP)이 -8.0 V, collision cell entrance potential(CEP)이 12 V, collision energy(CE)가 21 V, collision cell exit potential(CXP)은 5 V이고 DF, CEM, CAD, CUR NG, AG, ISV, Temp 등은 앞과 동일한 값을 사용하였다. 다음의 Fig. 5 (A)는 위의 MS/MS 최적조건하에서 얻은 정상인의 스펙트럼이

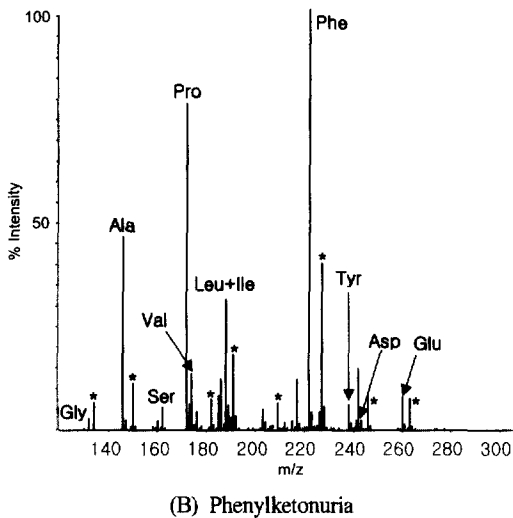
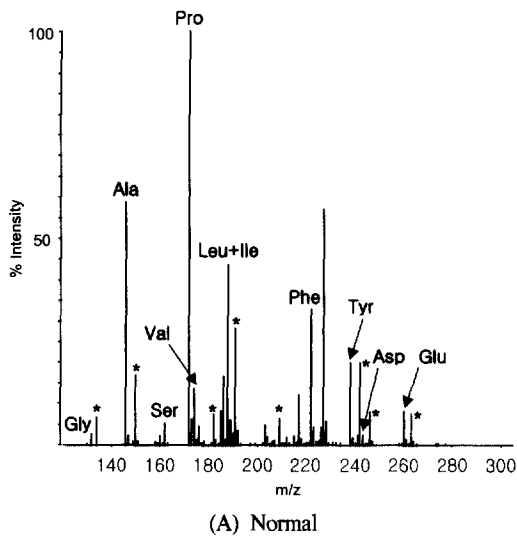


Fig. 5. Blood amino acid profiles obtained by ESI-MS/MS analysis, scanning for neutral loss ion of m/z 102. (A) normal, (B) a case of phenylketonuria(PKU).

고, Fig. 5 (B)는 phenylketonuria(PKU)라는 아미노산대사이상질환 환자의 스펙트럼이다. Fig. 5 (B) 환자의 스펙트럼에서 보듯이 환자의 경우 페닐알라닌(m/z 222)이 정상인에 비해 상당히 많이 증가함을 알 수 있다. 그리고 스펙트럼에서 *로 표시된 것은 아미노산의 내부표준물질들로 순서대로 글리신- d_2 , 알라닌- d_4 , 발린- d_6 , 루이신- d_3 , 메티오닌- d_3 , 페닐알라닌- d_5 , 타이로신- d_6 , 아스파르트산- d_3 , 글루탐산- d_3 등이다. Fig. 5에서 보듯이 ESI-MS/MS 방법을 이용한 아미노산 분석은 임상학적으로 아미노산대사이상질환을 신속, 정확하게 진단할 수 있는 방법이 될 수 있다.

