

Determination of plasma ketone body following oximation-trimethylsilyl derivatization using gas chromatography-mass spectrometry selected ion monitoring

Hye-Ran Yoon[★]

Division of Biomedical & Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received December 8, 2015; Revised February 11, 2016; Accepted February 12, 2016)

혈장 중 케톤체의 옥심-TMS 유도체화 후 GC-MS/SIM을 이용한 분석

윤혜란[★]

덕성여자대학교 약학대학 생의약 분석실

(2015. 12. 8. 접수, 2016. 2. 11. 수정, 2016. 2. 12. 승인)

Abstract: A ketone body (acetoacetic acid, β -hydroxybutyric acid, and acetone) increases from blood or urine when bio-energy dependence pays more fatty acid than glucose. However, in case oxidation of fat is greater than the capacity of the citric acid cycle the fatty acid oxidation is made from acetoacetyl CoA to acetoacetate then, again form β -hydroxybutyric acid to acetone, the diffusion take place into the blood. Enzymes that oxidize ketone body in the brain and nerve tissue blood ketone body is increased during prolonged fasting, brain used it as energy. In this study, we developed the rapid two step derivatization method for sensitive detection of the ketone body by GC-MS/SIM. The plasma was deproteinized and then the hydroxy and carboxyl groups of ketone body are subjected to extraction and drying then, keto-group were derivatized with hydroxylamine at 60 °C for 30 min for oximation. Then it was trimethyl-silylated with BSTFA at 80°C for 30 min and analyzed using a GC-MS. The linear ranges were in between 0.001 μ g/mL and 250 μ g/mL for β -hydroxy butyrate, and acetoacetate. The method detection limits were below 0.1 pg over each target compound determined. The mean recoveries (%) of target compounds were ranged from 88.2 % to 92.3 % at 1 μ g/mL, from 89.5 % to 94.8 % at 10 μ g/mL, with RSD of 6.3-9.4 %. This method could be applied to quantification of ketone bodies which are seen in the keto-acidosis in children and adults from a variety of diseases that cause ketones in the blood and urine.

요약: 케톤체는 생체 에너지 생산과정이 탄수화물보다는 지방산의 의존도가 높을 때 생성되며, 과도한 분비는 당뇨병성 케토시스나 선천성 유전성 대사이상질환을 의심할 수 있는 근거가 된다. 따라서 이의 신속 정확한 분석법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 혈장을 제단백한 후 hydroxylamine을 가하여 60 °C

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)2-901-8387 Fax : +82-(0)2-901-8386

E-mail : hyeran11@ds.ac.kr

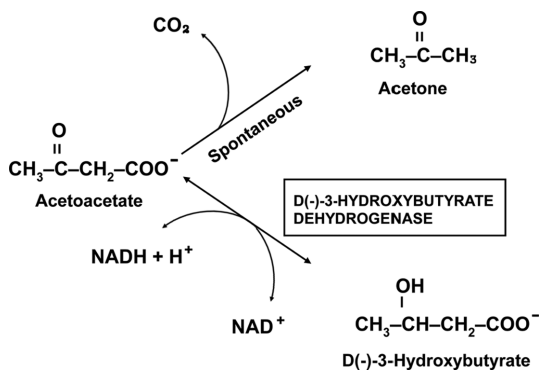
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서 30 분간 반응시켜 oximation 후 BSTFA를 가한 후 trimethylsilylation 유도체화하여 혈장 중에서 케톤체를 신속하게 정량할 수 있는 GC-MS/SIM 분석법을 개발하였다. 케톤체의 직선성의 범위는 0.001-250 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 혈장에서의 검출한계는 0.1 pg 이었다. 직선성을 가지는 범위에서의 상관계수(R²)는 0.998-0.999이었고, 회수율은 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 표준품을 첨가하였을 때 88.2-92.3%, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 첨가하였을 때 89.5-94.8% 였으며 RSD는 6.3-9.4%였다. 이 분석법을 정상인과 케토시스 환자의 검체에 적용하여 벨리데이션 하였으며, 본 분석방법은 어린이나 성인의 당뇨병 케토시스나 여러 유전성대사질환 환자 중 케토시스를 보이는 환자의 혈장 중 β -hydroxybutyric acid/acetoacetic acid의 비를 계산하여 케톤체를 신속하고 효율적으로 임상검체 분석에 응용할 수 있음을 보여주었다.

