

Espectrometría de masas en tandem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría

Q.F.B. Cynthia Fernández-Lainez,* Dra. Marcela Vela-Amieva,* M. en C. Isabel Ibarra-González*

RESUMEN

Los recientes avances en tecnología han revolucionado la manera en que los sistemas biológicos se visualizan y se estudian. Los avances en espectrometría de masas (EM, MS en inglés) han permitido el análisis de proteínas celulares y metabolitos (proteoma y metaboloma respectivamente) en una escala inimaginable. El término metabolómica se refiere al estudio, identificación y cuantificación de compuestos de bajo peso molecular en células, tejidos o fluidos biológicos, producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos, cuya cuantificación proporciona un amplio panorama del estatus bioquímico.

La EM es una técnica analítica que permite la separación, identificación y cuantificación de múltiples metabolitos, en diferentes matrices biológicas, en un tiempo muy corto y de manera simultánea. En un principio, fue creada para la investigación, en la actualidad, la accesibilidad a esta tecnología ha abierto el camino al desarrollo de diversas aplicaciones por ejemplo, análisis de miles de compuestos presentes en nuestro organismo, el ambiente, los medicamentos, materiales manufacturados, alimentos, toxicología y medicina forense.

Una de las aplicaciones más comunes de la EM es el tamiz neonatal, cuya rápida expansión ha dado pautas para nuevas aplicaciones en el campo de la metabolómica y representa un modelo para futuros estudios de tamiz en enfermedades que afectan tanto a neonatos como a adultos.

El objetivo del presente trabajo es explicar los fundamentos de la EM, mencionar algunas aplicaciones clínicas y diagnósticas que la han convertido en la principal herramienta para el desarrollo de la metabolómica y dar un enfoque de éstas a la pediatría.

Palabras clave: Espectrometría de masas, tandem, metabolómica, tamiz neonatal, errores innatos del metabolismo.

ABSTRACT

Recent advances in technology have brought about a revolution in the manner in which biological systems are visualized and queried. Advances in mass spectrometry (MS) have made possible the analysis of cellular proteins and metabolites (proteome and metabolome respectively) on a scale previously unimaginable.

The metabolome is defined as the quantitative collection of small molecular weight compounds (metabolites) present in cells, tissues or organisms which are the final downstream products of metabolic reactions. Quantitative and qualitative measurements of metabolites provide a broad view of the biochemical status of an organism.

MS is an analytical technique which allows separation, identification and simultaneous quantification of several metabolites, in complex biological matrices, in a very short period of time. Initially, it was created for research purposes and at the present time their accessibility has opened the path for the development of various applications such as analysis of several body compounds, the environment, drugs, food, toxicology and forensics.

Screening of the neonates is the most common application of MS; its fast expansion has set standards for new applications in the metabolomic area and represents a model for future applications such as screening for different diseases of newborns, pediatric and adult patients.

The objective of the present work is to explain the technical basis of the MS, to mention some of its clinical applications which have converted it into the main tool for the development of metabolomics and to approach different pediatric problems.

Key words: Mass spectrometry, tandem mass, metabolomics, neonatal screening, inborn errors of metabolism.

Los recientes avances en tecnología han revolucionado la manera en que los sistemas biológicos se visualizan y se estudian. Los avances en espectrometría de masas (MS) han permitido el análisis de proteínas celulares y metabolitos (proteoma y metaboloma respectivamente) en una escala inimaginable.¹

El término metabolómica se refiere al estudio, la identificación y cuantificación sistemática de compuestos de bajo peso molecular en ciertas células, tejidos o fluidos biológicos

que son producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos². Uno de sus principales objetivos, es identificar cambios sutiles en los perfiles metabólicos entre sistemas biológicos en diferentes estados fisiológicos o patológicos.³

