

イヌ血漿中デクスメドミジンとニカルジピンの同時測定における条件検討

○横野 瑞希^{a)}、村端 悠介^{b)}、徳永 風花^{b)}

^{a)}鳥取大学 技術部、^{b)}鳥取大学 農学部 共同獣医学科

1. はじめに

鳥取大学技術部では全学共同利用設備の維持管理および依頼分析を行っており、筆者は質量分析装置を主に担当している。この度、分析相談を受けイヌ血漿中のデクスメドミジンとニカルジピンの同時測定を行うための測定条件の検討を行ったため、その内容について報告する。

2. 背景と目的

デクスメドミジン (図 1) は鎮静薬の一つであり、鎮静作用、鎮痛作用、筋弛緩作用を持つ。近年、伴侶動物臨床において、周術期に定量持続静脈内点滴により利用され、麻酔薬節約効果をもたらしている^{1),2)}。しかし、デクスメドミジンはイソフルラン麻酔下のイヌで実証されたように心係数の低下を特徴とする心血管系の抑制を引き起こす³⁾。ニカルジピン (図 2) はカルシウム拮抗薬であり、ヒト患者の術中高血圧の治療に広く利用されている。近年、血管拡張薬であるニカルジピンをデクスメドミジンに併用することで、デクスメドミジンの循環抑制作用を軽減することが明らかになった⁴⁾。この投与法の検証にあたり、これらの薬剤の併用投与時の薬物動態学的パラメータが必要となるため、両薬剤の血中濃度の測定方法の確立を目的とし、分析条件の検討を行った。

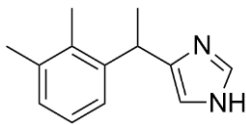


図 1 デクスメドミジン構造式

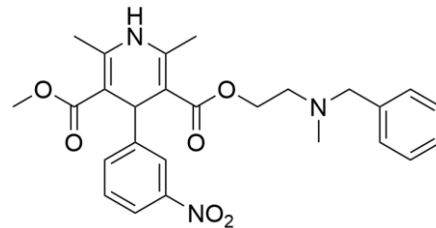


図 2 ニカルジピン構造式

3. 方法

3.1. 検量線試料の前処理

山根らによる報告⁵⁾を参考に、ビーグル犬より全血を採取、ヘパリン処理を行い血漿を回収した。回収した血漿 1 mL 中の濃度が任意の濃度 (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL) になるようアセトニトリルに溶解したデクスメドミジン、ニカルジピンを加えた。更に 20 μ L 内部標準物質 (100 ng/mL ニフェジピンアセトニトリル溶液)、1 mL アセトニトリルを加え、30 秒混合した。1800 \times g、5 分間遠心分離し上清を回収し、1 mL 程度になるまで 40 $^{\circ}$ C で窒素乾固を行った。10 μ L の 10%アンモニア水、4 mL の 2-メトキシ-2-メチルプロパンを加

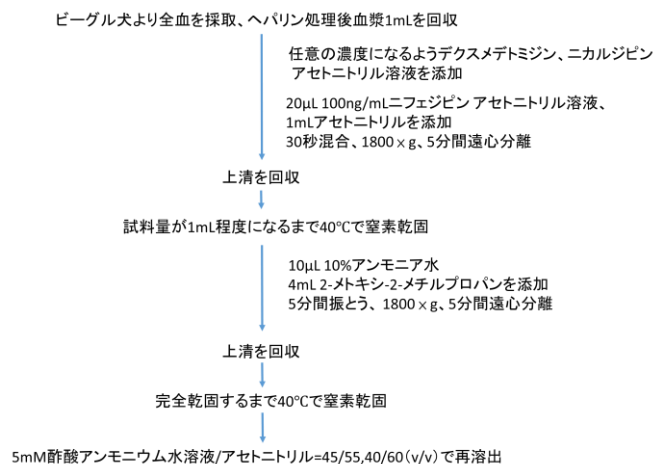


図 3 前処理フロー (検量線用試料)

え 5 分間振とうさせた。1800 ×g、5 分間遠心分離し再び上清を回収し、40 °Cで窒素乾固を行い、100 μL の移動相で再溶解させた。(図 3)