Keywords: ketosis, ketoacidosis, β -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid, oximation-trimethylsilylation, GC-MS, selected ion monitoring

1. 서 론

생체 내에서 탄수화물이 고갈되고 에너지원으로서 지방을 사용해야 될 때, 지방산이 산화되어 최종생물로서 케톤체를 만든다. 케톤체의 종류는 acetoacetic acid, β -hydroxy butyric acid (BHB) 그리고 acetone이 있으며 생체 내에서 에너지 의존도가 탄수화물인 당질보다 지방산으로 기울 때 혈액 중 또는 소변 중에서 증가한다.¹⁻¹⁰ 즉 케톤체의 형성은 간의 미토콘드리아에서 지방산의 산화가 빠른 속도로 진행될 때 만들어진다(Scheme 1). 케톤체를 분석할 필요성이 있는 임상적 응용으로는 1 차적으로는 일반적으로 잘 알려진 당뇨병에서의 ketosis를 보기 위함이고 2 차적으로는 유전성 대사이상질환인 카르니틴 결핍증, 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 II형 결핍증, 지방간 및 지방산 산화대사이상증, 자마이칸 구토증, 디카복실릭산노증, 랩쭌 질환, 켈웨거 질환 등을 진단하거나 추적 관찰하는데 사용될 수 있다. 때로는 지속적이고 장기간의 케토시스로 인한 케톤산증(ketonemia, ketonuria, ketosis)



Scheme 1. Process of ketogenesis.

의 확인에 이용될 수 있다.¹¹⁻¹⁸

케톤체인 acetoacetic acid, β -hydroxy butyric acid 그리고 acetone 중 acetone은 휘발하므로 acetoacetic acid, β -hydroxy butyric acid를 분석대상으로 선정하였다. 케톤체를 분석하는 기존의 방법은 부정확하고 감도가 좋지 않아 GC-MS를 이용하였다.

케톤체의 분석과 관련하여 수십 년 동안 연구되어 지고 있지만, 여전히 감도나 특이성 선택성에서 문제점이 지적되고 있으므로 높은 선택성과 특이성이 있는 민감한 분석법이 필요하다. 헤드-스페이스 GC를 이용하여 혈장과 혈액 시료 중에서 β -hydroxy butyric acid를 간접적으로 측정하는 방법도 보고되고 있다.

GC-MS를 이용하기 위한 여러가지 유도체화 방법 또한 혈액과 혈장에서의 측정을 위해 사용되어지고 있다. 효소적 산화를 이용한 LC-UV법이나 LC-MS, LC-MS/MS 분석법 등도 보고되고 있다. 흔히 사용하는 역상컬럼을 이용한 LC를 이용해 극성인 β -hydroxy butyric acid이 정지상에서 좋지 못한 머무름을 보이므로 이를 이용한 분석도 흔히 사용되지는 않는다.

카보닐그룹의 유도체화로는 oximation이나 methoxy-mation등이 사용될 수 있으며 본 연구에서는 oximation 후 trimethylsilylation함으로서 카보닐그룹과 하이드록시그룹을 동시에 유도체화하는 방법을 사용하였다.

GC-MS와 oximation을 이용한 다양한 보고로는 PKU진단을 위한 응용,¹⁹ 유기산 분석을 통한 대사이상질환 스크리닝,²⁰ Diabetic Ketoacidosis의 검출 응용,²¹ 유아돌연사 중 대사이상질환 확인,²² multiple sclerosis를 진단하기 위한 metabolomics²³등이 보고 되었다.

대부분 광범위하게 유전성대사이상질환을 진단하거나 당뇨병성 케토시스를 관찰 혹은 특정질환을 진단하기 위해 대사체를 스크리닝하는 도구로서 보고되었

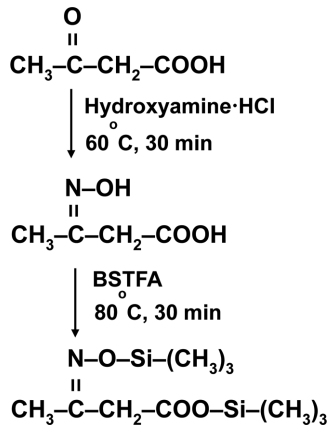


Fig. 1. Reaction scheme for oximation and trimethylsilyl derivatives of ketone body.

