

D체와 R체 이성질체 판별과 GC-MS를 이용한 유전성 대사이상질환의 진단법 개발

덕성여자대학교 약학대학 생·의약분석실

윤혜란

Diagnostic Method for Inborn Metabolic Disorders using differentiation between D- and R- Isomers on GC-MS

Hye-Ran Yoon

Biomedical & Pharmaceutical Analysis Lab, College of Pharmacy,
Duksung Women's University, Seoul, Republic of Korea

Since the secretion of specific chiral isomers in urine (or plasma) is very crucial to diagnose some inborn metabolic disorders, clinical application of dual column achiral differential method has been performed for the absolute configuration of chiral compounds. Extracted from the acidified urine with diethyl ether, carboxylic functional group of organic acid (stereoisomers of the volatile) was derivatized with (-)-menthylolation or (S)-(+)-3-methyl-2-butylolation and followed by O-trifluoroacylation. Each of the enantiomers was accurately separated from the library matched double column (achiral) with a retention index (I). In various inborn metabolic disease urines, absolute chirality was identified correctly in the urine (10 patients) with inborn metabolic disease (including secretion of D, L- lactic acid, D, L-3-hydroxybutyric acid, and D, L-2-hydroxyglutaric acid). In this study, we identified and isolated the volatile diastereomer as a useful diagnostic marker, this successful application to urine specimens may be useful for diagnostic classification of inherited metabolic disorders.

Key words: Achiral column, Derivatization of diastereomer, Inborn metabolic disorder

서론

특정한 효소의 결핍으로 인한 유전성대사이상 질환은 체내에서 대사되지 못한 질병 특이의 한 종류 이상의 대사물들이 비정상적으로 체내에 축적되므로 심각한 임상적 증상을 야기한다¹⁻³. 분리 가능한 생체내 대사물인 혈액이나 소변으로 배출되는 비정상적인 대사물인 유기산 중에서도 카이랄 중심을 가진 유기산은(e.g. 2- 또는 3-하이드록시 산) 치명적인 대사 이상증인 유기

산, 아미노산 및 지방산 대사 이상의 진단 지표가 된다^{4, 5}. 이런 카이랄 중심을 가진 이성질체들의 절대 배열은 선천성 대사이상 질환과 관련된 효소와의 카이랄성 입체화합물들의 특이적인 대사과정을 반영한다고 알려져 있다^{6, 7}.

D-glyceric aciduria⁸, D-2-hydroxyglutaric aciduria¹, L-2-hydroxyglutaric aciduria⁵ 및 glutaric aciduria type II⁹와 같은 선천성 대사 이상을 진단하는 데에 있어, 개별 하이드록시산의 카이랄성은 중요한 인자이다. 카이랄성 하이드록시산이 비정상적으로 분비되는 선천성 대사이상 질환의 정확한 진단을 위해서는, 단순한 화학적 동정만으로는 이성질체 확인이 어렵다. 환자에 대한 적절한 치료 및 후속 조치와 영구적

책임저자: 윤혜란, 서울 도봉구 삼양로길 33
덕성여자대학교 약학대학 생의약분석실 #312
Tel: 02)901-8387, Fax: 02)901-8386
E-mail: hyeran11@ds.ac.kr

인 뇌 손상 및 신경 증상을 방지하기 위해서는 확진검사가 필요하며, 이러한 이유로 카이랄성 유기산의 화학적 동정 및 절대 배열을 확인하여 D체와 R체를 판별해야 하는 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

카이랄성 결정은 특히 D-2-hydroxyglutaric aciduria 및 D-glyceric aciduria에서와 같이 특이적인 임상 증상이 없는 선천성 대사 이상의 진단에 있어 중요하다. 고해상도 GC-MS를 이용한 직접 및 간접거울상 분리 방법을 포함하여 구조 분석을 위한 다양한 분석방법이 개발되어 있다⁹⁻¹²⁾. 개발된 분석 방법들은 먼저 카이랄성 하이드록시산을 휘발성 유도체로 만들어서 분석하였다. 이를 위하여 본 연구에서는, 직접적인 분석 방법에 비해 많은 장점이 있는 내구성이 높으면서 고온에서도 안정성이 있는 전통적인 방법인 비카이랄성 정지상을 이용하여 휘발성 부분 입체 이성질체 유도체를 분리하는 간접 거울상 분리법을 개발하였다.