Los componentes del metaboloma pueden entenderse como los productos finales de la expresión genética y definen el fenotipo bioquímico de una célula, tejido u organismo. La cuantificación de estos metabolitos proporciona un amplio panorama del estatus bioquímico, que puede ser utilizado para vigilar y establecer la función de un gen.¹

Inicialmente el uso de la MS estaba limitado a laboratorios de investigación en física y química, así como en las industrias del petróleo y farmacéutica. Desde la década de los años 60 del siglo XX, se ha utilizado también en el área de la química clínica y en los laboratorios de diagnóstico.⁴ La accesibilidad a esta nueva tecnología ha abierto el camino al desarrollo de diversas aplicaciones.⁵

¿Cómo funciona la espectrometría de masas?

La MS permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas, basada en su relación masa/carga (m/z), en diferentes matrices (líquidas, sólidas), después de su ionización.^{6,7}

De manera simple, los espectrómetros de masas se pueden describir como “instrumentos que pesan moléculas”, que son muy pequeñas para ser pesadas en una escala tradicional. Para estimar el tamaño de una molécula de agua se puede decir que para llenar una cuchara pequeña se necesitan aproximadamente 60×10^{21} moléculas. Los espectrómetros utilizan una propiedad que poseen todas las moléculas: la masa. Cada molécula tiene una masa única, por ejemplo, una molécula de agua pesa 3×10^{-23} gramos; la masa de una molécula de cloruro de sodio (sal de mesa) es 9.6×10^{-23} gramos y la de la sacarosa (azúcar de caña) es 5.6×10^{-22} gramos.

Para explicar cómo funciona un espectrómetro de masas, se puede hacer una analogía con una máquina contadora de monedas: si hay una mezcla de monedas de distintas denominaciones (que sería equivalente a la masa), primero las clasifica, en monedas de 10 centavos seguidas de las de 20 y 50 centavos; posteriormente habría monedas de 1, 2 y 5 pesos y en último lugar, monedas de 10 pesos. Posteriormente determina cuántas hay de cada denomina-

ción. En el caso de un espectrómetro de masas, se obtiene el informe de qué moléculas está compuesta una mezcla y en qué cantidad está presente cada una de ellas.

¿Cómo está constituido un espectrómetro de masas?

Un equipo de espectrometría de masas consta de cinco módulos fundamentales: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas, 4) detector y 5) procesador de datos (Figura 1). Como sistema de introducción de muestra existen dos métodos cromatográficos distintos: el de líquido de alta resolución (HPLC) y el de gases (GC).⁸

La función de la fuente de ionización en un equipo de MS es aplicar energía a la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente (Cuadro 1), ya que para medir las moléculas por EM éstas deben estar “eléctricamente cargadas” (iones).⁹ Existen técnicas de ionización en las que la energía impartida hace que las moléculas sólo adquieran carga (ionización suave), y técnicas de ionización en las que la energía impartida es de mayor magnitud, por lo que la molécula se rompe y forma fragmentos cargados. Las moléculas que sólo adquirieron carga sin ser fragmentadas se conocen como iones moleculares; las moléculas que además de ionizarse se fragmentaron se conocen como productos o fragmentos iónicos.¹⁰

Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, que tiene como función separarlos y ordenarlos de acuerdo a su m/z . El intervalo de m/z , su precisión y exactitud dependen del tipo de analizador que se utilice (Cuadro 2). Para biomoléculas, la masa se puede medir con una exactitud del 99.99%; esto permite detectar pequeños cambios en la masa del compuesto que se estudian, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido por otro o una modificación post-traduccional.¹⁰