으며 단순히 케톤체만을 분석한 보고는 보이지 않는다.

본 연구에서는 케톤혈증을 초래하는 다양한 질환 중에서 특히, 일반적인 당뇨병 케톤증이나 소아에서의 케톤산혈증을 보이는 다양한 유전성대사이상 질환의 경우에 GC-MS/SIM을 이용하여 혈장 중에서 케톤체를 기존의 효소법보다 감도 높게 동시 정량할 수 있는 분석법을 개발하고자 하였다. 혈장 중 케톤체의 정량을 위하여 oximation-trimethylsilylation 유도체화 (Fig. 1)를 사용하여 비교적 m/z 100 이상의 높은 분자량을 선택이온으로하여 고체상 추출과 같은 전처리 없이 액체-액체 추출법만으로 전 처리한 후 GC-MS/SIM으로 신속하고 정확한 정량 분석 방법을 개발하였다.

2. 실험

2.1. 시약

분석물질 β -hydroxybutyric acid와 acetoacetic acid는 Sigma-aldrich사 (MA, USA)로부터 구입하였다. 내부 표준액인 2-ketocaproic acid은 Sigma사 (MO, USA)로부터 구입하였다. Ba(OH)_2 , ZnSO_4 , 에틸아세테이트는 HPLC급 시약인 용매로 Sigma-aldrich사 (MA, USA) 및 Tedia사 (OH, USA)에서 구입하였다. 유도체화 시약인 N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)와 hydroxylamine HCl은 Sigma-aldrich사 (MA, USA)로부터 구입하였다. 초순수 증류수는 Millipore MilliQTM system의 표준 정제수 정제 시스템 (MA, USA)을 이용하여 정제된 18 M Ω -cm의 증류수를 사용하였다. 초순수 증류수는 Millipore membrane filter 시스템 통해 Whatman사 (Maidstone, U.K.)의 nylon

membrane filter (0.2 μm)로 여과한 후 10 분간 탈기하여 사용하였다. HP-5 MS 칼럼은 Hewlett packard사(CA, USA)로부터 구입하였다.

2.2. Gas chromatography-mass spectrometry

GC-MSD 시스템은 Hewlett-Packard 6890N 기체 크로마토그래피와 HP 5973N 질량분석기(a HP Hewlett-Packard 3365 MSD Chemstation) 사용하였다. 그리고 Model 7683 series injector로 구성된 Hewlett-Packard 6890 Series II GC-MS 시스템(PA, USA)을 이용하였다. HP-5 컬럼(30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm df)은 Agilent Technologies에서 구입하였다. 오븐온도는 80 $^\circ\text{C}$ 에서 4 분간 유지하고 180 $^\circ\text{C}$ 까지 분당 5 $^\circ\text{C}$ 씩 증가시켰고 그 이후 300 $^\circ\text{C}$ 까지 분당 3 $^\circ\text{C}$ 씩 증가시켰으며 총 19 분 동안 분석하였다. 주입구 온도는 260 $^\circ\text{C}$ 였고, 이온소스의 온도는 230 $^\circ\text{C}$, 인터페이스 온도는 300 $^\circ\text{C}$ 였다. MSD는 전자에너지 70 eV에서 electron impact mode로 작동되었다. 운반 기체인 헬륨 기체의 유속은 0.8 mL/min였고 시료는 비분할 주입하였고 주입량은 1 μL 였다 (split 비율은 1:10). 스캔 범위는 m/z 50-550까지 full scan mode로 스캔하여 oximation-TMS로 유도체화한 후 케톤체의 분열양상을 확인하였다.

2.3. 실험부

2.3.1. 임상 검체

이 방법의 유효성을 위해 사용된 건강한 사람의 혈장 시료는 서울 의과학연구소에서 공급받았다. 유효성 검사에 사용된 혈장 시료는 3.2% 구연산염이 포함된 sodium citrate tube (덕산, 서울, 대한민국)에 채취하였다. 통합 혈장은 본 연구에서 사용된 동일한 시설에서 동일한 시료 전처리 과정을 거쳐서 분석하였다. 임상 검체의 구성은 소아과 환자 검체로 유기산 분석 결과가 ketosis를 보이는 검체를 수집하였다.