Kim 등은 GC-MS와 함께 서로 다른 극성을 지닌 비카이랄성의 모세관 컬럼 2개를 연결한 방법을 이용하여 거울상 이성질체의 분리법을 보고 하였으며, 이때 18종의 라세믹 2-하이드록시산의 O-trifluoroacetylated (S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester를 이용하여 부분 입체이성질체를 유도체화하였고, 31종의 라세믹 산 O-trifluoroacetylated (-)-menthyl ester의 부분 입체이성질체를 유도체화하였으며 이를 분리하여 거울상 입체 이성질체의 D체와 R체의 분석법의 유용함을 보고한 바 있다^{13, 14)}. 이외에도, 머무름 지수 (I)와 참조 수치를 대조함으로써 종래의 극성이 다른 두 컬럼을 함께 사용하는 크로마토그래피 분석에서 문제가 되었던 시간적 소모를 해결하였으며 각 거울상 이성질체의 동정 및 카이랄성 분리의 가능성을 보고하였다. 이 때 총 분석 시간은 유의하게 감소하였다^{13, 14)}.

본 연구에서는, 유전성 대사이상 질환으로 확진된 환자의 소변 검체를 이용하여 비카이랄성 이중 모세관 컬럼 시스템과 retention index (I)를 이용한 스펙트럼 매칭 방법을 동시에 사용하면서 O-trifluoroacetylated (S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester 및 (-)-menthyl esters 유도체화 하여 D체- R체 이성질체의 분리, 확인, 동정을 수행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

소변시료는 지방산 산화 대사이상환자들(short chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase deficiency, medium chain 3-ketoacyl-CoA thiolase deficiency) 및 유기산 대사이상환자(β -ketothiolase 결핍증)들로부터 채취되었다. 유전성 대사이상 환자의 소변시료는 크레아티닌 수치와 함께 일본의 시마네 의과 대학과(Department of Pediatrics, Shimane Medical University, Shimane 693-8501, Japan)와 예일대학교 소아과 및 의학유전학과(Department of Pediatrics and Human Genetics at Yale University, New Haven, CT, USA)로부터 제공 받았다. 실험관련 데이터 및 임상적 데이터는 원 자료의 리뷰로부터 얻었다. 모든 받은 검체의 환자는 DNA검사 또는 생화학적 검사 또는 효소분석을 이용한 확진검사를 통하여 진단되었으며 이와 관련된 자료도 함께 얻었다. 급성기 및 증상이 사라진 후의 소변으로부터는 환자의 크레아티닌 수치를 측정 한 후 소변 분석 전까지 -70°C 에서 보관되었다.

2. 방법

1) 재료 및 시약

(-)-Menthol, (S)-(+)-3-methyl-2-butanol, 염화아세트산, trifluoroacetic anhydride는 Sigma-Aldrich Korea (Seoul, South Korea)에서, n-탄화수소 표준품(C10-C22, 짝수만)은 Polyscience (Niles, IL, USA)에서 구입하였다. Analytical grade의 아세트나이트릴, 톨루엔, 아이소옥탄 및 다이에틸 에테르는 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)에서 구입하였다. 그 외 모든 화학물질은 analytical grade였으며 수령한 상태 그대로 사용하였다.

2) 가스 크로마토그래피

본 연구에서는 두 개의 불꽃 이온화 검출기 및 HP 3365A GC Chemstation (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) 인터페이스가 적용된 분할/비분할 주입 시스템이 장착된 Hewlett-Packard HP model 5890A gas chromatograph series II를 사용하였다. 주입구 및 검출기의 온도는 각각 260°C와 280°C였다.

