

原 著

## HILIC-MS-MS による 血漿中アミノグリコシド系抗菌薬の簡易迅速分析法

<sup>1)</sup> 昭和大学医学部法医学講座

<sup>2)</sup> 昭和大学藤が丘病院腎臓内科

<sup>3)</sup> 国立保健医療科学院

大宮 信哉<sup>1,2)</sup> 熊澤 武志\*<sup>1)</sup> 李 暁鵬<sup>1)</sup>

庄司 幸子<sup>1)</sup> 佐藤 淳一<sup>1)</sup> 澤口 聡子<sup>1,3)</sup>

吉村吾志夫<sup>2)</sup> 佐藤 啓造<sup>1)</sup>

抄録：アミノグリコシド系抗菌薬は腎毒性および神経毒性を有しており，その血中濃度を把握することは治療上重要である．本研究では，ヒト血漿中のアミノグリコシド系抗菌薬6種類について，親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）-タンデム質量分析（MS-MS）を用いた簡便かつ迅速な分析法を開発し，その有用性の検証を行った．血漿は50  $\mu$ lを分取し，超純水：0.1%ギ酸-アセトニトリル（1：3）の溶液430  $\mu$ lを加え，遠心分離後，上清10  $\mu$ lをInertsil Amide メタルフリー PEEK カラム（長さ50 mm，内径2.1 mm，粒子径3  $\mu$ m）を装着したHILIC-MS-MS装置に直接注入した．移動相は0.1%ギ酸水溶液と0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液を用い，流量0.6 ml/分でリニアグラジエント法による溶出を行った．アミノグリコシド系抗菌薬のシングルMS分析では，6種類すべての薬物において[M+H]<sup>+</sup>のプロトン化分子がベースピークとなったが，MS-MS分析ではグリコシド結合の開裂による複数のプロダクトイオンが生成された．選択反応モニタリング（SRM）測定では，プリカーサーイオンとベースピークを示したプロダクトイオンとの組み合わせによって，ストレプトマイシン  $m/z$  582 > 263，リボスタマイシン  $m/z$  455 > 163，カナマイシン  $m/z$  485 > 163，アミカシン  $m/z$  586 > 264，ジベカシン  $m/z$  452 > 324，アルベカシン  $m/z$  553 > 264をそれぞれ設定した．SRMクロマトグラムでは6種類の薬物が1.4分以内に検出され，薬物非添加血漿では対象薬物が検出される溶出時間に重複するピークは見られなかった．マトリックス効果は9.8～72%でイオン化の抑制がみられたほか，回収率は23～77%，抽出効率は72～105%であった．また，定量限界は3.9～16  $\mu$ g/ml，検出限界は0.12～0.98  $\mu$ g/ml，日内変動および日間変動の精度は1.0～19%，真度は80～114%であった．さらに，今回開発したHILIC-MS-MS法をストレプトマイシンまたはカナマイシンの筋肉注射による投与を受けた男性患者1名から注射後，4時間に採血した血漿に応用したところ，前者は16  $\mu$ g/ml，後者は14  $\mu$ g/mlと定量できた．本法は，アミノグリコシド系抗菌薬の簡便かつ迅速な分析法として，臨床領域でのドラッグモニタリングや法医学領域における中毒原因物質の同定・定量に有用であることが示唆された．

キーワード：アミノグリコシド系抗菌薬，親水性相互作用液体クロマトグラフィー法，タンデム質量分析法，血漿

アミノグリコシド系抗菌薬は抗菌スペクトルが広く，グラム陽性菌，グラム陰性菌，抗酸菌などに対して強い抗菌活性を持つ<sup>1)</sup>．特に，この抗菌薬は結核菌，緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌

などに適応があり，かつ感染管理上問題になる細菌に対する治療薬としてよく使用されている<sup>1)</sup>．しかし，アミノグリコシド系抗菌薬は腎臓や内耳神経に強い毒性を示すことが知られており，血液中のド

\*責任著者

ラッグモニタリングを厳密に行う必要がある<sup>2-4)</sup>。

ヒト血液中のアミノグリコシド系抗菌薬の分析法は、従来から微生物学的試験法、免疫学的測定法、ラテックス凝集免疫比濁法などが用いられてきたが、交差反応が原因で偽高値になることがあり、結果の判定には留意する必要がある<sup>3)</sup>。一方、近年のクロマトグラフィーによる分離分析技術の発展に伴い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法をはじめ、HPLC-質量分析 (MS) 法<sup>5,6)</sup>および HPLC-タンデム質量分析 (MS-MS) 法<sup>7-9)</sup>は、より信頼性の高い分析法として用いられ、各種の食品や生体試料などに含まれるアミノグリコシド系抗菌薬の高感度分析法が可能になっている<sup>7-9)</sup>。

本研究では、血漿中アミノグリコシド系抗菌薬 6 種類 (ストレプトマイシン、リボスタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシンおよびアルベカシン) について、親水性相互作用を利用した液体クロマトグラフィー (HILIC) 法と MS-MS 法を組み合わせた新しい HILIC-MS-MS 法の開発を検討した。本法は、簡単な微量抽出法の後に抽出液をメタルフリー PEEK 製の HILIC 分析カラムに直接注入することによって、定量性に優れた簡易迅速分析法が可能となり、実際例の分析にも応用した。なお、リボスタマイシン、ジベカシンおよびアルベカシンの HILIC-MS-MS 法に関して、これまでにヒトの生体試料を対象にした報告はなく、しかもヒト血漿中アミノグリコシド系抗菌薬のメタルフリーピークカラムを使用した HILIC 分析は、われわれの知る限りでは本研究が初めての報告である。

## 研究 方法

### 1. 試薬

本研究で使用したストレプトマイシン、リボスタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシンおよびアルベカシン (Table 1) は、すべてが硫酸塩の原末で、Meiji Seika ファルマ (東京) より提供された。また、ギ酸、アセトニトリルおよび 0.1% ギ酸-アセトニトリル溶液は和光純薬工業 (大阪) の LC-MS グレードを用い、その他の試薬は特級品を用いた。超純水は小松電子 (石川) の超純水製造装置「うるびゅあ」から採水したものを使用した。

### 2. 血漿の作製法

添加実験用の血漿は、健常者 5 名の全血から作製

した。全血は経静脈的に採血管 (7 ml 容量, EDTA-2Na 含有) に採取し, 1,800×g, 10℃ で 15 分間の遠心分離によって血漿を分取した。この 5 名分の血漿はプラスチックチューブ内で均等に混合し, 使用するまで -80℃ で保存した。