2.3.2. 표준용액 조제

-4 $^\circ\text{C}$ 이하로 냉장 보관된 β -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid의 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 각각 1,000 g/mL로 조제하여 stock 표준용액을 분석 전까지 -20 $^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. Stock 표준용액을 메탄올로 희석하여 농도를 각각 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 조제하여 working 표준용액을 냉장 보관하였다. 4 $^\circ\text{C}$ 이하로 냉장 보관된 2-ketocaproic acid의 내부 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 각각 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 조제하여 stock

표준용액을 분석 전까지 -20 °C에서 보관하였다. working 표준용액과 내부표준용액은 분석 전까지 4 °C 이하로 냉장 보관하였다.

2.3.3. 검량선 작성과 정량한계

표준액 (100 µg/mL)은 공혈장 및 메탄올로 희석하여 최종용액 1 mL 중 β-hydroxybutyric acid, acetoacetic acid의 농도가 각각 0, 1, 2, 10, 20, 및 50 µg/mL 이 되도록 조제하였고 내부표준액 (10 µg/mL)을 첨가하여 검량선의 용액을 조제하였다. 서로 3-hydroxybutyric acid, acetoacetic acid를 위의 조제 농도가 되도록 공혈장 100 µL를 각각의 유리튜브에 넣고 여기에 내부표준물질인 2-ketocaproic acid 5 µL를 (10 µg/mL)을 가하고 희석 용매인 메탄올을 가하여 최종부피를 1 mL로 하였다. 이 액을 vortex mix로 30 초 잘 섞은 후 위의 시료 전처리와 동일한 oximation-TMS 유도체화를 하여 GC-MS로 분석하였다. 여기서 얻은 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 분석물질의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다.

검출한계(LOD)는 S/N 비 값이 3보다 큰 값으로 계산하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N 비 값이 10보다 큰 값을 설정하였다. LOQ는 각 분석 물질이 허용되는 정확도(< 20 %)와 정밀도(< 20 % CV)로 나타낼 수 있는 가장 낮은 농도인 것으로 실험으로 입증하였으며 검량선 범위에서 가장 낮은 농도 값 이내로 포함됨을 확인되었다.

2.3.4. 추출 및 유도체화

혈장 100 µL에 내부표준액을 10 µL가하고 0.15 M Ba(OH) 2와 ZnSO4용액을 각각 500 µL 가한 후 제단백 한다. pH를 7로 조정후 hydroxylamine HCl (1 mm/L) 500 µL를 첨가하여 60 °C에서 30 분간 반응시켜 oximation하였다. 이 액을 식힌후 에틸아세테이트로 추출하고 질소하에서 건조시킨 후 BSTFA를 10 µL 가하고 60 °C에서 30 분간 반응시켰다.

2.3.5. 밸리데이션

통합 혈장에 표준액과 내부표준액을 첨가하여 공인된 밸리데이션 절차에 따라 처리하였다. 공시료(분석 물질을 넣지 않은 시료)에는 내부표준액을 첨가하여 방해물질의 존재유무를 확인하였다. 정확도는 명목 표준 농도와 일간분석(n=3)으로부터 계산된 피크 면적의 % CV로써의 정밀도에 대한 역산된 값의 비율에 의해 결정되었다. 정확도는 [측정된 농도]/[명목 표준

농도] × 100 % 로 계산되었다.

회수율은 저농도와 중간 농도(1 µL/mL와 10 µL/mL)의 표준용액을 혈장에 첨가한 후 추출과정을 거친 표준물질 농도와 추출과정을 거치지 않은 표준물질의 농도를 계산함으로써 결정하였다. 분석상에서의 불순물의 잔류 정도는 고농도의 케톤체를 측정 한 후에 6 개의 공시료 검체를 측정하여 불순물이 없으므로 평가하였다(데이터는 본 논문에 넣지 않았음).