시료(0.5 mL)는 purge time을 0.7분으로 한 비분할 주입 모드로 주입되었다. 비극성의 DB-5 [5% phenyl-(methylpolysiloxane)] 및 중간 극성의 DB-17 [17% phenyl-(methylpolysiloxane)]로 구성된 실리카 모세관 컬럼(J & W Scientific, Rancho Cordova, CA, USA; dimensions 30 m×0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness)의 이중모세관 컬럼 시스템으로 구성되어 머무름 지수(I)를 측정하였다. 두 컬럼은 Y-스플리터를 이용해 비활성화된 실리카 튜브(1 m×0.25 mm I.D.)로 연결되었다. O-trifluoroacetylated (S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester의 부분입체이성질체의 분리를 위한 오븐 온도는 60°C에서 2분 유지 후 3°C/분의 속도로 280°C까지 올라가도록 설정하였다. O-trifluoroacetyl-(S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester의 부분입체이성질체의 분리를 위한 오븐 온도는 60°C에서 2분, 이후 3°C/분의 속도로 100°C에서 2분 고정 후 3°C/분의 속도로 온도를 높여 최종적으로 280°C가 되도록 설정하였다. 두 불꽃 이온 검출기의 신호는 dual-channel mode의 GC Chemstation에서 동시에 처리되었다. 아이소옥탄을 용매로 한 정상-탄화수소(C10-C22, 짝수만)는 외부 표준물질로 주입되었으며, 온도가 프로그램된 I값은 기존의 머무름 지수를 이용하여 인접한 탄화수소 표준품의 머무름 시간간의 선형보정법으로 계산되었다. Retention index (I) 매칭을 통한 카이랄성 결정과 피크의 동정을 위하여 이중 컬럼에서 측정된 31종의 카이랄산을 확인 하는데 보고된 논문의 라이브러리 데이터베이스가 포함되었다^{13, 14)}.

3) 시료 전처리

불순물이 제거된 소변은(0.25 mg의 크레아티닌에

대응하는 소변을 취함)을 진한 황산으로 pH 1-2로 조정 한 뒤 염화소듐으로 포화시킨 후 다이에틸 에테르로 추출하였다(2 mL×3). 에테르층 추출물은 황산마그네슘으로 건조시킨 후 여과 및 증발 건조하였다. 카이랄산을 유도체화한 O-TFA-(S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester 및 O-TFA-(-)-menthyl ester 모두 상기와 같이 전처리하여 GC로 직접 분석하였다^{13, 14)}. 증발건고 잔사에는 toluene (20 µL), acetyl chloride (1 µL) 및 (S)-(+)-3-methyl-2-butanol (20 mL) 또는 (-)-menthol solution (100 mL)을 첨가한 후, 액체 혼합물을 100°C에서 1시간 가열하여 부분 입체이성질체 유도체를 만들었다. 과량의 반응물을 질소가스 하에서 제거 후, 농축된 잔류물을 아세토니트릴(10 µL) 존재 하에서 trifluoroacetic anhydride (20 µL)와 60°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 결과물은 증발 건조 후 toluene (30 µL)에 용해시켜 GC 상에서 직접 분석되었다.

결 과

Fig. 1-5는 2개의 극성이 서로 다른 컬럼을 이용하여 분석한 유전성 대사이상질환 환자의 소변 중에서 잘 분리된 유기산의 이성질체의 GC-MS 크로마토그램이

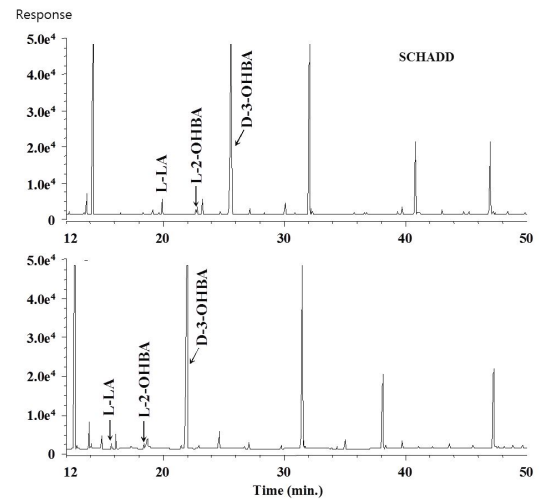


Fig. 1. Dual chromatograms obtained from the urinary extracts of patient with SCHADD using the DB-5 (up) and DB-17 (down) columns.