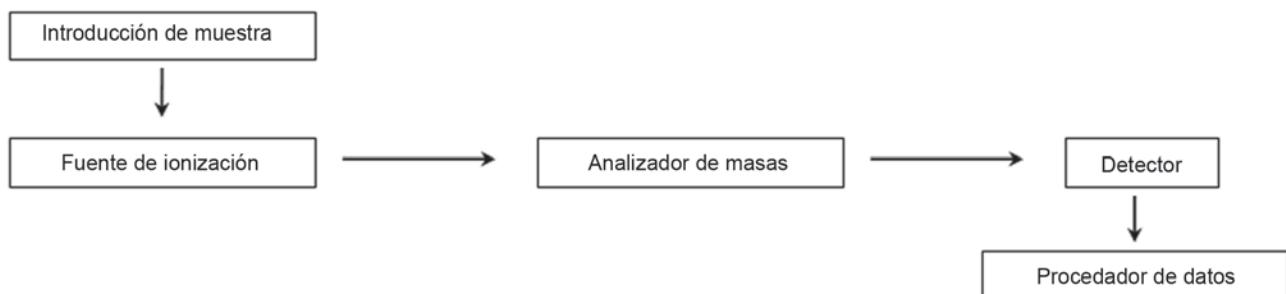
El detector registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente la envía al procesador de datos en donde esta información se registra en forma de *espectro de masas*, que es una representación gráfica de los iones separados por su valor de m/z y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes en la muestra (Figura 2).⁹ Los detectores pueden ser de varios tipos; los más utilizados son el electromultiplicador y el fotomultiplicador.¹¹

Como resultado de un análisis por MS se puede obtener el espectro de masas del ion molecular (Figura 3), el de los productos iónicos o el de ambos, dependiendo del tipo de fuente de ionización que se utilice.¹⁰

* Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz. Instituto Nacional de Pediatría. SSA- Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Correspondencia: M. en C. Isabel Ibarra-González. Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM-Instituto Nacional de Pediatría-SS. Torre de Investigación. Avenida IMAN #1, Noveno Piso. Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Del. Coyoacán, C.P. 04530, México, D.F. Teléfono-Fax: (55) 56-06-32-31. Correo electrónico: icig@servidor.unam.mx
Recibido: junio, 2009. Aceptado: agosto, 2009.

Este artículo debe citarse como: Fernández LC, Vela AM, Ibarra GI. Espectrometría de masas en tandem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. Acta Pediatr Mex 2009;30(5):258-63.

**Figura 1.** Componentes de un equipo de espectrometría de masas.

Cuadro 1. El tipo de fuente de ionización utilizado depende de las propiedades de la molécula a analizar, tales como peso molecular, polaridad, volatilidad.¹¹

Fuente de ionización	Nombre en inglés	Siglas	Tipo de analito	Tipo de ionización	Modo de ionización
Ionización química	Chemical Ionisation	CI	Volátil, compuestos orgánicos como alcoholes, gases metano, butano	Suave	Colisión con gas (metano, amonio) y aplicación de energía eléctrica de manera simultánea
Ionización por impacto electrónico	Electron impact	EI	Volátil, moléculas pequeñas como ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos	Fuerte	Aplicación de energía eléctrica (70 eV)
Ionización por electrospray	Electro Spray ionisation	ESI	No volátil, aminoácidos, acilcarboxílicas, vitaminas, esteroides	Suave	Aplicación de energía eléctrica
Ionización por bombardeo rápido de átomos	Fast Atom Bombardment	FAB	Carbohidratos, organometales, péptidos	Suave	Bombardeo con un gas inerte
Ionización-desorción asistida por láser	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation	MALDI	Péptidos, proteínas, nucleótidos	Suave	Aplicación de energía mediante rayo láser

Cuadro 2. Algunos ejemplos de analizadores de masas con intervalo de masa y exactitud.¹¹

Analizador de masas	Intervalo de masa (Da)	Exactitud (PPM)
Cuadrupolo (Q)	2-2,000	100-1,000
Tiempo de vuelo (TOF)	10,000-20,000	10-100
Orbitrap	30,000-60,000	0.1-1
Transformada de Fourier (FTMS)	100,000-1 x 10 ⁶	0.1-1

ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TANDEM

Esta técnica analítica se introdujo en los laboratorios de análisis clínicos en la década de los años 80 del siglo XX.¹² La palabra tandem viene del inglés *tandem*, cuyo significado

inicial es “bicicleta de dos asientos”, también tiene la acepción de “conjunto de dos elementos que se complementan” o “reunión de dos personas que colaboran en algo”.¹³

Un equipo de MS/MS está constituido de seis componentes básicos: 1) sistema de introducción de muestra; 2)

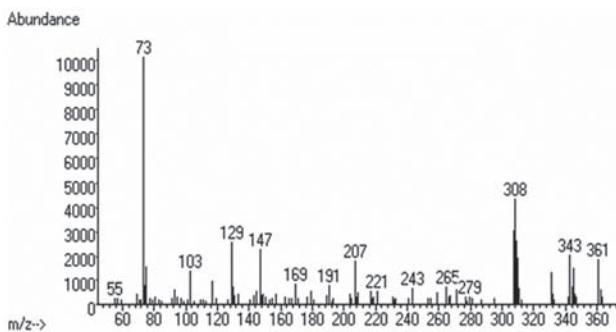


Figura 2. Espectro de masas del patrón de fragmentación de la sucralosa, obtenido mediante un equipo con fuente de ionización por impacto electrónico. Cada pico representa un fragmento de la molécula. Este tipo de MS es útil para la identificación de compuestos por su patrón de fragmentación.

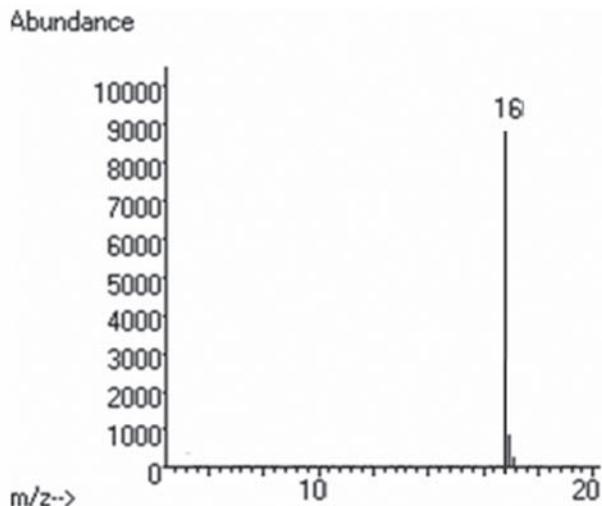


Figura 3. Espectro de masas del metano obtenido mediante una fuente de ionización suave. La masa monoisotópica del metano es 16, este es el pico de mayor abundancia en el espectro. La contribución isotópica en al naturaleza de un C13 o deuterio es aproximadamente 1.2%, por lo tanto se observa un pico pequeño en el valor m/z 17. Mediante este tipo de MS se puede determinar la relación isotópica de los compuestos.

fuente de ionización; 3) primer analizador de masas (MS_1); 4) cámara o celda de colisión; 5) segundo analizador de masas (MS_2); 6) detector. La técnica usualmente se abrevia como: tandem MS, MS/MS, MS^2 , QqQ (en el caso de los equipos triple cuadrupolo).^{7,14}

En la actualidad existen diferentes acoplamientos entre los componentes de los equipos de MS/MS, que se diseñan de acuerdo a la naturaleza de las moléculas de interés (Figura 4).¹¹ Uno de los equipos más utilizados en química clínica es el de tipo triple cuadrupolo, acoplado

a una fuente de ionización por “electrospray” (ESI).⁷ Este equipo funciona de la siguiente manera: Una vez que la muestra ha sido introducida, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga; posteriormente pasa al MS_1 , en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo a su m/z. Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte; los fragmentos generados pasan por el MS_2 , los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS_1 . Los resultados generados se registran en forma de espectro de masas que es como la huella digital de los compuestos.^{6, 7, 15}

Con esta técnica se pueden detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos. También se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para descubrir compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación.⁹