### 3. HILIC-MS-MS システム

HILIC-MS-MS システムは, 1100 シリーズ液体クロマトグラフ (Agilent, Santa Clara, CA, USA) と API 2000 トリプル四重極型タンデム質量分析計 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を連結した構成で, 本研究におけるすべての測定において使用した。

#### 1) HILIC 条件

分析カラムは, Inertsil Amide メタルフリーピークカラム (長さ 50 mm, 内径 2.1 mm, 粒子径 3 μm; GL サイエンス, 東京) を用い, ガードカラムは Inertsil Amide ノンメタルカートリッジガードカラム Ei (長さ 2.1 mm, 内径 10 mm, 粒子径 3 μm; GL サイエンス) を分析カラム上流側に装着した。移動相は 0.1% ギ酸水溶液 (溶媒 A) と 0.1% ギ酸-アセトニトリル溶液 (溶媒 B) を用い, 溶媒 B をベースにした溶媒 A の 30 ~ 50% までのリニアグラジエント法を行った (Table 2)。測定終了後, 分析カラムは溶媒 A 30%, 溶媒 B 70% によって 3 分間の平衡化を行い, 次の測定に備えた。移動相の流速は 0.6 ml/分, 分析 1 回あたりのサイクルタイムは 7 分であった。一方, 分析カラムの温度は 40℃, 試料の注入量は 10 μl にそれぞれ設定した。移動相の脱気は, 1100 シリーズ真空デガッサ (モデル G1322A, Agilent) によってオンラインで行った。

本研究では最適な分析カラムを選択する目的で, 現在市販されている HILIC カラムの有用性を比較検討した。対象とした HILIC カラムは前記の Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムのほかに, Inertsil Amide カラム (長さ 50 mm, 内径 2.1 mm, 粒子径 3 μm; GL サイエンス), Unison UK-Amino カラム (長さ 50 mm, 内径 3 mm, 粒子径 3 μm; インタクト, 京都), ZIC-cHILIC PEEK カラム (長さ 50 mm, 内径 2.1 mm, 粒子径 3.5 μm; Merck, Darmstadt, Germany), Atlantis HILIC シリカカラム (長さ 50 mm, 内径 2.1 mm, 粒子径 3 μm; Waters, Milford, MA, USA) の 4 種類を使用した。

#### 2) MS 条件

MS 測定は, 正イオンモードのエレクトロスプレー

アミノグリコシド系抗菌薬の HILIC-MS-MS 分析

Table 1 Chemical structures of six aminoglycoside antimicrobials used in the present study and their probable fragmentation modes

Streptomycin	Amikacin
Ribostamycin	Dibekacin
Kanamycin	Arbekacin

Table 2 HILIC conditions on the Inertsil Amide, Unison UK-Amino, ZIC-cHILIC, and Atlantis HILIC silica columns

Stationary phase	Time (min)	Mobile phase		Gradient elution	Flow rate (ml/min)	Ref.
		Solvent A	Solvent B	%A/B		
Inertsil Amide (metal-free PEEK)	0.0	0.1% formic acid in	0.1% formic	30/ 70	0.6	
	4.0	purified water	acid-acetonitrile	50/ 50		
	4.1			30/ 70		
	7.0			30/ 70		
Inertsil Amide	0.0	0.1% formic acid in	0.1% formic	30/ 70	0.6	11
	4.0	purified water	acid-acetonitrile	50/ 50		
	4.1			30/ 70		
	7.0			30/ 70		
Unison UK-Amino	0.0	formic acid in purified	Acetonitrile	10/ 90	0.7	
	0.5	water (pH4.2)		10/ 90		
	5.0			99/ 1		
	8.0			99/ 1		
	8.1			0/100		
	9.9			0/100		
	10.0			10/ 90		
ZIC-cHILIC (PEEK)	0.0	100 mM ammonium	1% formic	50/ 50	0.6	12
	4.0	acetate, 3% formic acid	acid-acetonitrile	95/ 5		
	5.0	in purified water		95/ 5		
	9.0			50/ 50		
Atlantis HILIC silica	0.0	0.1% formic acid in	0.1% formic	50/ 50	0.2	13
	0.5	purified water	acid-acetonitrile	50/ 50		
	1.0			80/ 20		
	2.5			80/ 20		
	2.6			50/ 50		
	9.0			50/ 50		

イオン化 (ESI) 法によって行われた。その他の MS の各種設定は、ターボイオンスプレー温度：450°C、イオンソース：5 kV、集束電極電圧：240 V、ネブライザーガス圧 (高純度空気)：35 psi、ヒーターガス圧 (高純度空気)：80 psi、カーテンガス圧 (高純度窒素)：30 psi、フルスキャンモードにおける質量範囲： $m/z$  50-1000、データ取り込み時間：125 ms、半値幅 (FWHM)：0.60-0.754  $m/z$ 、コリジョンガス：窒素ガスであった。

MS-MS 測定はオリフィス電圧とコリジョン電圧の調整によって、6 種類の薬物それぞれに最適値を設定した (Table 3)。また、選択反応モニタリング (SRM) 法は、プリカーサーイオンとベースピークを示したプロダクイオンとの組み合わせから設定

した。なお、データの取り込み、スペクトルおよびクロマトグラム解析は、MS システムに接続した Analyst™ ソフトウェア (ver. 1.0) を用いて行った。

#### 4. 標準液と品質管理 (QC) サンプルの作製

6 種類のアミノグリコシド系抗菌薬の保存用標準液は、それぞれの原末 2.5 g を精密に秤量した後、超純水 100 ml に溶解し、25 mg/ml の濃度に調製した。その後、この保存用標準液から超純水を用いた希釈によって、0.98 ~ 500  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  の範囲の標準液を作製した。これらの保存用標準液および標準液は、すべてシラン処理済み褐色バイアル瓶に入れ、使用するまで 4°C で保存した。また、検量線用の薬物添加試料は、血漿 50  $\mu\text{l}$  当たり 3.9 ~ 500  $\mu\text{g}$  の濃度範囲で作製した。なお、検量線は内部標準 (IS)

Table 3 Optimised tandem mass spectrometry parameters for the six aminoglycoside antimicrobials

Compound	MW <sup>a</sup>	Precursor ion (m/z)	Product ion <sup>b</sup> m/z (Relative intensity, %)	Orifice voltage (V)	Collision energy (eV)
Streptomycin	581	582	<b>263</b> (100), 246 (41), 221 (29), 176 (26), 217 (12)	152	46
Ribostamycin	454	455	<b>163</b> (100), 161 (57), 295 (51), 323 (15)	53	35
Kanamycin	484	485	<b>163</b> (100), 205 (55), 324 (25)	70	36
Amikacin	585	586	<b>264</b> (100), 425 (72), 163 (47), 324 (36), 205 (22)	80	23
Dibekacin	451	452	<b>324</b> (100), 163 (66), 205 (23), 452 (13)	80	23
Arbekacin	552	553	<b>264</b> (100), 425 (57), 163 (21), 306 (15)	84	28

<sup>a</sup>MW = molecular weight.