다. Table 1 (adapted from Reference 11)은 본 연구에서 개발된 방법을 환자의 소변에 적용시켰을 때 입체 이성체 화합물들의 광학 활성이 분류 요약되어 있다¹¹⁾.

지방산 산화 대사이상 질환으로 분류되는 환자인 SCHADD (Fig. 1) MC3KATD (Fig. 3)의 소변에서 검출된 3-hydroxybutyric acid의 입체이성질체는 D-체로 동정되어 앞의 보고와 일치하였다¹¹⁾.

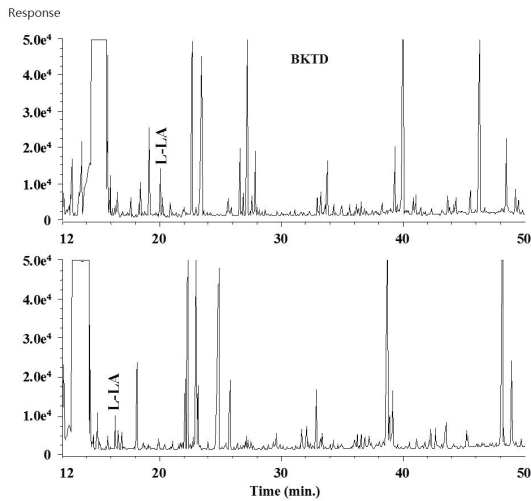


Fig. 2. Dual chromatograms obtained from the urinary extracts of patient with BKT D using the DB-5 (up) and DB-17 (down) columns.

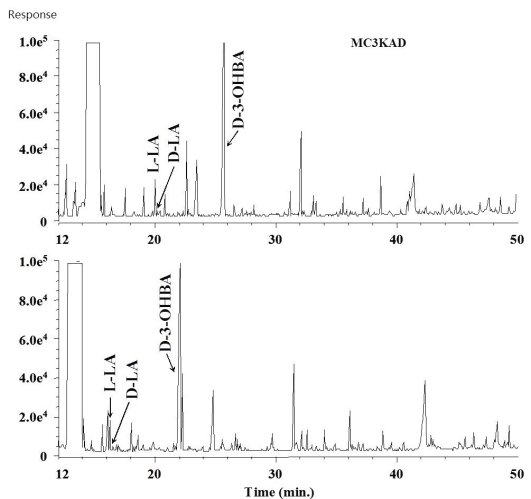


Fig. 3. Dual chromatograms obtained from the urinary extracts of patient with MC3KAD using the DB-5 (up) and DB-17 (down) columns.

β -ketothiolase 결핍증 환자의 소변에서 저케톤성 소견을 보이므로 3-hydroxybutyric acid가 검출되지 않았으며 L-lactic acid를 보이고 있다(Fig. 2)¹¹⁾.

Fig. 4와 Fig. 5는 각각 L-2-hydroxy glutaric aciduria와 Glutaric aciduria type 2 환자의 소변 시료의 판별 결과로 실제 진단명과 일치함을 확인하였다.

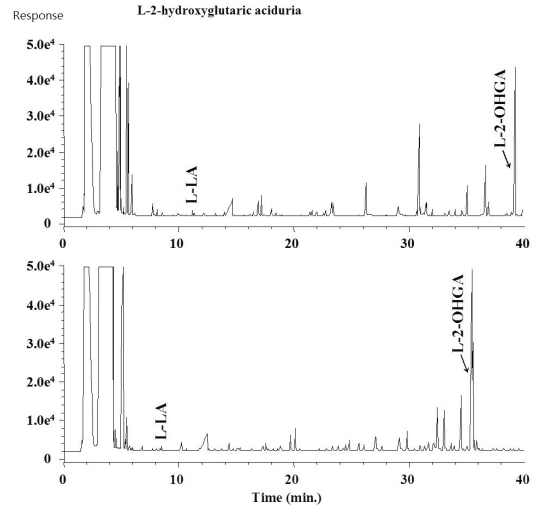


Fig. 4. Dual chromatograms obtained from the urinary extracts of patient with L-2-hydroxyglutaric aciduria using the DB-5 (up) and DB-17 (down) columns.