3. 결과 및 고찰

혈장 중 GC/MS로 분석법은 선택이온 모드 (selective ion mode, SIM)를 사용하였고, Table 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 같이 oximation-TMS의 각 성분의 매우 특징적인 이온을 보였으므로 감도 높은 이온과 분자이온의 두 이온을 정량이온으로 선택하여 분석을 하였다.

GC/MS의 scanning mode에서 얻어진 크로마토그램으로부터 케톤체 표준품의 머무름 시간과 일치하는 피크를 확인 동정하여 질량스펙트럼을 얻었다. SIM을 수행하기 위한 최적 이온 선택을 위해 유도체화 한 화합물의 분자량(Formula weight, FW), 분자피크 (M^+), 머무름 시간(retention time, RT), 상대 머무름 시간(relative retention time, RRT), 상대감응인자(relative response factor, RRF)를 조사하였다. 앞의 조사를 근거로 분자량 100 이상으로 다른 성분 피크의 영향을 받지 않는 이온을 정량이온(quantification ion, QI)으로 정하였고, 유도체화한 분자피크로서 피크 이온의 상대 강도가 20% 이상인 피크를 검토한 결과, TMS 유도체화된 분자이온(M^+), 혹은 분자이온에서 CH_3 기가 떨어

Table 1. Selected ions of ketone body for the determination by GC-MS.

Compounds	Retention time	Quantification ion
3-hydroxy-butyrate	10.71	191, 233
Acetoacetate-1	12.05	231, 246
Acetoacetate-ox-2	12.95	246, 261
Acetoacetate-ox-3	13.67	246, 261

Table 2. Recoveries (% , Mean±SD) of ketone body

Compounds	Conc. Added (µL/mL)		RSD % (n=3)
	1	10	
3-hydroxy-butyrate	92.3 ± 6.8	94.8 ± 5.2	6.3
Acetoacetate	88.2 ± 7.5	89.5 ± 5.6	9.4

진 M-15 이온이 확인 이온으로 적합하였다(Table 1). 제공받은 혈장과 정상혈장으로 본 방법의 임상적 적용을 하기 위해 케톤체를 동시분석을 위한 각 화합물에 대한 머무름 시간과 정량이온을 선정하였다(Table 1). 범위를 구해 본 결과 0.001-250 µg/mL 사이 범위에

서 직선성을 보였다(β-hydroxybutyric acid와 acetoacetic acid). 혈장에 표준용액을 첨가하여 얻은 BHA의 검량선은 $y = 0.928x + 0.1015$ ($R^2 = 0.9915$)이었고, acetoacetic acid의 검량선은 $y = 0.953x + 0.0475$ ($R^2 = 0.9892$)이었다. 따라서 이들 검량선의 R^2 은 0.9915-0.9915 범위에 속하

