報 文

局所麻酔薬ジブカインカチオンセンサーを用いる脂質二分子膜へのジブカインの分配測定

西本 真琴¹, 松岡 和彦¹, 長山 和史¹, 秦 隆 志^{®1},
松 木 均³, 佐 竹 弘², 金品 昌志³

Partition coefficients of the local anesthetic dibucaine into a lipid bilayer membrane determined with a dibucaine cation sensor

Makoto NISHIMOTO¹, Kazuhiko MATSUOKA¹, Kazuhito NAGAYAMA¹, Takashi HATA¹,
Hitoshi MATSUKI³, Hiromu SATAKE² and Shoji KANESHINA³

¹ Department of Materials Science and Engineering, Kochi National College of Technology, 200-1, Monobe, Nangoku-shi, Kochi, 783-8508

² Center for Cooperative Research, The University of Tokushima, 2-1, Minamijosanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

³ Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, 2-1, Minamijosanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

(Received 8 May 2003, Accepted 17 July 2003)

Local anesthetics are known to be typical drugs which act directly on biomembranes. However, the molecular mechanism of anesthetic action is still uncertain. In order to clarify the action mechanism, the partition coefficient of anesthetics to lipid membranes is necessarily important. Most local anesthetics in clinical use are tertiary amine compounds that exist in neutral and/or positively charged species, depending on the pH of the solution. In this study, we prepared coated wire electrodes sensitive to the local anesthetic dibucaine cation, and determined the partition coefficient of anesthetics into a lipid membrane. Moreover, we focused our attention on the pH-dependence of the partition coefficient in order to elucidate the contribution of charged- and uncharged-dibucaine to the lecithin membrane/buffer partition coefficients. The lecithin membrane/buffer partition coefficient was directly determined by the dibucaine cation sensor as a function of the anesthetic concentration and the pH. The limiting partition coefficient extrapolated to infinite dilution was employed because the values of partition coefficients were dependent upon the dibucaine concentration. The limiting partition coefficient increased with an increase in the pH. This means that uncharged species increased with an increase in the pH because pK_a of dibucaine is 8.72 at 25°C. The partition coefficients of charged and uncharged dibucaine into the lecithin membranes were estimated from the pH-dependence of the limiting partition coefficients. The partition coefficients were 1.6×10^4 and 8.6×10^6 for charged and uncharged dibucaine, respectively. The electrodes were applied satisfactorily for determining for the partition coefficient of local anesthetic dibucaine into biomembranes.

Keywords : potentiometry; coated wire electrode; local anesthetic; lipid bilayer membrane; partition coefficient.

¹ 高知工業高等専門学校物質工学科: 783-8508 高知県南国市物部 200-1

² 徳島大学地域共同研究センター: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

³ 徳島大学工学部生物工学科: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

1 緒 言

局所麻酔薬分子は神経細胞膜に作用することから、膜への結合は麻酔作用を発現させる重要な要因として考えられ

Fig. 1 Structure of dibucaine

ているが、その作用機構は麻酔薬と膜タンパク質との相互作用なのか、あるいは周囲のリン脂質との非特異的な相互作用に基づくかはまだ論争が続いている。このうちの後者、つまり、麻酔薬を膜標的性薬物とする説では、リン脂質二分子膜などの生体モデル膜を用いることにより、麻酔薬分子と膜構成分子間の相互作用の研究がなされている。生体モデル膜への麻酔薬の結合量の測定には、限界透過法¹⁾や透析平衡法²⁾が用いられてきた。また、局所麻酔薬の定量には電位差測定^{3)~6)}や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{7)~9)}などの方法があるが、イオン選択性電極を用いる電位差測定は、簡易な装置で局所麻酔薬カチオン分子のみの濃度測定が可能である⁵⁾⁶⁾。本研究では、このイオン選択性電極を用いて生体モデル膜である脂質二分子膜への局所麻酔薬ジブカインの分配係数測定について検討を行った。

臨床で用いられる局所麻酔薬の多くは第三級アミンの塩酸塩であり、生体の pH 環境では解離型の陽イオン及び非解離型の中性分子の両方が存在し、異なる生理活性を示す。脂質膜へのジブカインの分配係数の pH 依存性を解析することにより、解離型及び非解離型ジブカインの分配係数をそれぞれ分離分割することを試みた。

2 実験

2.1 試薬

局所麻酔薬ジブカイン (DC) 塩酸塩 (シグマ製) の構造式を Fig. 1 に示した。生体モデル膜は、卵黄レシチン (東京化成製) を用いて種々の pH に調整したリン酸緩衝液に溶解させた後、超音波処理を施し調製した。卵黄レシチンの正確な分子量は存在しないが、脂肪酸組成の文献値¹⁰⁾から見積もり、濃度は 5 mmol dm^{-3} とした。

2.2 電極の作製

イオン選択性電極の作製は既報に準じた⁵⁾⁶⁾。テフロン管に銅線を通しエポキシ樹脂で固定し、更に銅線の片方の先端にエポキシ樹脂の球をつけ、固定した部分から球にかけて感応膜を膜厚が $0.3 \sim 0.6 \text{ mm}$ となるように被膜した。

Fig. 2 Response curves of the dibucaine electrode at pH 5.5

(A) Calibration curve in the phosphate buffer; (B) response curve in the presence of lecithin membrane

感応膜は、ポリ塩化ビニル (和光純薬製) 110 mg をマトリックスとして、DC 塩酸塩 (シグマ製) とリンタングステン酸 (関東化学製) の混合溶液による沈殿物を単離精製したジブカイン-リンタングステン酸イオン対 2 mg 、可塑剤としてニトロフェニルフェニルエーテル (ランカスター製) 150 mg をテトラヒドロフラン (関東化学製) 1.5 ml に溶解し作製した。