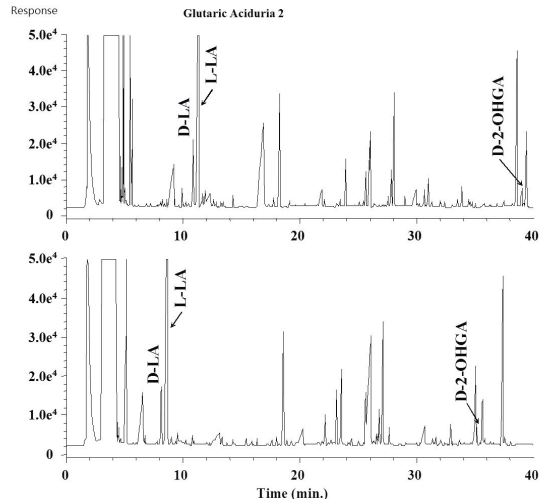


Fig. 5. Dual chromatograms obtained from the urinary extracts of patient with Glutaric aciduria type 2 using the DB-5 (up) and DB-17 (down) columns.

Table 1. Absolute Configuration of Chiral Acids Identified from Patients' Urine

Case	FAO disorders and organic aciduria	Absolute configuration			
		Lactic	2OHBA*	3OHBA [†]	2OHGA [‡]
1	SCHAD def.	L	L	D	ND
2	B-Ketothiolase def.	L	ND	ND	ND
3	MC3KAT def.	L, D	L	D	ND
4	L-2-Hydroxyglutaric aciduria	L	ND	ND	L
5	Glutaric Aciduria 2	L, D	ND	ND [§]	D

*2-Hydroxybutyric acid; [†]3-Hydroxybutyric acid; [‡]2-Hydroxyglutaric acid; [§]ND: Not detected. This table is adapted from ref 11.

고 찰

부분 입체 이성질체인 O-trifluoroacetyl-(S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester 유도체로 만들어서 Fig. 1과 Fig. 3에서 확인된 3-hydroxy butyric acid는 Kim 등¹⁴⁾의 보고와 일치하여 머무름 시간은 D-체가 L-체보다 빨랐으며 retention index matching을 통하여 D-체임이 확인되었다¹⁴⁾. 단쇄 히드록시 코에이 탈수소 효소결핍증(short chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase 결핍증, SCHADD)와 중쇄 케토아실 코에이 치올라제 효소결핍증(medium chain 3-ketoacyl-CoA dehydrogenase 결핍증, MC3KAD)에서 3-hydroxybutyric acid의 이성질체가 D-체로 판별됨에 따라 SCHADD와 MC3KAD가 모두가 대표적인 동일한 지방산 산화 대사경로를 거치면서 L-대사경로가 아닌 D-대사경로로 대사된다는 점을 시사하였다. 본 연구에서 적용시킨 실제 임상 시료 분석에서의 이성질체 판별을 통해 지방산 산화와 케톤 생성 과정에서의 β-산화에서 유래한다는 가설을 뒷받침하였으며 이 사실을 재확인하였다¹⁾. 즉, D-3-hydroxybutyric acid는 케톤체 형성 경로에서 마지막 대사체에 해당하는 케톤체의 광학 이성질체인 것이다.

MC3KAD 환자에서 확인 동정된 D-체의 3-hydroxybutyric acid의 존재는 MC3KAD 환자의 소변에서 부분입체이성질체 유도체화를 통해 D-3-hydroxybutyric acid를 검출한 국내에서의 첫 보고이다.

β-ketothiolase 결핍증(BKTD, acetoacetic thiolase deficiency)은 매우 희귀하여 전 세계적으로 50

에서 60명 정도가 보고되었다¹⁵⁾. β-ketothiolase 결핍증 환자는 음식물 중 isoleucine을 대사하는 과정에서의 효소가 장애가 있다. 이 질환은 “mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase”라는 효소의 결핍 또는 기능 저하시에 발생한다(Fig. 2).

인체에서의 대부분의 대사경로가 L-대사경로를 거치므로 연구에 적용된 모든 대사이상질환환자의 소변시료에서 L-lactic acid가 검출되었으나, MC3KAD에서는 L체와 D체의 lactic acid¹⁵⁾가 동시에 소변에서 검출되었다. 이와 관련된 보고는 전무하므로 추후 추가 연구가 필요하다고 본다(Fig. 3).