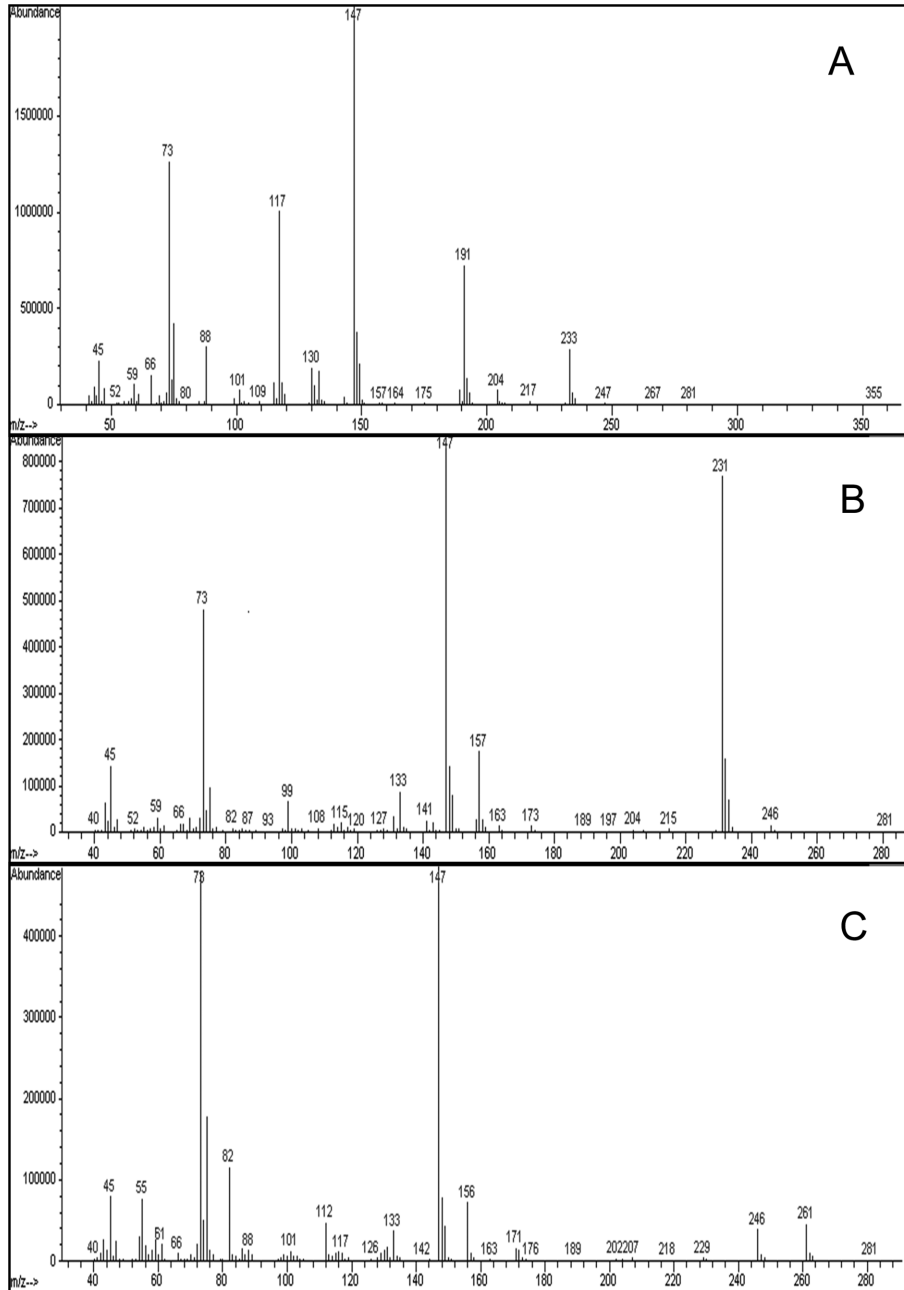


Fig. 2. Mass spectra of ketone bodies as oximation and trimethylsilyl derivatives. A; 3-hydroxy butyrate, B; acetoacetate-1, C; acetoacetate-2.