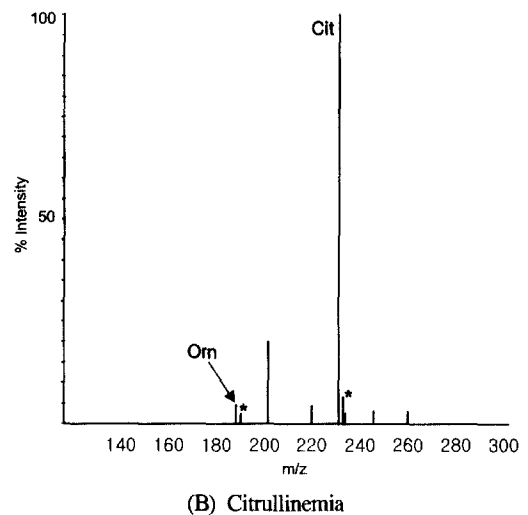
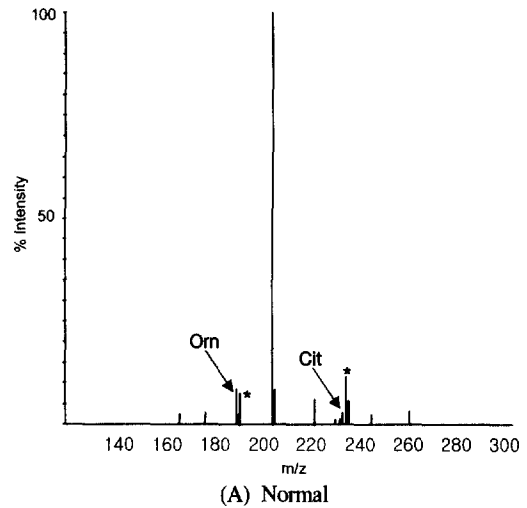
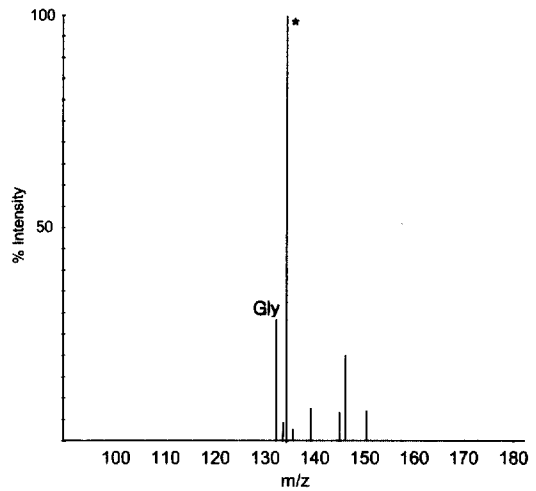


Fig. 6. Blood amino acid profiles obtained by ESI-MS/MS analysis, scanning for neutral loss ion of m/z 119. (A) normal, (B) a case of citrullinemia.

그리고 아미노산들중 오르니틴과 시트룰린 분석(neutral loss 119 scan)의 최적 MS/MS 조건은 declustering potential(DP)이 27.0 V, focusing potential(FP)이 391.0 V, entrance potential(EP)이 -6.0 V, collision cell entrance potential(CEP)이 9V, collision energy(CE)가 29 V, collision cell exit potential(CXP)이 4 V이다. 다음의 Fig. 6 (A)는 위의 MS/MS 최적조건하에서 얻은 정상인의 스펙트럼이고, Fig. 6 (B)는 citrullinemia라는 아미노산대사이상질환 환자의 스펙트럼이다. Fig. 6 (B) 환자의 스펙트럼에서 보듯이 환자의 경우 시트룰린(m/z 232)이 정상인에 비해 상당히 많이 증가함을 알 수 있다. 그리고 스펙트럼에서 *로 표시된 것은 아미노산의 내부표준물질들로 순서대로 오르니틴-d₂, 시트룰린-d₂ 등이다.

그 외 글리신 분석(neutral loss 56 scan)의 최적 MS/MS 조건은 declustering potential(DP)이 23.0 V, focusing potential(FP)이 391.0 V, entrance potential(EP)이 -7.0 V, collision cell entrance potential(CEP)이 6 V, collision energy(CE)가 13 V, collision cell exit potential(CXP)이 10 V이다. 그리고 아르기닌 분석(neutral loss 161 scan)의 최적 MS/MS 조건은 declustering potential(DP)이 28.0 V, focusing potential(FP)이 391.0 V, entrance potential(EP)이 -9.0 V, collision cell entrance potential(CEP)이 14 V, collision energy(CE)가 47 V, collision cell exit potential(CXP)이 9 V이다. 다음의 Fig. 7 (A), (B) 이렇게 하여 얻은 글리신, 아르기닌의 스펙트럼이다. 그리고 스펙트럼에서 *로 표시된 것은 글리신과 아르기닌의 내부표준물질이다.