L-2-hydroxy glutaric aciduria와 Glutaric aciduria type 2 이 두 질환은 임상적 증상만으로는 감별 진단이 어렵다. 유일하게 이 두 질환을 감별 진단할 수 있는 방법은 2-hydroxy glutaric acid 입체이성질체를 판별하여 L-체이면 유기산 대사이상질환인 L-2-hydroxy glutaric aciduria로 진단되며 D-체이면 앞서 언급한 지방산 대사이상질환으로 분류되는 Glutaric aciduria type 2로 진단된다(Fig. 4, 5). 따라서 이성질체 판별분석이 중요하다는 점을 다시 한번 상기시킬 수 있는 대단히 중요한 결과이다.

대사이상 질환의 진단은 특이적인 유기산의 실릴화 유도체인 trimethylsilyl 화합물을 GC로 분석하여 이루어진다. 하이드록시 기능그룹을 가진 산의 카이랄성 분리는 선천성 대사이상질환의 진단, 치료 및 후속 조치에 있어 매우 중요하다. 생물학적, 임상적, 진단학적인 면에서 D-체와 R-체의 구별이 매우 중요한 카이랄성 하이드록시산을 분석하여 이들의 동정을 위해 보통 매우 고가의 카이랄 컬럼 및 GC-MS를 사용한다. 이와

같이 유전성 대사이상질환 환자의 소변에 존재하는 광화학적 이성체의 D-체와 R-체의 구별은 진단이 모호한 몇몇 대사이상질환의 적절한 진단과 치료 및 대사과정의 이해에 있어 중요한 정보를 제공한다²⁾.

이 연구에서는 고비용의 카이럴 컬럼 사용을 하지 않으면서, 장시간의 시료 전처리 과정 및 일반적으로 GC 분석만으로는 이성질체를 D-체와 L-체가 구분할 수 없는 문제점을 해결하고 실제 임상시료에 적용하였다. 이 새로운 방법은 극성이 다른 2개의 컬럼을 사용한 점과 머무름 지수(I) 라이브러리를 결합하는 방식으로 구성되어 개발되었다^{13, 14)}. 희귀질환인 대사이상질환 중에서도 특히 매우 드문 몇몇 유전성 대사이상증 환자의 소변을 개발된 방법으로 적용하여 이성질체를 분리 확인 동정하였다.

L-, D- lactic acid와 glutaric aciduria type 2 및 medium chain 3-ketoacyl-CoA thiolase deficiency 간의 연관성이나 적절한 가설을 추론하기에는 환자의 수(전 세계적으로 희귀한 질환이므로)가 제한되어 있으므로 추가 연구가 필요하다고 본다.

대부분의 지방산 산화 이상질환은 병리학적으로 thymine, uracil, valine, isoleucine, methionine, threonine, cholesterol, 및 odd chain fatty acids에서 유래하는 D-3-hydroxybutyric acid를 보였다. 이는 비록 L-isoleucine 또는 L-valine 경로가 관여했을 가능성도 있으나, 모든 소변에서 대사 경로에 무관하게 정상적인 케톤 생성의 D-체 형성의 대사과정 경로를 보였다¹⁾.

본 연구에서 지방산 산화와 케톤 생성은 D-체 형성의 경로로 대사된다는 점이 확인되었지만 명확한 생화학적 기전을 밝히기 위해서는 추후 다른 분자생물학적인 연구가 더 필요하리라고 여겨진다. 또한, 본 연구에서 응용한 예와 같이 임상증상만으로는 확인이 어려운 선천성 대사이상질환의 감별진단에 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서는 비카이랄성의 비극성과 극성의 컬럼

2개를 연결한 이중 모세관 컬럼 시스템을 이용하면서 부분 입체이성질체를 유도체화하였고, 이와 동시에 GC를 이용하여 retention index의 I 라이브러리 매칭을 통하여 대사질환의 진단에 중요한 하이드록시그룹 기능단의 이성질체를 확인 동정할 수 있는 새로운 분석 방법을 확인된 유전성대사이상 질환환자의 시료에 적용하여 실용성을 확인하였다. 이 연구는 D-체 R-체의 구별이 매우 중요한 몇몇 유전성 대사이상질환의 감별 진단할 수 있는 신속하고 저렴한 분석 방법으로 그 임상 증상과 관련된 경로 이해 및 진단에 유용하게 사용될 것이다.