<sup>b</sup>Quantifier ions are in bold characters.

法によって作製し、ストレプトマイシン、リボスタマイシン、アミカシン、ジベカシンおよびアルベカシンの検量線にはカナマイシンを、カナマイシンの検量線にはリボスタマイシンをそれぞれ IS として使用した。QC サンプルは検量線と同様の方法で、血漿 50 µl 中 3.9 ~ 250 µg の薬物濃度範囲で作製した。

#### 5. 血漿試料の作製

血漿試料は次の方法で作製した。血漿 50 µl に、標準液 (5 種類の薬物含有) 10 µl と IS 10 µl (添加あるいは非添加) を混和し、5 分間の静置後、さらに超純水: 0.1% ギ酸-アセトニトリル (1:3) 溶液 430 µl を混和し、15,000 rpm の遠心分離を 10°C で 10 分間行った。最後に、上清 300 µl を採取し、その 10 µl を HILIC-MS-MS システムに直接注入した。

#### 6. 分析法の妥当性検証

本研究では検量線、日内変動および日間変動の精度 (precision) 並びに真度 (accuracy)、検出限界 (LOD)、定量限界 (LOQ) の項目について、今回開発した分析法の妥当性を検証した。検量線は血漿から抽出・検出された対象薬物と IS とのピーク面積比を用いた一次回帰直線式 ( $y = ax + b$ ,  $y$ : ピーク面積比,  $x$ : 薬物濃度) から作製した。また、相関係数は 0.99 以上を直線性の判定基準とした。さらに、日内変動の精度と真度は QC サンプルを用い、同じ日に 3 種類の薬物濃度で、それぞれ 3 回ずつ測定した結果から算出した。同様に、日間変動の精度と真度も QC サンプルを用い、3 種類の濃度で、それぞれを 1 日 1 回ずつ 3 日間連続で測定した結果から算出した。この時の QC サンプル中の薬物濃度は、作製した検量線から計算され、精度は相対標準

偏差 (RSD) が 15% 未満、真度は測定値が理論値の ±15% 以内をそれぞれの許容基準とした。さらに、LOD は血漿に添加した薬物が SRM クロマトグラム上で S/N 比=3 で検出できる濃度、LOQ は日内変動と日間変動の RSD 値が 20% 未満、真度が ±20% となる検量線上の最小濃度とした。これら分析法の妥当性の評価基準は、米国食品医薬品局 (FDA) のガイドラインに従った<sup>10)</sup>。

マトリックス効果、回収率および抽出効率、3 種類の薬物濃度の QC サンプルを用い、次の計算式から算出した: マトリックス効果 (%) =  $100 - ((\text{抽出操作後の血漿試料に標準液を加えて得られたピーク面積}) / (\text{初期移動相に標準液を加え直接注入して得られたピーク面積}) \times 100)$ , 回収率 (%) =  $(\text{QC サンプルのピーク面積}) / (\text{初期移動相に標準液を加え直接注入して得られたピーク面積}) \times 100$ , 抽出効率 (%) =  $(\text{QC サンプルのピーク面積}) / (\text{抽出後の血漿試料に標準液を加えて得られたピーク面積}) \times 100$ 。

#### 7. HILIC-MS-MS 法の実例への応用

本研究では、ストレプトマイシンおよびカナマイシンを男性患者 (32 歳, 体重 95 kg) に筋肉注射を用いて投与し、投与後の血液から両薬物の検出を試みた。投与する製剤は薬物が 250 mg/ml 含有の注射液で、その 4 ml を 1 回投与した。また、血液は投与前、投与後 1 時間、2 時間および 3 時間で経静脈的に採血管 (7 ml 容量, EDTA-2Na 含有) に採取された。この血液は 1,800 × g, 室温で 15 分間の遠心分離後、血漿を採取し、使用するまで -80°C で保存した。

薬物の分析では、冷凍保存の血漿を室温で解凍し

た後、その 50  $\mu$ l に IS 10  $\mu$ l を混和した。この血液試料は 5 分間の静置後、超純水 : 0.1% ギ酸 - アセトニトリル (1 : 3) 溶液 430  $\mu$ l を混和し、19,600  $\times$  g の遠心分離を 10 $^{\circ}$ C で 10 分間行った。最後に、上清 300  $\mu$ l を採取し、その 10  $\mu$ l は HILIC-MS-MS システムに直接注入された。なお、本実際例では 1 人の男性患者にストレプトマイシンとカナマイシンの 2 種類を投与したが、両者は別々に投与され、ストレプトマイシン投与の 2 週間後にカナマイシン投与を行った。本研究は、昭和大学医学部医の倫理委員会の承認 (承認番号 1745) を得て実施された。

## 結 果

### 1. マススペクトル解析

アミノグリコシド系抗菌薬 6 種類の MS 特性は、最初に各薬物のインフュージョン法によって測定した。その結果は、実際の HILIC 分析カラムを用いた分析システムにおいて微調整し、最適な MS および MS-MS 条件を設定した。

シングル MS 法によるフルスキャンモードでは、いずれの薬物においても  $[M+H]^+$  のプロトン化分子がベースピークとして検出された (Table 3)。さらに、プロトン化分子は、窒素ガスを用いた衝突誘起解離によって複数のプロダクトイオンを生成した。その中で、ストレプトマイシン  $m/z$  263, リボスタマイシン  $m/z$  163, カナマイシン  $m/z$  163, アミカシン  $m/z$  264, ジベカシン  $m/z$  324 およびアルベカシン  $m/z$  264 がベースピークとして観察された。その結果、6 種類のアミノグリコシド系抗菌薬の SRM 測定では、プリカーサーイオンとプロダクトイオンの組合せを、ストレプトマイシン :  $m/z$  582 > 263, リボスタマイシン :  $m/z$  455 > 163, カナマイシン :  $m/z$  485 > 163, アミカシン :  $m/z$  586 > 264, ジベカシン :  $m/z$  452 > 324, アルベカシン :  $m/z$  553 > 264 にそれぞれ設定した。