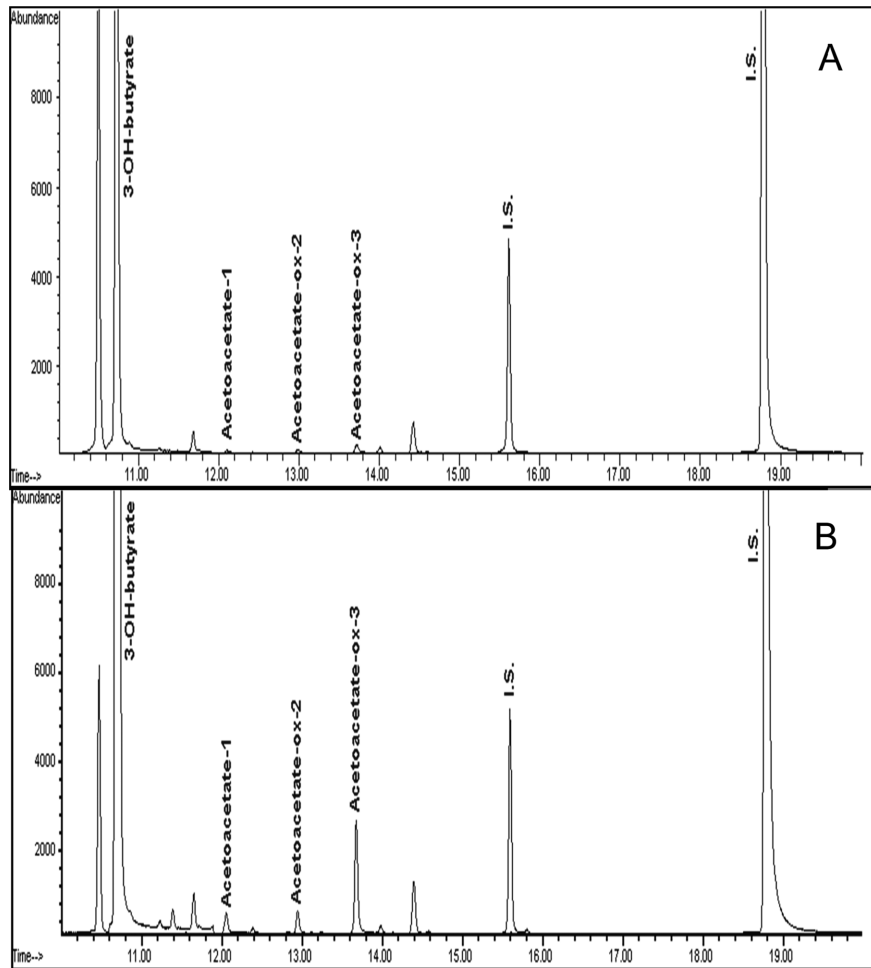


Fig. 3. GC-MS/SIM chromatograms of ketone bodies. A; control plasma B; abnormal plasma with ketosis.

여 2 가지 대상 분석물질에 대하여 양호한 직선성을 보였다. 검출한계는 0.1 pg 이었으며 정량한계는 1 pg 이었다. 추출 후 BHB의 평균 회수율은($n=3$) 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 92.3, 94.8 % 였고, acetoacetate의 평균 회수율은($n=3$) 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 88.2, 89.5%로 양호하였다(Table 2). 일반적으로 스크리닝 목적으로 검사할 경우, 회수율의 허용 범위는 60 % 이상으로 보고되고 있다. 따라서 새로이 개발된 본 분석 방법의 회수율은 스크리닝 및 진단 목적을 위한 검사에 사용하기에 충분한 허용범위 내에 속하였다.

모든 대사이상 환자는 혈장으로 비정상적인 대사물을 정상인에 비해 다량 배출하므로 본 연구에서 확인된 검출한계 및 정량한계가 유용하게 진단에 응용될 수 있다(Table 3). 케토시스 환자의 경우 혈장 중 BHB의 농도는 3.276 mmol/L로 정상범위(<0.015

Table 3. Quantification of ketone bodies in control plasma and abnormal plasma with ketosis (unit : mmol/L)

Compounds	Concentration Found		Normal range
	Control	Ketosis	
β -hydroxy-butyrate	0.076	3.276	0.05-0.015
Acetoacetate	0.093	0.861	0.05-0.30
β -hydroxy-butyrate/ Acetoacetate	0.817	3.805	< 1.0

mmol/L)를 상당히 벗어났으며 acetoacetate의 농도는 0.861 mmol/L로 정상범위(<0.3 mmol/L)를 살짝 벗어났으며 케톤체의 비인 BHB/acetoacetate는 3.805로 정상범위 <1를 명확하게 벗어난 결과를 보여 케토시스가 극명하게 존재함을 확인할 수 있었다(Table 3).

3.1. 정상인의 혈장 중 참고 범위 설정

한국인 정상인(18-55세)에 대한 혈장 중 케톤체의 참고 범위를 설정하였다. 한국인 혈장에서 얻어진 케톤체의 참고 범위는 BHB (n = 18)의 경우 0.05-0.015 mmol/L, acetoacetate (n = 8)의 경우는 0.05-0.3 mmol/L의 범위에 각각 속하는 것으로 나타났다(Table 3).