3.2. 前処理後添加試料の前処理

回収した血漿に 20 μL 内部標準物質(100 ng/mL ニフェジピンアセトニトリル溶液)、1 mL アセトニトリルを加え、30 秒混合した。1800 ×g、5 分間遠心分離し上清を回収し、1 mL 程度になるまで 40 °Cで窒素乾固を行った。10 μL の 10%アンモニア水、4 mL の 2-メトキシ-2-メチルプロパンを加え 5 分間振とうさせた。1800 ×g、5 分間遠心分離し再び上清を回収し、40 °Cで窒素乾固を行い、移動相で再溶解する際に血漿中濃度換算で 1, 10 ng/mL になるよう、アセトニトリルに溶解したデクスメデトミジン、ニカルジピンを加え全量が 100 μL となるよう調整した。(図 4)

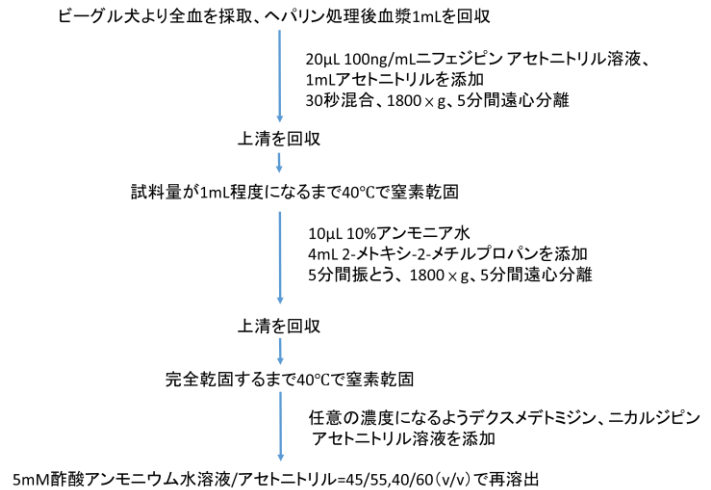


図 4 前処理フロー（前処理後添加試料）

3.3. LC-MS 分析

Waters 製 Xevo TQ-S Micro (図 5) を使用し、カラムは Waters 製 AQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm, 2.1 mm×100 mm) を用いた。カラム温度は 40 °C、注入量は 5 μL に設定し、移動相は流速 0.2 mL/min、A/B=5 mM 酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリルで、アセトニトリル濃度は 55%、60%(v/v) でそれぞれ測定した。グラジエント条件を表 1、2、図 6、7 に示す。



図 5 Xevo TQ-S Micro

表 1 LC-MS グラジエント条件 (55%)

時間 (分)	A 組成 (%)	B 組成 (%)
0	45	55
8	45	55
9	0	100
14	0	100
14.01	45	55
25	45	55

表 2 LC-MS グラジエント条件 (60%)

時間 (分)	A 組成 (%)	B 組成 (%)
0	40	60
5	40	60
7	0	100
8	0	100
8.01	40	60
18	40	60

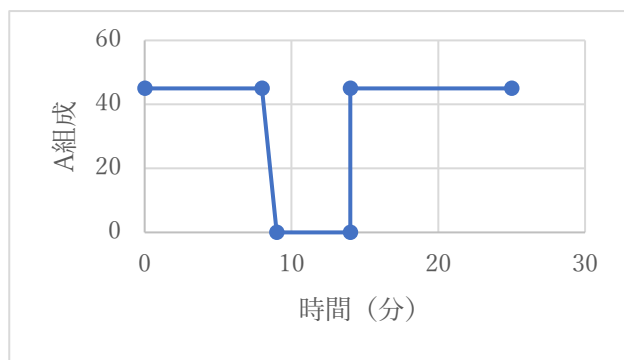


図 6 LC-MS グラジエント条件 (55%)