Gracias al desarrollo de este tipo de tecnologías, la química clínica está pasando por un periodo de transición de los análisis individuales, aquellos en los que se utilizaba una muestra de sangre (del orden de mililitros) para la determinación de un solo metabolito, hacia la obtención de “perfils” en los que se obtiene una gran cantidad de información a partir de una muestra de aproximadamente 100 microlitros de sangre, en un tiempo muy corto.^{9, 16}

EL ESTUDIO DE LA METABOLÓMICA EN PEDIATRÍA

Una de las aplicaciones novedosas de la MS/MS en pediatría, es el estudio de biomarcadores de distintos procesos patológicos. La detección temprana y eficiente de huellas de biomarcadores anormales o de la elevación de aquellos que deben mantenerse en determinados niveles, permitirá hacer diagnósticos más tempranos, predecir el comportamiento y evolución de algunas enfermedades o ambas.^{9, 17-20}

Los estudios metabolómicos mediante MS/MS, que sólo requieren unas gotas de sangre, serán especialmente valiosos en el campo de la neonatología y la perinatología, ya que otros tipos de análisis requieren muestras de sangre mucho mayores, cuya obtención puede tener riesgo. Ejemplo de esto es el neonato con muy bajo peso, cuyo volumen de sangre disponible es limitado para medir procesos patológicos.⁹

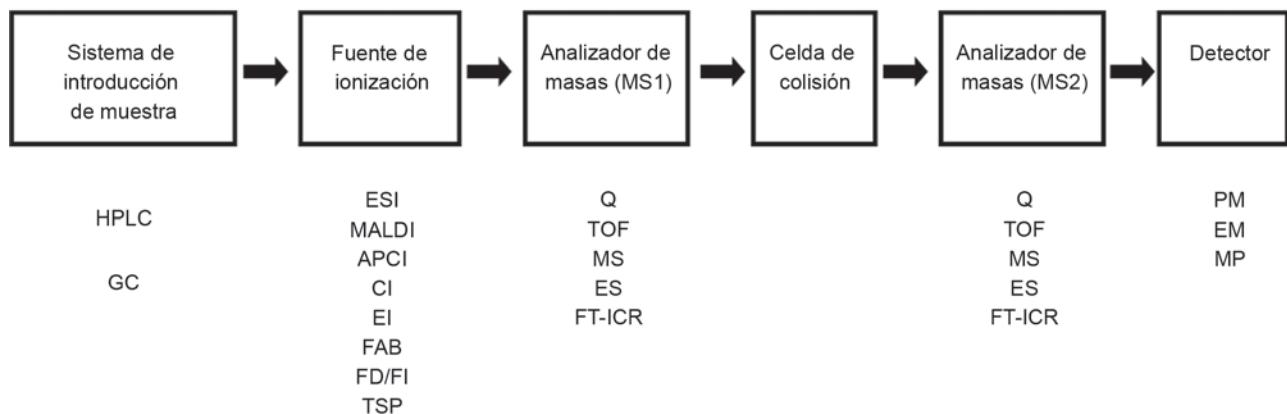


Figura 4. Esquema general de un sistema MS/MS con ejemplos de cada módulo en la parte inferior. **Abreviaturas:** **HPLC** High Performance Liquid Chromatography, **GC** Gas Chromatography, **ESI** Electrospray Ionisation, **MALDI** Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation; **APCI** Atmospheric Pressure Chemical Ionisation; **CI** Chemical Ionisation; **EI** Electron Impact; **FAB** Fast Atom Bombardment; **FD/FI** Field Desorption/Field Ionisation, **TSP** Thermospray Ionisation, **Q** Quadrupole, **TOF** Time of Flight, **MS** Magnetic sector, **ES** Electronic sector, **FT-ICR** Fourier transform, **PM** Photomultiplier, **EM** electron multiplier, **MP** Microchannel Plate.