(B) Neutral loss ion of m/z 56

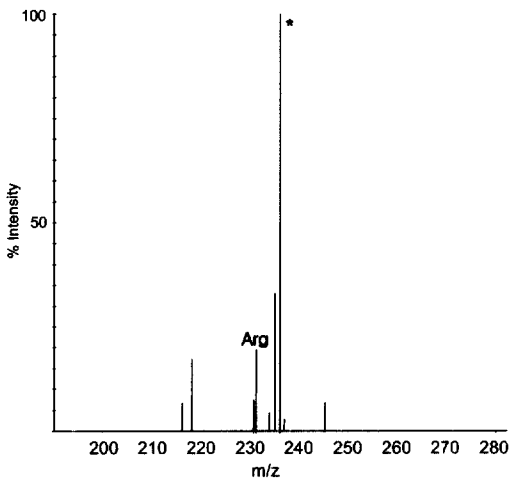
Fig. 7. Blood amino acid profiles obtained by ESI-MS/MS analysis. (A) scanning for neutral loss ion of m/z 161, (B) scanning for neutral loss ion of m/z 56.

마지막으로 아르기니노석신산 분석(product ion 459 scan)의 최적 MS/MS 조건은 declustering potential(DP)이 81.0 V, focusing potential(FP)이 350.0 V, entrance potential(EP)이 -9.5 V, collision cell entrance potential(CEP)이 18 V, collision energy(CE)가 73 V, collision cell exit potential(CXP)이 8 V이다. 일반적으로 정상인의 혈액으로부터는 아르기니노석시닉산은 나오지 않는다. 아르기니노석시닉산이 혈액으로부터 검출이 되면 임상학적으로 argininosuccinic aciduria라는 아미노산대사이상질환을 가지고 있는 것이 된다. 따라서 정상인으로부터는 아르기니노석시닉산의 스펙트럼을 얻을 수 없다.

본 연구에서는 아실카르니틴과 아미노산의 정량을 위해 다음 식(1)과 같은 방법을 사용하였다.

$$\text{Conc. of analyte} = \frac{150 \mu\text{L}}{3 \mu\text{L}} \cdot \text{Conc. of IS} \cdot \frac{\text{Intensity of analyte}}{\text{Intensity of IS}} \dots\dots\dots(1)$$

위 식에서 보듯이 150 μL는 내부표준물질이 포함된 추출용매(메탄올)의 양이고 3 μL는 3.2 mm크기로 천공한 혈액여지의 양이다. 여기에 내부표준물질의 농도를 곱하고 여기에 시료/내부표준물질의 Intensity를 곱하면 시료의 농도가 계산된다. 그러나 이 식 (1)을



(A) Neutral loss ion of m/z 161

사용하기 위해서는 시료 및 내부표준물질이 정량을 위한 선형범위(linear range) 안에 들어가야 한다. 이를 위해서 아실카르니틴과 아미노산에 대해 검출한계 및 정량을 위한 선형범위를 구하였고, 검량선을 이용한 정량법과 비교하였다. 또한 정상인 100명의 시료에 대해 모두 선형범위안에 들어가는지 확인하였다(Table 1).