### 2. HILIC 分析カラムの比較

本研究では、アミノグリコシド系抗菌薬 6 種類について最適な HILIC 分析を設定するために、市販の分析カラム 5 種類 (Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラム, Inertsil Amide カラム, Unison UK-Amino カラム, ZIC-cHILIC PEEK カラムおよび Atlantis HILIC シリカカラム) を用い、SRM クロマトグラム上の分離能、溶出時間およびピーク強度を比較し

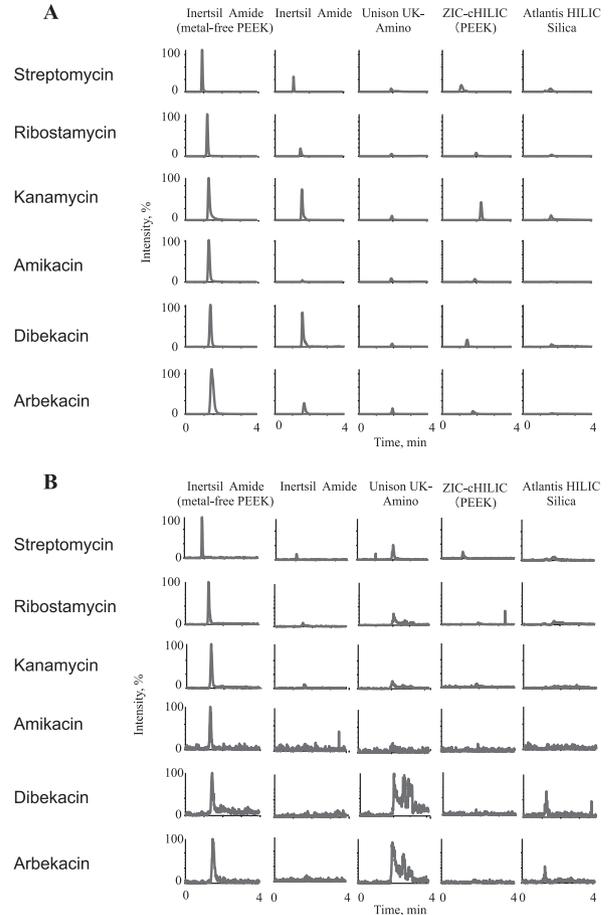


Fig. 1 SRM chromatograms for the six aminoglycoside antimicrobials from human plasma using five HILIC columns commercially available. The amount of each drug spiked into 50  $\mu$ l of plasma was 3.1  $\mu$ g (panel A) and 0.049  $\mu$ g (panel B).

た。使用した分析カラムは、条件を一定にするために、カラムの長さ、内径および粒子径をそれぞれ 50 mm, 2.1 ~ 3.0 mm および 3 ~ 3.5  $\mu$ m に統一した。移動相の条件は、Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムおよび Unison UK-Amino カラムはわれわれが独自に設定したが、その他のカラムは既報あるいは製造会社の仕様書を参考に設定した<sup>11-13)</sup> (Table 2)。その結果、6 種類の薬物の分離能は ZIC-cHILIC PEEK カラムが最も良く、他の 4 種類のカラムには大きな違いが見られなかった (Fig. 1, パネル A)。また、6 種類の薬物の溶出時間は、すべてのカラムにおいて 3 分以内であった。さらに、ピーク強度は血漿中の薬物添加濃度が 62.5  $\mu$ g/ml (Fig. 1, パネ

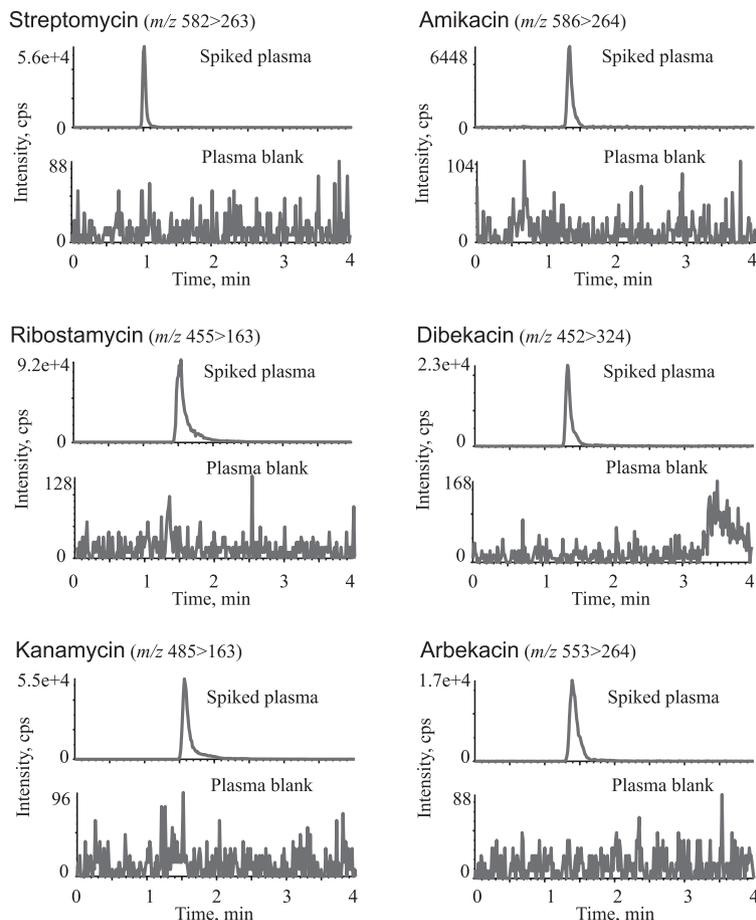


Fig. 2 SRM chromatograms for the six aminoglycoside antimicrobials from human plasma using the Inertsil Amide metal-free PEEK column when 1.6  $\mu\text{g}$  of each compound was spiked into 50  $\mu\text{l}$  of plasma.

ル A) および 0.98  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Fig. 1, パネル B) のいずれにおいても, Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムが最も高く, 他のカラムに比べてストレプトマイシンは 3~8 倍, リボスタマイシンは 4~11 倍, カナマイシンは 7~13 倍, アミカシンは 4~17 倍, ジベカシンは 3~18 倍, アルベカシンは 5~24 倍良好な結果であった. したがって, これ以降の実験では Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムを用いた HILIC-MS-MS 法を行った.

### 3. 分析法の妥当性検証

#### 1) SRM クロマトグラムの検討

アミノグリコシド系抗菌薬 6 種類を血漿に添加して得られた SRM クロマトグラムは, すべての薬物が明瞭なピークとして検出された (Fig. 2). 溶出時間はストレプトマイシン, リボスタマイシン, アミ

カシン, カナマイシン, ジベカシンおよびアルベカシンがそれぞれ 0.91, 1.18, 1.28, 1.31, 1.29, 1.38 分であった (Fig. 2, 上図). また, 薬物非添加血漿において, 6 種類の薬物が検出される溶出時間には重複するピークの出現は見られなかった (Fig. 2, 下図).