4. 결 론

본 연구에서는 혈액에서 다양한 원인에 의한 케톤증이 발생하였을 때 임상증상만으로는 진단이 어려우므로 재빨리 감별할 수 있는지 GC-MS를 이용하여 분석하였고 β -hydroxy butyrate와 acetoacetate의 비율을 계산하여 기존의 방법보다 간편하게 정상인과 케톤증을 감별 진단하는 방법을 개발하였다. 단계적인 유도체화인 옥심화와 실릴화는 케토기를 차단하여 휘발성을 높이기 위해 사용되었다. 신속 간편 정확함을 장점으로 한 분석방법은 케토시스 환자 검체를 적용해 봄으로써 이 방법의 유용함을 제시하였다. 미토콘드리아의 지방산 대사이상질환을 포함한 다양한 유전성대사질환 중 케토시스를 유발할 수 있는 환자 및 당뇨병과 같은 케토시스 유발하는 일반적인 질환자의 진단이나 환자의 치료후 추적관찰 및 모니터링에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구를 위해 환자 검체의 제공 및 임상 증상에 관한 정보에 도움을 주신 서울 의과대학연구소의 이경률 박사와 이향자 연구원께 깊이 감사드립니다.

References

1. P. Kapoor, B. Mandal, U. Chowdhury, S. Singh and U. Kiran, *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, **27**, 225-232 (2011).
2. B. Levy, L. O. Sadoune, A. M. Gelot, P. Bollaert, P. G. Nabet and A. Larcen, *Crit. Care Med.*, **28**, 114-119 (2000).
3. S. Shinde, K. Golam, N. D. Patil and P. Kumar, *Indian J. Crit. Med.*, **9**, 145-150 (2005).
4. V. C. Vogel, E. Wessel and H. W. Siesler, *Bio-macromolecules*, **9**, 523-527 (2008).
5. T. Slamet, P. K. C. Lim, J. W. Mak, J. Storey and R. A. Noor, *Tropical Biomed.*, **8**, 85-87 (1991).
6. J. Karlsson, I. Jacobs, B. Sjödin, P. Tesch, P. Kaiser, O. Sahl and B. Karlberg, *Int. J. Sports Med.*, **4**, 52-55 (1983).
7. I. Lorenz and A. Hartmann, *Comp. Clin. Path.*, **12**, 169-171 (2003).
8. A. Zhua, R. Romerob and R. P. Howard, *Anal. Biochem.*, **396**, 146-151 (2010).
9. B. Lloyd, J. Burrin, P. Smythe and K. Alberti, *Clin. Chem.*, **24**, 1724-1729 (1978).
10. D. Constantin-Teodosiu, G. Cederblad and E. Hultman, *Anal. Biochem.*, **198**, 347-351 (1991).
11. M. Kimura, K. Kobayashi, A. Matsuoka and K. Hayashi, *Clin. Chem.*, **31**, 596-598 (1985).
12. S. Felby and E. Nielsen, *Forensic. Sci. Int.*, **64**, 83-88 (1994).
13. K. M. D. Holm, K. Linnet, B. S. Rasmussen and A. J. Pedersen, *J. Anal. Toxicol.*, **34**, 549-554 (2010).
14. H. M. A. Hassan and G. A. A. Cooper, *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 502-507 (2009).
15. S. Elliott, C. Smith and D. Cassidy, *Forensic. Sci. Int.*, **198**, 53-57 (2010).
16. S. Nissen, M. Van Koevering and D. Webb, *Anal. Biochem.*, **188**, 17-19 (1990).
17. S. Yamato, K. Shinohara, S. Nakagawa, A. Kubota, K. Inamura and G. Watanabe, *Anal. Biochem.*, **384**, 145-150 (2009).
18. S. R. Dahl, K. M. Olsen and D. H. Strand, *J. Chromatogr. B.*, **885**, 37-42 (2012).
19. A. Kumps, P. Duez and Y. Mardensa, *Metab. Clin. Chem.*, **5**, 708-717 (2002).
20. X. Xiong, X. Sheng, D. Liu, T. Zeng, Y. Peng and Y. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.*, **29**, 8825-8833 (2015).
21. Y. Lu, Y. Dan and C. Chen, *Metabolites*, **4**, 993-1010 (2013).
22. T. Takahashi, K. Yamada, H. Kobayashi, Y. Hasegawa, T. Taketani, S. Fukuda and S. Yamaguchi, *Pediatr. Int.*, **3**, 348-353 (2015).
23. L. Coulier, B. Muilwijk, S. Bijlsma, M. Noga, M. Tienstra, A. Attali, H. van Aken, E. Suidgeest, T. Tuinstra, T. M. Luijck, T. Hankemeier and I. Bobeldijk, *Metabolomics*, **1**, 78-87 (2013).