Table 1. Concentration of acylcarnitines and amino acids in human blood

Analyte	Concentration of lower 95%	Concentration of upper 95%
acetylcarnitine (C2)	1.590	17.850
propionylcarnitine (C3)	0.202	7.895
butyrylcarnitine (C4)	0.024	0.890
isovalerylcarnitine (C5)	0.088	0.908
hexanoylcarnitine (C6)	0.120	0.368
octanoylcarnitine (C8)	0.074	0.233
myristoylcarnitine (C14)	0.043	0.251
palmitoylcarnitine (C16)	0.297	6.505
oleylcarnitine (C18:1)	0.140	2.898
alanine	48	547
valine	74	321
leucine+isoleucine	71	323
methionine	7	60
phenylalanine	26	137
tyrosine	24	147
aspartic acid	20	129
glutamic acid	62	620
ornitine	10	211
citrulline	10	46
arginine	6	140
glycine	124	740

Unit : nmol/mL

아실카르니틴의 경우, precursor 85 ion scan을 사용했을 때 검출한계는 아세틸카르니틴이 150 pM이고, 그 외 다른 아실카르니틴은 모두 200 pM의 검출한계를 가졌다. 그리고 정량을 위한 선형범위는 모두 10 nM에서 20 μ M 정도로 비슷하였다. 여기서 사용한 시료의 주입량은 2 μ L, 이동상의 유속은 50 μ L/min로 앞의 실험방법에 나타난 방법과 같은 방법을 사용하였다. 아미노산 경우, 검출한계는 발린이 5 nM이고, 그 외 다른 아미노산은 모두 2 nM의 검출한계를 가졌다. 그리고 정량을 위한 선형범위는 모두 300 nM에서

850 μ M 정도로 비슷하였다. Table 1에서 보듯이 정상인 100명의 upper 95%의 농도와 lower 95%의 농도가 모두 선형범위안에 있음을 확인할 수 있다.

한편 페닐알라닌과 시트룰린을 가지고, 검량선을 이용한 정량과 위의 식(1)을 사용하여 얻은 정량값을 비교한 결과 오차가 5% 미만으로 거의 비슷함을 알 수 있었다. 즉 이것은 정량을 위한 선형범위 안에서는 농도가 2배 증가하면 시료의 intensity도 거의 비례적으로 2배 증가함을 나타내는 것이다. 다음의 Fig. 8은 페닐알라닌과 시트룰린에 대한 검량선을 나타낸 것이다.

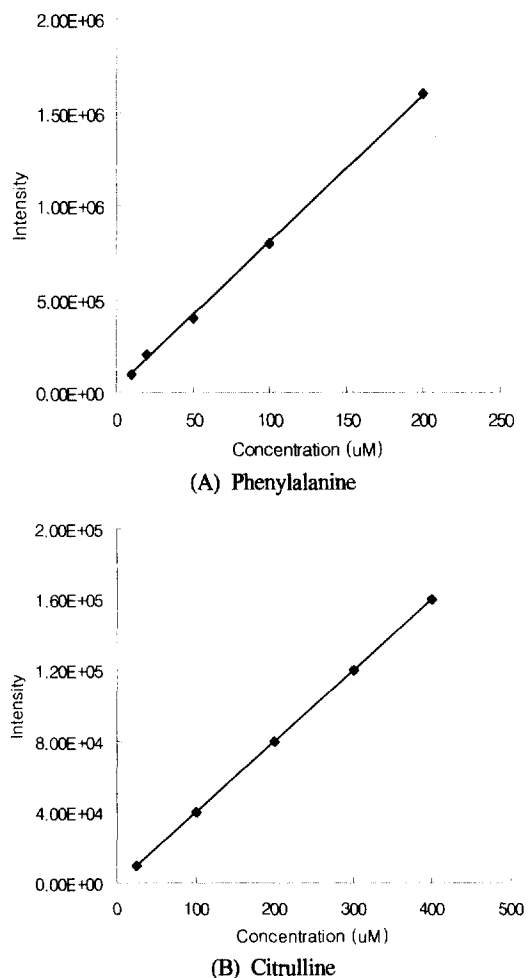


Fig. 8. Calibration curve of phenylalanine and citrulline.