#### 2) マトリックス効果, 回収率および抽出効率の検討

本法におけるアミノグリコシド系抗菌薬 6 種類のマトリックス効果, 回収率および抽出効率を Table 4 に示す. マトリックス効果はジベカシンが 61~72%, ストレプトマイシンおよびリボスタマイシンが 34~68%, カナマイシンが 49~69%, アミカシンおよびアルベカシンが 9.8~46% で, いずれの薬物でもイオン強度の抑制が観察された. また, 回

Table 4 Matrix effect, recovery, and extraction efficiency of six aminoglycoside antimicrobials from human plasma

Compound	Concentration added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Matrix effect <sup>a</sup> (%)	Recovery <sup>a</sup> (%)	Extraction efficiency <sup>a</sup> (%)
Streptomycin	7.8	68	31	96
	31	48	47	91
	125	35	61	94
Ribostamycin	7.8	57	45	105
	31	41	54	92
	125	34	53	81
Kanamycin	7.8	62	33	88
	31	69	27	87
	125	49	45	89
Amikacin	16	33	69	103
	63	16	77	92
	250	16	74	89
Dibekacin	16	68	23	72
	63	61	33	85
	125	72	25	90
Arbekacin	16	46	45	84
	63	36	59	92
	250	9.8	73	81

<sup>a</sup>Data are presented as mean values of four experiments.

Table 5 Data on regression equations for the six aminoglycoside antimicrobials extracted from human plasma by the present method

Compound	Equation <sup>a</sup>	Correlation coefficient ( $r$ )	Concentration range ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )
Streptomycin	$y = 0.0113x + 0.0126$	0.9985	3.9 ~ 125	0.12
Ribostamycin	$y = 0.0326x - 0.0298$	0.9988	3.9 ~ 250	0.24
Kanamycin	$y = 0.0161x + 0.0545$	0.9993	7.8 ~ 500	0.98
Amikacin	$y = 0.0016x + 0.0179$	0.9993	16 ~ 500	0.98
Dibekacin	$y = 0.0075x + 0.0100$	0.9987	7.8 ~ 500	0.49
Arbekacin	$y = 0.0099x - 0.0037$	0.9990	7.8 ~ 500	0.98

<sup>a</sup>The linear regression was obtained by fitting peak area ratios ( $y$ ) of each compound to the IS against the spiking concentrations ( $x$ ). Responses from five different concentrations for each compound were used to obtain the equations.

収率は23~77%の範囲で、ジベカシンが最も低く、アミカシンが最も高かった。抽出効率も、すべての薬物において72~105%の範囲であった。

### 3) 検量線の検討

検量線はストレプトマイシンおよびリボスタマイシンが3.9~125  $\mu\text{g/ml}$  (リボスタマイシンは250  $\mu\text{g}/$

ml), カナマイシン, ジベカシン, アルベカシンが7.8~500  $\mu\text{g/ml}$ , アミカシンが16~500  $\mu\text{g/ml}$  の範囲でいずれも相関係数 ( $r$ ) が0.99以上の良好な直線性が得られた (Table 5)。また, 6種類の薬物において, LOQは3.9~16  $\mu\text{g/ml}$ , LODは0.12~0.98  $\mu\text{g/ml}$  であった。

Table 6 Intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) and accuracy for the six aminoglycoside antimicrobials in human plasma

Compound	Concentration added (µg/ml)	Intra-day (n=3)		Inter-day (n=3)	
		RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
Streptomycin	3.9	5.2	80	10	81
	31	5.1	100	3.1	106
	125	4.6	96	8.8	95
Ribostamycin	3.9	7.4	105	19	114
	31	6.8	90	8	102
	125	3.7	95	4.7	105
Kanamycin	7.8	5.5	91	2.8	97
	31	5.3	94	8	110
	125	1.6	106	10	103
Amikacin	16	1.8	111	9.6	87
	31	1.0	108	3.4	103
	250	3.3	101	2.5	107
Dibekacin	7.8	1.1	106	7.6	97
	31	7.9	114	4.8	111
	125	5.3	106	5	100
Arbekacin	7.8	7.1	90	6.8	98
	31	4.6	114	3.1	104
	125	2.8	114	4.3	98

<sup>a</sup>All data were obtained using IS (See the text).

#### 4) 精度および真度の検討

日内変動および日間変動の精度ならびに真度は、各薬物の LOQ 濃度を含む 3 種類の濃度について検討した (Table 6). その結果、日内変動における精度は 7.9% 以下、真度は 80 ~ 114% であった。また、日間変動における精度は 19% 以下、真度は 81 ~ 114% であった。これらの値は FDA のガイドラインの許容基準以内であった。

#### 4. 実際例への応用

本法の実際例への応用として、男性患者にアミノグリコシド系抗生物質を投与した後、投与薬物の血中濃度を測定し、その推移を観察した。なお、患者の血中薬物濃度は IS 法を用いた検量線から算出した。Fig. 3 にストレプトマイシンおよびカナマイシン投与後の血液から両薬物を検出した SRM クロマトグラムを示す。両薬物は顕著なピークが検出され、投与後 1 時間の血中濃度はそれぞれ 43 µg/ml と 41 µg/ml で、その後は両者共に徐々に減少し、4 時間後ではそれぞれ 16 µg/ml と 14 µg/ml に減少

した (Table 7).