En el futuro inmediato algunos problemas del embarazo y del feto como la hipertensión inducida por el embarazo, la restricción del crecimiento *in utero*, la diabetes gestacional y la insuficiencia placentaria podrán ser examinados mediante el estudio de la metabolómica. Varias áreas del cuidado intensivo neonatal serán las más beneficiadas de la metabolómica del neonato, como son:

- Diagnóstico mediante biomarcadores y evaluación de la eficacia del tratamiento de la septicemia neonatal;
- diagnóstico temprano de hipoxia isquémica u otra causa de daño cerebral neonatal;
- optimización del tratamiento nutricional del paciente con alimentación parenteral;
- marcadores de inflamación en la patogénesis de enfermedades crónicas de pulmón e hígado;
- terapia farmacológica individualizada;
- evaluación complementaria del estado nutricional.⁹

La aplicación más común de la MS/MS es el tamiz neonatal ampliado (TN)²¹, en el cual, a partir de una gota de sangre depositada en papel filtro (SPF), se obtiene simultáneamente el perfil de 11 aminoácidos (AA) y 33 acilcarnitinas (AC) en aproximadamente dos minutos.⁷

En 1990 se publicó el primer informe sobre el uso de la MS/MS como método para tamiz neonatal a partir de muestras de SPF.^{15, 22-24} La importancia de esta tecnología radica en su capacidad de análisis de múltiples compuestos de manera simultánea, con un alto grado de sensibilidad, lo cual puede identificar enfermedades metabólicas antes que tengan expresión clínica, es decir, en el periodo asintomático, lo cual permite iniciar un tratamiento oportuno,

para salvar la vida y prevenir secuelas en los pacientes afectados.^{9, 15}

Los equipos de MS se utilizan en muchos laboratorios alrededor del mundo para analizar miles de compuestos presentes en nuestro organismo, en el ambiente, en los medicamentos, en materiales manufacturados, en alimentos, en venenos y en evidencia criminal.²⁵⁻³³

La MS/MS también puede utilizarse para detectar y evaluar la presencia de muchas clases de metabolitos como esteroides, ácidos biliares, nucléicos, grasos y lípidos.³⁴ Hoy en día la MS/MS comienza a ser utilizada en los laboratorios clínicos y reemplaza, incluso, a los ensayos inmunológicos, para analizar una gran cantidad de biomarcadores clínicos, con sensibilidad y especificidad que proporcionan un resultado más preciso y significativo.³⁵

Por lo tanto la MS/MS puede tener tantas aplicaciones como nuestra imaginación nos permita, siempre y cuando la molécula de interés o el biomarcador tenga las propiedades fisicoquímicas adecuadas para su análisis mediante esta técnica.

Otro beneficio de esta metodología es que reduce al mínimo el riesgo del analista al trabajar con líquidos biológicos, debido a que la muestra utilizada es sangre seca en papel filtro, lo que permite que sea fácilmente transportable y no requiere redes frías para su manejo; también permite realizar estudios multicéntricos y masivos.⁹

Finalmente, para que esta metodología clínica sea útil en la práctica médica, es indispensable que los médicos conozcan sus beneficios y comprendan su fundamento para que puedan solicitarlo en beneficio de los pacientes. Por lo

tanto, la educación del personal de salud es la clave para la expansión y el éxito continuo de la MS.^{8,34}