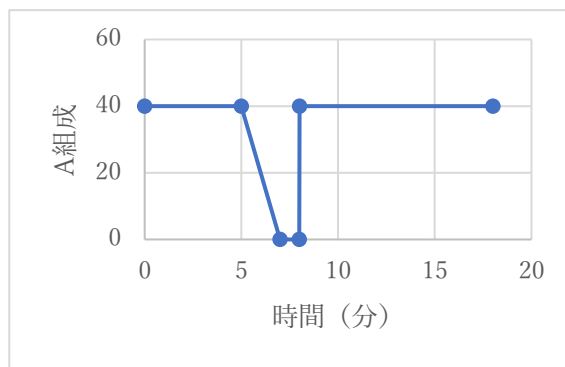


図 7 LC-MS グラジエント条件 (60%)

4. 結果

それぞれの測定条件下における各薬剤の保持時間、定量範囲を表 3 に、検量線用試料と前処理後添加試料のピーク面積値（内標補正值）を表 4 に示す。移動相の初期アセトニトリル濃度が 55% の場合のデクスメデトミジンの定量範囲は 0.05-100 ng/mL で、ニカルジピンは 0.005-10 ng/mL であり、移動相の初期アセトニトリル濃度が 60% の場合のデクスメデトミジンの定量範囲は 0.1-100 ng/mL で、ニカルジピンは 0.005-10 ng/mL であり、移動相の初期アセトニトリル濃度が 55% の方がデクスメデトミジンの定量範囲が広がった。前処理によるピーク面積についても検量線用試料・前処理後添加試料間で誤差 1.7-30% とあまり差がなかった。デクスメデトミジンのピーク面積の値が検量線用試料に比べ前処理後添加試料の方が小さかったのは薬剤濃度が高いほど影響が少ないことから、デクスメデトミジン存在下での血漿中の前処理における夾雑物の挙動の差によるイオン化抑制の発生もしくはデクスメデトミジン存在下での血漿中の前処理におけるニフェジピンの挙動の差によるためと考えられる。

表 3 各薬剤の測定条件ごとの保持時間、定量範囲

	(アセトニトリル 55%)		(アセトニトリル 60%)	
	保持時間 (分)	定量範囲 (ng/mL)	保持時間 (分)	定量範囲 (ng/mL)
デクスメデトミジン	2.14	0.05-100	1.95	0.1-100
ニフェジピン	2.55	-	2.15	-
ニカルジピン	7.49	0.005-10	5.16	0.005-10

表 4 検量線用試料と前処理ロス確認用試料のピーク面積値（内標補正值）

	検量線試料のピーク面積 (/ニフェジピン)		前処理ロス確認試料のピーク面積 (/ニフェジピン)	
	1 ng/mL	10 g/mL	1 ng/mL	10 g/mL
デクスメデトミジン	4.7094	44.143	4.0322	43.393
ニカルジピン	1.0011	12.580	1.4266	14.692

5. まとめ

デクスメデトミジン、ニカルジピンの血中濃度の測定方法の確立を目的とし、分析条件の検討を行っ

た。移動相の初期アセトニトリル濃度が 55%の場合のデクスメデトミジンの定量範囲は 0.05-100 ng/mL で、ニカルジピンは 0.005-10 ng/mL であり、移動相の初期アセトニトリル濃度が 60%の場合と比較しデクスメデトミジンの定量範囲が広がった。前処理によるピーク面積についても検量線用試料・前処理後添加試料間で誤差 1.7-30%とあまり差がなかったため、前処理での喪失は測定上の影響がない範囲であると考えられる。

これらの測定条件の検討をもって技術部としての支援は終了とし、今後は検討した条件を使用してユーザーが実試料の測定を継続していく予定である。

6. 参考文献

- 1) R. A. Hammond, G. C. W. England, *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, Vol.21, 1, pp24-pp28, 1994
- 2) Joanna C Murrell, Ludo J Hellebrekers, *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, Vol. 32, 3, pp117-pp127, 2005
- 3) Peter J Pascoe, *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, Vol. 42, 4, pp360-pp368, 2015
- 4) Natsuki Akashi, Yusuke Murahata, Sayaka Tsuno, Aomi Kanazawa, Yoshiaki Hikasa, Tomohiro Imagawa, *Research in Veterinary Science*, Vol.172, 105254, 2024
- 5) Naoe YAMANE, Tomonori TAKAMI, Zenzaburo TOZUKA, Yuichi SUGIYAMA, Akira YAMAZAKI and Yuji KUMAGA, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24, 4, pp389-pp403, 2009