## 考 察

アミノグリコシド系抗菌薬のクロマトグラフィー分析では、高極性化合物の特性上、従来から HPLC 法が行われ、誘導体化法<sup>14)</sup>による検出が考案されてきた。しかし、この HPLC 法は操作の煩雑性から日常検査法として好ましい方法ではなかった。その後、検出器としての MS 技術の進歩によって、アミノグリコシド系抗菌薬の分析法は HPLC-MS 法が最も有効な分析法として評価されている<sup>15)</sup>。一方、HPLC-MS 法で用いられる分析カラムは、オクタデシル基を有する疎水性相互作用を利用した逆相系のカラムが主流で、トリフルオロ酢酸などの揮発性フッ素化カルボン酸をイオンペア試薬として使用することで分離能の改善がみられている<sup>6-9)</sup>。しかし、このイオンペア試薬は MS-ESI 検出のイオン化を抑制することから、十分な検出感度が得られないという欠点も報告されている<sup>16)</sup>。

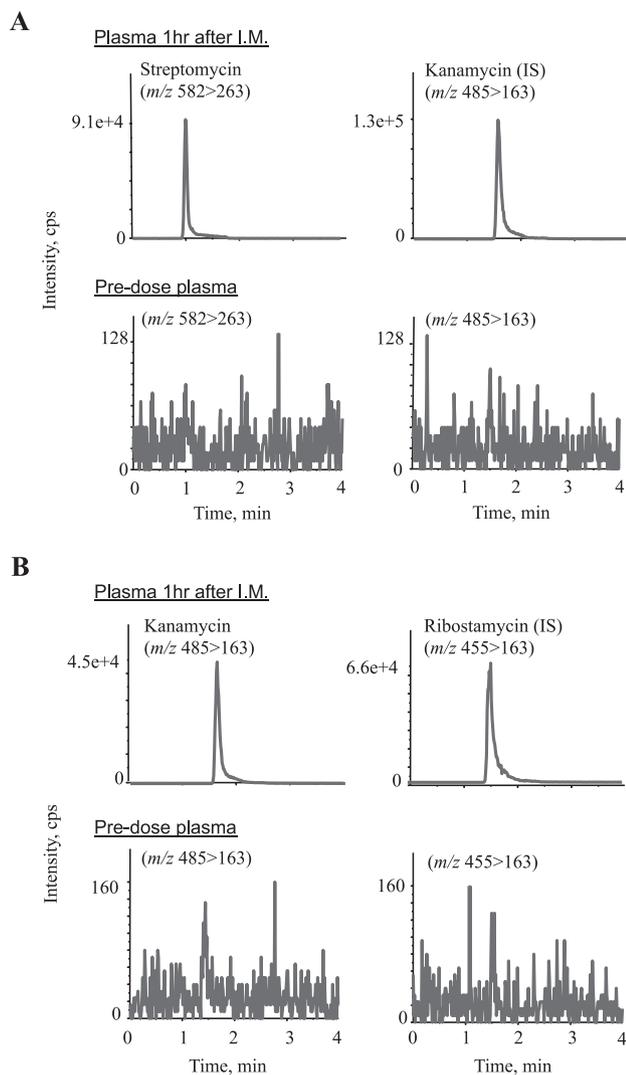


Fig. 3 SRM chromatograms obtained by the present method from the plasma of a male patient 1hr after intramuscular injection of 1000 mg of streptomycin (panel A) or kanamycin (panel B). The amount of kanamycin or ribostamycin used as IS was 1.6  $\mu$ g for 50  $\mu$ l of plasma. I.M.: intramuscular injection.

最近、薬物分析の領域において HILIC 法が用いられつつある<sup>17)</sup>。これは順相クロマトグラフィーの一種で、移動相はアセトニトリルなどの有機溶媒と水（あるいは緩衝液）の混合溶媒を用い、高い有機溶媒比率で使用することによって高極性化合物の分離が可能になる。しかも、イオンペア試薬を添加する必要がなく、MS 法との結合によって、極性化合物の高感度分析が実現できる利点がある<sup>16)</sup>。さらに、液-液抽出、固相抽出および除タンパク上清由

来の有機溶媒リッチな分画を、蒸発乾固、再溶解あるいは希釈などの操作なしに、そのままの状態 HILIC-MS-MS 装置に注入可能である。このような簡便・迅速な試料導入法は本研究においても実現されており、アミノグリコシド系薬物の HILIC-MS-MS 分析法はスループットの向上が期待できる方法である。

本研究では、現在市販されている HILIC カラムの中から、Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラム、Inertsil Amide カラム、Unison UK-Amino カラム、ZIC-cHILIC PEEK カラム、Atlantis HILIC シリカカラムの 5 種類を選択し、SRM クロマトグラム上の薬物の分離能および検出状態を検討した。その結果、6 種類の抗菌薬の分離能は ZIC-cHILIC PEEK カラムが最も良かったが、ピーク強度は Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムが著しく高い値を示した。アミノグリコシド系抗菌薬はアミノ糖を含む配糖体抗菌薬であることから、隣接した位置に水酸基やアミノ基が複数あり、金属配位しやすい化合物であると考えられる。したがって、PEEK 材質をカラム内面に使用している Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムでは、カラム内を通過する薬物は金属結合の影響を受けにくいことが推測できる。しかし、Inertsil Amide カラム、Unison UK-Amino カラムおよび Atlantis HILIC シリカカラムの 3 種類はカラム内面がステンレス材質であることから、薬物のピーク強度が低くなる現象は薬物がステンレス製カラムに吸着したことが原因であると考えられる。また、ZIC-cHILIC PEEK カラムはカラム内面が PEEK 材質であるが、ピーク強度に関しては Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムの 2.4 ~ 12 分の 1 程度であった (Fig. 2)。これは固定相に結合する官能基の違いが HILIC モードの働き方に差が出ていると考えられるほか、分析カラム本来の品質に差があることも考えられる。

アミノグリコシド系薬物 6 種類のスペクトル解析において、シングル MS ではすべての薬物が  $[M+H]^+$  のプロトン化分子がベースピークとして検出された。このプロトン化分子をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンでは、グリコシド結合の開裂によると考えられる複数のプロダクトイオンがすべての薬物で検出されたが、この開裂様式は既報と一致するものであった<sup>9,15)</sup>。また、本研究で

Table 7 Concentrations of aminoglycoside antimicrobials in human plasma samples obtained from a male patient after intramuscular administration

Drug	Dose (mg)	Time after dose (hr)	Concentration of the drug (μg/ml)
Streptomycin	1,000	1	43
		2	30
		3	22
		4	16
Kanamycin	1,000	1	41
		2	36
		3	25
		4	14

は Inertsil Amide メタルフリー PEEK カラムを用いた SRM 測定において、すべての薬物のイオン強度が最も高い値を示したが、各薬物の分離能は低く、溶出時間は 0.9 ~ 1.4 分に集中する傾向にあった。しかし、今回の SRM 測定では、分離能に影響されることなく、6 種類の薬物を短時間かつ高感度に検出することができた。