마지막으로 페닐알라닌과 시트룰린을 사용하여 회수율 및 재현성 실험을 하였다. 회수율 실험은 농도를 알고 있는 EDTA 혈액에 진한농도(3000 μ M)의 페닐라

닌과 시트룰린을 소량 spike하여 전체 spike한 농도가 200 μ M, 800 μ M이 되게 하고난 뒤 spike를 하지 않은 EDTA 혈액의 농도를 빼주어서 계산하였다. 그리고 재현성은 회수율 측정 실험을 12회 하여 얻은 값을 상대표준편차(RSD)로 나타내었다. 다음의 Table 2는 이에 대한 결과를 나타낸 것이다.

Table 2. Recovery and precision of phenylalanine and citrulline (n=12)

Analyte	Spike 200 μ M (Recovery)	RSD (%)	Spike 800 μ M (Recovery)	RSD (%)
Phenylalanine	201.3 \pm 4.7 μ M (100.6%)	2.3	809 \pm 13.8 μ M (101.1%)	1.7
Citrulline	194.3 \pm 5.8 μ M (97.2 %)	3.0	810 \pm 20.1 μ M (101.3%)	2.5

n=12 : number of data point

4. 결 론

본 연구에서는 임상학적 진단을 위한 목적으로 electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)를 사용하여 기존의 방법보다 신속, 정확하게 아실카르니틴과 아미노산을 정량분석하였다. ESI-MS/MS를 사용하기 위해 필요한 전처리 시간은 기존의 다른 분석방법들 보다 많은 시간을 단축시켰을 뿐만 아니라, 시료를 분석하는 시간 또한 상당히 많이 단축시켰다. 본 연구결과에서 아실카르니틴은 precursor ion 85 scan에서 선택적으로 검출 할 수 있었다. 그리고 아미노산들중 알라닌, 발린, 루신/이소루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신, 아스파르트산, 글루탐산 등은 neutral loss 102 scan을 사용하여 검출 할 수 있었으며, 오르니틴과 시트룰린은 neutral loss 119 scan, 글리신은 neutral loss 56 scan, 아르기닌은 neutral loss 161 scan 그리고 아르기니노석시닉산은 product ion 459 scan을 사용하여 선택적으로 다른 간섭 없이 검출

할 수 있었다. 앞으로 이 방법은 유기산, 지방산 아미노산대사이상질환을 선별 검사할 수 있는 방법이 되리라 기대된다.

참고문헌

1. M. S. Rashed, M. P. Bucknall, D. Little, A. Awad, M. Jacob, M. Alamoudi, M. Alwattar and P. T. Ozand, *Clin. Chem.*, **43**, 1129-1141 (1997).
2. R. A. Chalmers and A. M. Lawson, "Organic acid in Man", Chapman and Hall, London, 1982.
3. P. Rinaldo, J. T. O'Shea, R. D. Welch and K. Tanaka, *New Engl. J. Med.*, **319**, 1308-1313 (1988).
4. C. R. Roe, D. S. Millington, D. A. Maltby and P. Kinnebrew, *Pediatr. Res.*, **19**, 459-466 (1986).
5. C. R. Roe, D. S. Millington, D. A. Maltby, "In Clinical Aspects of Human Carnitine Deficiency", P. R. Borum (ed), Pergamon, New York, 97-107, 1985.
6. M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliot, D. R. Sedgwick and A. N. Tyler, *Anal. Chem.*, **54**, 465A-657A (1982).
7. D. S. Millington, D. L. Norwood, N. Kodo, C. R. Roe and F. Inoue, *Anal. Biochem.*, **180**, 331-339 (1989).
8. A. Moon and W. J. Rhead, *J. Clin. Invest.*, **79**, 59-64 (1987).
9. D. S. Millington, N. Kodo, D. L. Norwood and C. R. Roe, *J. Inher. Metab. Dis.*, **13**, 321-324 (1990).
10. D. H. Chace, S. L. Hillman, D. S. Millington, S. G. Kahler, B. W. Adam and H. L. Levy, *Clin. Chem.*, **42**, 349-355 (1996).
11. D. S. Millington, N. Kodo, N. Terada, D. Roe and C. H. Chace, *Int. J. Mass Spectrom Ion Processes*, **111**, 211-228 (1991).