이해관계의 충돌

이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

감사의 글

본 연구는 Dr. Piero Rinaldo (Mayo Clinic, USA) 및 Dr. Seiji Yamaguchi (Shimane Medical University, Japan)로부터 이미 확인된 소변 검체를 제공받았으며, 퇴임하신 김경례 교수(성균관대학교 약학대학)와 이재익 박사(KIST)의 도움으로 수행되었기에 깊이 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Chalmers RA, Lawson AM, Watts RWE, Tavill AS, Kamerling JP, Hey E, et al. D-2-hydroxyglutaric aciduria: Case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* 1980;3:11-5.
- 2) Brassier A, Ottolenghi C, Boddaert N, Sonigo P, Attié-Bitach T, Millischer-Bellaiche AE, et al. Prenatal symptoms and diagnosis of inherited metabolic diseases. *Arch Pediatr* 2012;19:959-69.
- 3) Duran M, Kamerling JP, Bakker HD, van Gennip AH, Wadman SK. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: An inborn error of metabolism? *J Inherit Metab Dis* 1980;3:109-12.
- 4) Heil M, Podebrad F, Prado E, Beck T, Mosand A, Sewell AC, et al. Enantioselective analysis of ketone bodies in patients with beta-ketothiolase deficiency,

- medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency and ketonemic vomiting. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 739:313-24.
- 5) Inoue Y, Shinka T, Ohse M, Kuhara T. 2005 Differential chemical diagnosis of primary hyperoxaluria type II. Highly sensitive analysis of optical isomers of glyceric acid by GC/MS as diastereoisomeric derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2000;823:2-6.
 - 6) Fernández-Lainez C, Aguilar-Lemus JJ, Vela-Amieva M, Ibarra-González I. Tandem mass spectrometry newborn screening for inborn errors of intermediary metabolism: Abnormal profile interpretation. *Curr Med Chem* 2012;19:4511-22.
 - 7) Sewell AC, Heil M, Podebrad F, Mosandl A. Chiral compounds in metabolism: A look in the molecular mirror. *Eur J Pediatr* 1998;157:185-91.
 - 8) Van Schaftingen E. D-glycerate kinase deficiency as a cause of D-glyceric aciduria. *FEBS Lett* 1989; 243:127-31.
 - 9) Watanabe H, Yamaguchi S, Saiki K, Shimizu N, Fukao T, Kondo N, et al. Identification of the D-enantiomer of 2-hydroxyglutaric acid in glutaric aciduria type-II. *Clin Chim Acta* 1995;238:115-24.
 - 10) Sewell, AC, Moritz A, Duran M. D-(+)-glyceric aciduria in an Afghan hound. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:395-6.
 - 11) Lee J, Yoon HR. Rapid diagnosis of metabolic disorders based on achiral separation by gas chromatography with a dual column. *Anal Lett* 2015;48: 231-40.
 - 12) Yotsumoto Y, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Endo M, Fukao T, et al. Clinical and molecular investigations of Japanese cases of glutaric acidemia type 2. *Mol Genet Metab* 2008;94:61-7.
 - 13) Kim KR, Lee J, Ha D, Jeon J, Park HG, Kim JH. Enantiomeric separation and discrimination of 2-hydroxy acids as O-trifluoroacetylated (S)-(+)-3-methyl-2-butyl esters by achiral dual-capillary column gas chromatography. *J Chromatogr A* 2000a; 874:91-100.
 - 14) Kim KR, Lee J, Ha D, Kim JH. Configurational analysis of chiral acids as O-trifluoroacetylated (-)-menthyl esters by achiral dual-capillary column gas chromatography. *J Chromatogr A* 2000b;891: 257-66.
 - 15) Sarafoglou, K, Matern D, Redlinger-Grosse K, Bentler K, Gaviglio A, Harding CO, et al. Siblings with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency not identified by newborn screening. *Pediatrics* 2011;128:e246-e250.