最近の MS 分析では、高感度分析が可能であると同時に生体試料の微量化が注目されている<sup>18)</sup>。HPLC 法およびガスクロマトグラフィー法を用いた薬物分析では、血液試料の使用量は概ね 1 ~ 2 ml 程度である。しかし、アミノグリコシド系抗菌薬の HILIC-MS-MS 法では、血漿あるいは血清が 100 ~ 500 μl の使用量で報告されている<sup>13, 19-21)</sup>。一方、本研究で開発した方法では、血漿の使用量が 50 μl であり、これはアミノグリコシド系抗菌薬分析において、従来よりも試料の微量化が達成できたことになる。このような分析技術の進歩に伴う変化は、抽出操作で使用される溶媒量にも影響している。アミノグリコシド系抗菌薬の生体試料からの前処理法として、従来から固相抽出法および液-液抽出法が報告されている<sup>6, 7, 8, 16)</sup>。特に、HILIC-MS-MS 法との組合せにおいて、Oertel らは Oasis MCX カートリッジを用いたネオマイシンの抽出<sup>19)</sup>あるいはアミカシン、カナマイシンのほか 4 種類のアミノグリコシド系薬物の抽出<sup>20)</sup>をいずれもメタノール、水、ギ酸溶液の 3 種類の溶媒 5 ml を用いて行っている。一方、Zhou ら<sup>21)</sup>はストレプトマイシンおよび 4 種類の抗

結核薬について、メタノール水溶液、酢酸アンモニウム溶液およびギ酸溶液 360 μl を用いた液-液抽出を、Kim ら<sup>13)</sup>はストレプトマイシン、カナマイシン、アミカシンおよび抗結核薬ピラジナミドをメタノールや塩酸水溶液 210 μl による液-液抽出を、それぞれ報告している。また、本研究では、6 種類のアミノグリコシド系抗菌薬をアセトニトリル、水およびギ酸水溶液 450 μl を用いて液-液抽出を行った。一般に、固相抽出法と液-液抽出法を比較した場合、固相抽出法の方が少ない溶媒量で抽出を行うことができる。しかし、HILIC-MS-MS 法を使用する場合は逆で、液-液抽出法は固相抽出法に比べ格段に少ない溶媒量で抽出操作を行えることから、本法は廃液の少量化による環境に優しい分析法といえる。

HPLC-MS-MS 法による分析では、試料中の夾雑成分の影響によってマトリックス効果を受けることが知られている<sup>22)</sup>。マトリックス効果には、MS のイオン化が抑制される効果とイオン化が促進される効果があるほか、検出の不安定さから再現性が低下する場合がある<sup>23)</sup>。本研究では、アミノグリコシド系抗菌薬について 3 種類の濃度を用いてマトリックス効果を検討したところ、9.8 ~ 72% のイオン化抑制がみられた。また、分析全体の回収率は 23 ~ 77% の範囲であったが、液-液抽出の回収率のみを表す抽出効率率は、72 ~ 105% の範囲であった。これらの結果から 0.1% ギ酸-アセトニトリル (1 : 3) 溶液による液-液抽出では、アミノグリコシド系抗菌薬の回収率は良好であるが、マトリックス効果の影響に

よる本法の検出感度の低下が示唆された。事実、6種類のアミノグリコシド系抗菌薬が溶出される0.9～1.4分付近では、血漿試料由来の複数の紫外吸収ピーク（280 nm 並びに 260 nm）が見られ、対象薬物との重複を確認している（未発表データ）。しかし、Fig. 2に示したように対象薬物のSRMクロマトグラムはシャープなピーク形状を示し、真度および精度並びに検量線の相関係数に関しては、薬物分析の妥当性が評価基準以内であることから（Table 5, 6）、本法はアミノグリコシド系抗菌薬6種類の分析に十分な定量性を有していることが明らかとなった。

本法のLOQはストレプトマイシンとリボスタマイシンが3.9 µg/ml、カナマイシン、ジベカシン、アルベカシンが7.8 µg/ml、アミカシンが16 µg/mlであった。今回用いた6種類の薬物の治療域における血中濃度は、ストレプトマイシンが約40 µg/ml (Cmax値)<sup>24)</sup>、リボスタマイシンが32.6 µg/ml (Cmax値)<sup>25)</sup>、カナマイシンが43.1 µg/ml (Cmax値)<sup>26)</sup>、アミカシンが15～30 µg/ml<sup>27)</sup>、ジベカシンが6.85～10.95 µg/ml（投与後1時間値）<sup>28)</sup>、アルベカシンが15～20 µg/ml (Cpeak値)<sup>29)</sup>とされる。一方、中毒域の血中濃度はストレプトマイシンが40～50 µg/ml以上<sup>30)</sup>、アミカシンが35 µg/ml以上<sup>27)</sup>とされる。したがって、本法は、6種類のアミノグリコシド系抗菌薬について、治療域から中毒域までの血中濃度の測定を可能にする簡便かつ迅速な分析法であることが明らかとなった。本研究で開発した分析法は、臨床領域におけるドラッグモニタリングのみならず、法医学領域における中毒原因物質の同定・定量に有用であると考えられる。

謝辞 本研究を行うにあたり、アミノグリコシド系抗菌薬の原末を提供いただきましたMeiji Seikaファルマ株式会社に心より感謝致します。

#### 利益相反

Meiji Seikaファルマ株式会社よりストレプトマイシン、リボスタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシンおよびアルベカシンの原末の提供を受けている。

#### 文 献

- 1) 斧 康雄. 投薬ガイド 抗菌薬の作用と特徴

アミノ配糖体系薬. 総合臨. 2003;5(増刊):1288-1294.

- 2) Usami S, Abe S, Akita J, *et al.* Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations. *Adv Otorhinolaryngol.* 2000;56:203-211.
- 3) 日本化学療法学会抗菌薬 TDM ガイドライン作成委員会, 日本 TDM 学会 TDM ガイドライン策定委員会抗菌薬領域編. 抗菌薬 TDM ガイドライン. 東京: 日本化学療法学会; 2012.
- 4) Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, *et al.* New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 2011;79:33-45.
- 5) Guo MX, Wrisley L, Maygoo E. Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Anal Chim Acta.* 2006;571:12-16.
- 6) Taira R, Sato K, Kobayashi K, *et al.* Capillary high-performance liquid chromatography/fast atom bombardment-mass spectrometry of nine aminoglycoside antibiotics. *医と生物.* 2012;156:185-193.
- 7) van Bruijnsvoort M, Ottink SJ, Jonker KM, *et al.* Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2004;1058:137-142.
- 8) Kaufmann A, Butcher P, Maden K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Anal Chim Acta.* 2012;711:46-53.
- 9) Breaud AR, Henemyre-Harris CL, Schools S, *et al.* Rapid quantification of the aminoglycoside arbekacin in serum using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2013;418:102-106.
- 10) Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine; 2001. (accessed 2016 Jan 4) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
- 11) ジーエルサイエンス株式会社. HPLC用メタルフリーカラム使用のすすめ その1. LCテクニカルノート. No.152. (2016年1月4日アクセス) [http://www.gls.co.jp/technique/lc\\_technical\\_note/152.pdf](http://www.gls.co.jp/technique/lc_technical_note/152.pdf)
- 12) メルク株式会社. 親水性相互作用 クロマトグラフィー用カラム ZIC®.HILIC シリーズ 逆相