REFERENCIAS

1. Sumer LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 2003;62:817-36.
2. Dunn WB, Bailey N, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*. 2005;130:606-25.
3. Pasikanti KK, Ho PC, Chan ECY. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B Analys Technol Biomed Life Sci*. 2008;871:202-11.
4. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev*. 2001;101:445-77.
5. Morris RG. LC Mass Spectrometry. *Clin Biochem*. 2005;38:295.
6. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Chem*. 2005;38:296-309.
7. Matern D, Magera MJ. Mass spectrometry methods for metabolic and health assessment. *J Nutr*. 2001;131:1615-20.
8. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:17-45.
9. Spitzer A, Chace DH. Proteomics and metabolomics-based neonatal diagnostics in assessing and managing the critically ill neonate. *Clin Perinatol*. 2008;35:695-716.
10. Griffiths WJ, Johnson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J*. 2001;355:545-61.
11. Middle Atlantic Mass Spectrometry Laboratory. Johns Hopkins University. Disponible en: <http://www.hopkinsmedicine.org/mams/>. Consultado: 15 de mayo de 2009.
12. Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: Clinical and laboratory aspects. *Clin Chem*. 2006;39:315-32.
13. Neufeldt V, Guralnik DB. Webster's new world college dictionary. 3rd ed. New York: Macmillan; 1997.
14. Chace DH, Sparkman D. What is mass spectrometry? The importance of communicating the concept of mass spectrometry to professionals, media and the consumer. En: American Society for Mass Spectrometry. Disponible en: <http://www.asms.org/portals/0/WhatIsMSPoster.pdf>. Consultado: 2 de abril de 2009.
15. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003;49:1797-817.
16. Grayson MA. Measuring mass: from positive rays to proteins. USA: Chemical Heritage Press; 2002. p. 160.
17. Wolak JE, Esther CR, O'Connell TM. Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from cystic fibrosis patients. *Biomarkers*. 2009;14:55-60.
18. Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem*. 2007;53:2169-76.
19. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, Heberger K, Giordano G, Zanconato S et. al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:986-90.
20. Kawashima H, Oguchi M, Loi H, Amaha M, Yamanaka G, Kasihwagi Y et. al. Primary biomarkers in cerebral spinal fluid obtained from patients with influenza-associated encephalopathy analyzed by metabolomics. *Int J Neurosci*. 2006;116:927-36.
21. Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening of inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;758:27.
22. Chace DH. Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions. *J Mass Spectrom*. 2009;44:163-70.
23. Copeland S. A review of newborn screening in the area of tandem mass spectrometry: What's new for the pediatric neurologist? *Semin Pediatr Neurol*. 2008;15:110-6.
24. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 1990;13:321-4.
25. Chace DH, Singleton S, DiPerna J, Aiello M, Foley T. Rapid metabolic and newborn screening of thyroxine (T4) from dried blood spots by MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2009;403:178-83.
26. Chen Z, Chen B, Yao S. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Anal Chim Acta*. 2006;569:169-75.
27. Hannisdal R, Ueland PM, Svardal A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of folate and folate catabolites in human serum. *Clin Chem*. 2009;55:1147-54.
28. Höller U, Wachter F, Wehrli C, Fizet C. Quantification of biotin in feed, food, tablets and premixes using HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analys Technol Biomed Life Sci*. 2006;831:8-16.
29. Kang W, Kim K. Determination of talniflumate and niflumic acid in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Sci*. 2009;25:571-4.
30. Lee SJ, Park S, Choi JY, Shim JH, Shin EH, Choi JH. Multi-residue analysis of pesticides with hydrolyzable functionality in cooked vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2009;23:719-31.
31. Liang XP, Liang QL, Xia JF, Wang Y, Hu P, Wang YM et. al. Simultaneous determination of sixteen metabolites related to neural tube defects in maternal serum by liquid chromatography coupling with electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2009;78:1246-52.
32. Minutti C, Lacey JM, Magera MJ, Hahn SH, McCann M, Schulze A et. al. Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:3587-693.
33. Taylor PJ, Cooper DP, Gordon RD, Stowasser M. Measurement of aldosterone in human plasma by semiautomated HPLC-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2009;55:1155-62.
34. Spitzer A, Chace DH. Mass spectrometry in neonatal medicine and clinical diagnostics- the potential use of mass spectrometry in neonatal brain monitoring. *Clin Perinatol*. 2006;33:729-44.
35. Xin L, Xinjie Z, Changmin B, Chunxia B, Guo L, Guowang X. LC-MS based metabolomics analysis. *J Chromatogr B Analys Technol Biomed Life Sci*. 2008;866:64-76.