- カラムでは困難だった親水性化合物全般の分析に。(2016年1月4日アクセス) [http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-JP-Site/ja\\_JP/-/JPY/ShowDocument-Pronet?id=201106.022](http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-JP-Site/ja_JP/-/JPY/ShowDocument-Pronet?id=201106.022)
- 13) Kim HJ, Seo KA, Kim HM, *et al.* Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:9-16.
  - 14) Vinas P, Balsalobre N, Hernandez-Cordoba M. Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods. *Talanta.* 2007;72:808-812.
  - 15) Farouk F, Azzazy HM, Niessen WM. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. *Anal Chim Acta.* 2015;890:21-43.
  - 16) Gremilogianni AM, Megoulas NC, Koupparis MA. Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk based on mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2010;1217:6646-6651.
  - 17) Dejaegher B, Vander Heyden Y. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci.* 2010;33:698-715.
  - 18) Nemoto T, Lee XP, Kumazawa T, *et al.* High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;88:71-80.
  - 19) Oertel R, Neumeister V, Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J Chromatogr A.* 2004;1058:197-201.
  - 20) Oertel R, Renner U, Kirch W. Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35:633-638.
  - 21) Zhou Z, Wu X, Wei Q, *et al.* Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of five first-line antituberculosis drugs in plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:6323-6335.
  - 22) King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, *et al.* Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2000;11:942-950.
  - 23) Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75:3019-3030.
  - 24) Meiji Seika ファルマ株式会社. アミノグリコシド系抗生物質製剤 処方せん医薬品 日本薬局方 注射用ストレプトマイシン硫酸塩 硫酸ストレプトマイシン注射用 1g 「明治」. 2014年2月改訂第5版。(2016年1月4日アクセス) [http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780009\\_6161400D1034\\_1\\_06](http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780009_6161400D1034_1_06)
  - 25) Meiji Seika ファルマ株式会社. アミノグリコシド系抗生物質製剤 処方せん医薬品 ビスタマイシン筋注 500 mg ビスタマイシン筋注 1000 mg リボスタマイシン硫酸塩注射液. 2011年4月改訂第4版。(2016年1月4日アクセス) [http://www.info.pmda.go.jp/download/ph/PDF/780009\\_6134401A1035\\_1\\_04.pdf](http://www.info.pmda.go.jp/download/ph/PDF/780009_6134401A1035_1_04.pdf)
  - 26) Meiji Seika ファルマ株式会社. アミノグリコシド系抗生物質製剤 処方せん医薬品 硫酸カナマイシン注射液 1000 mg 「明治」. 2011年4月改訂第3版。(2016年1月4日アクセス) [http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780009\\_6169400A1036\\_1\\_03](http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780009_6169400A1036_1_03)
  - 27) Fischbach FT, Dunning MB III. A manual of laboratory and diagnostic tests. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
  - 28) 山作房之輔, 鈴木康稔, 小宮 泉, ほか. 健康成人志願者ならびに腎機能障害者における Dibekacin 静脈内持続注入時の薬動力学的研究. 日治療会誌. 1981;29:1393-1400.
  - 29) Okada K, Kimura T, Mikamo H, *et al.* Clinical practice guidelines for therapeutic drug monitoring of arbekacin: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *J Infect Chemother.* 2014;20:1-5.
  - 30) 岩井章洋, 上野裕和, 松川智洋, ほか. ストレプトマイシンの血中濃度測定とファーマコキネティクス 有効治療と副作用軽減のために. 病院薬学. 1986;12:393-400.

# HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY COMBINED WITH TANDEM-MASS SPECTROMETRY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF SIX AMINOGLYCOSIDE ANTIMICROBIALS IN HUMAN PLASMA

Shinya OMIYA<sup>1,2)</sup>, Takeshi KUMAZAWA<sup>1)</sup>, Xiao-Pen LEE<sup>1)</sup>,  
Yukiko SHOJI<sup>1)</sup>, Junichi SATO<sup>1)</sup>, Toshiko SAWAGUCHI<sup>1,3)</sup>,  
Ashio YOSHIMURA<sup>2)</sup> and Keizo SATO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine

<sup>2)</sup> Department of Medicine, Division of Nephrology, Showa University Fujigaoka Hospital

<sup>3)</sup> National Institute of Public Health

**Abstract** — A simple and rapid method was developed for the analysis of six aminoglycoside antimicrobials (streptomycin, ribostamycin, kanamycin, amikacin, dibekacin, arbekacin) in human plasma samples using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-tandem mass spectrometry (MS-MS). A small volume of plasma (50  $\mu$ l) spiked with the 10  $\mu$ l of standard solution containing the test drugs and 10  $\mu$ l of internal standard solution was diluted with 430  $\mu$ l of purified water/0.1% formic acid in acetonitrile (1:3, v/v). After centrifugation of the mixture, the supernatant extract was directly injected into the HILIC-MS-MS, without any solvent evaporation or reconstitution steps. The analytes were separated on an Inertsil Amide metal-free PEEK column (50  $\times$  2.1 mm i.d., particle size 3  $\mu$ m) using a gradient with 0.1% formic acid in purified water and 0.1% formic acid in acetonitrile at a flow of 0.6 ml/min. All drugs showed base peaks due to  $[M+H]^+$  ions by HILIC-MS with positive ion electrospray ionization, and the product ions were produced from each  $[M+H]^+$  ion by HILIC-MS-MS. Quantitation was performed by selective reaction monitoring using each base peak of product ions of HILIC-MS-MS. Good peak shapes of the six drugs were achieved within an analysis time of 1.4 min. All drugs spiked into the plasma showed recoveries of 23–77% and extraction efficiencies of 72–105%. The regression equations for the antimicrobials showed excellent linearity with the limits of quantitation of 3.9–16  $\mu$ g/ml. The intra- and inter-day relative standard deviations for all drugs were not greater than 19%. The accuracies of quantitation were 80–114%. Streptomycin and kanamycin in human plasma after intramuscular administration of the drugs could actually be determined. This method appears to be useful for determining aminoglycoside antimicrobials in human plasma in clinical and forensic investigations.

**Key words:** aminoglycoside antimicrobials, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), tandem mass spectrometry, plasma

[受付：1月14日，受理：1月20日，2016]