2.3 電極電位の測定

測定セル構造を DC カチオン電極/試料溶液/緩衝溶液-電解隔膜/飽和塩化カリウム/銀-塩化銀電極とし、 25°C 温度一定下、pH $5.5 \sim 6.5$ の範囲において、リン酸緩衝液及びレシチン溶液 3 ml 中に DC 塩酸塩標準溶液を最終濃度が $1.00 \times 10^{-2} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ となるように添加し、添加ごとの電極電位から応答曲線を作成した。

3 結果及び考察

3.1 DC のレシチンベシクル膜への分配計測

緩衝溶液中に最終濃度が $1.00 \times 10^{-5} \sim 1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$ となるようにレシチンベシクル溶液を滴下し電極電位を測定したところ、電位に変化は確認されず一定の値を示したことから、作製した選択性電極は溶液中の DC 分子にのみ応答することが確認された。

Fig. 2 に pH 5.5 の環境下での緩衝溶液及びベシクル溶液中における電極電位-応答曲線を示した。図に示される

Fig. 3 A relationship between anesthetic mole fractions in lecithin membrane (X_A^m) and anesthetic mole fractions in buffer solution (X_A^w) at pH 5.5

The slope of a broken line refers to the limiting partition coefficient.

ように、ベシクル膜存在下での応答曲線が検量線（緩衝溶液）よりも高濃度側にシフトしているのは、DCの一部がベシクル膜に結合し、遊離のDCカチオン濃度が低下したためであると考えられる。DCの全濃度 C_t における電極電位と等しい電位を示す検量線上の濃度 C_f は、ベシクル膜と結合平衡にある遊離のDC濃度と見なすことができる。したがって、 C_t から C_f を引いた値はベシクル膜へ結合した麻醉薬分子の量となる。ゆえに、ベシクル膜中のDCのモル分率は

$$X_A^m = \frac{C_t - C_f}{(C_t - C_f) + C_m} \quad (1)$$

と表せる。ここで、 C_m はレシチン濃度である。また、緩衝溶液中のDCのモル分率は、

$$X_A^w = \frac{C_f}{1000/M_w + C_f + C_s} \quad (2)$$

と表すことができる。ここで、 M_w は水の分子量、 C_s は緩衝液濃度である。DCのベシクル膜/緩衝溶液分配係数 K は、両式の比として

$$K = \frac{X_A^m}{X_A^w} \quad (3)$$

となる。

Fig. 4 Effect of pH on the limiting partition coefficients of dibucaine into lecithin membrane

Fig. 2 から算出されたそれぞれのモル分率について、 X_A^m を X_A^w の関数として Fig. 3 に示した。図から明らかなように、傾きは一定にならず濃度依存性を示した。つまり、DCの濃度が高くなるにつれ、分配係数は減少する傾向が確認された。この傾向は、DCが結合することによりベシクル膜の表面が正に帯電し、静電的な反発力がしだいに強くなるためであると考えられる。しかしながら、DCの低濃度領域では X_A^m vs. X_A^w プロットは直線となり、この傾きがDCの無限希釈における分配係数として決定することができる。

pH 5.5～6.5 の範囲で、種々の pH においても分配係数を決定した。DCカチオン電極の電極電位は、pH 2.5～7.4 の範囲において変動しないことが確認されている⁵⁾。そのため、ベシクル膜存在下での pH 変動に伴う電位の変動は、DCの膜への結合が変化したことに帰せられる。ベシクル膜へのDCの分配係数に及ぼす pH の影響を Fig. 4 に示した。分配係数の値は、pH が上昇するに伴って増加した。これは 25℃ における DC の pK_a が 8.72¹¹⁾ であることから、溶液中の非解離型分子種が増すとその分配係数が大きいため、全体の分配係数も pH 上昇に伴って増加するものと考えられる。つまり分配係数の増加には、非解離型分子種が大きく影響していることが推察された。

3・2 解離型・非解離型の分割

第三級アミンの塩酸塩の局所麻醉薬は、pH に依存して溶液中では解離型及び非解離型の形で存在する。pH が低

Fig. 5 Schematic diagram of ionization equilibrium and partition equilibrium of local anesthetic

い場合、分配係数への非解離型の寄与は無視できるが、pHが高くなると非解離型の分配係数を考慮する必要がある。局所麻酔薬の緩衝溶液中での解離平衡と、膜への解離型 (AH^+) 及び非解離型 (A) 分子種の分配平衡を Fig. 5 のように考え、解離型及び非解離型分子の分配係数をそれぞれ K_+ 及び K_0 として次式で定義する。

$$K_+ = \frac{X_+^m}{X_+^w} \quad (4)$$

$$K_0 = \frac{X_0^m}{X_0^w} \quad (5)$$

ここで、下付きの+と0はそれぞれ解離型及び非解離型を表す。

また、ベシクル膜中及び緩衝溶液中でDCは解離型及び非解離型の両方で存在するため、DCのモル分率はそれぞれ、

$$X_A^w = X_+^w + X_0^w \quad (6)$$

$$X_A^m = X_+^m + X_0^m \quad (7)$$

と表せる。したがって、分配係数は、

$$K = \frac{X_+^m + X_0^m}{X_+^w + X_0^w} \quad (8)$$

となる。

また、次式のヘンダーソン・ハッセルバルヒの式から

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[\text{AH}^+]}{[\text{A}]} \quad (9)$$

解離型/非解離型の割合を β とおくと、

Fig. 6 A relationship between β and $K(1 + \beta)$

$$\beta = \frac{[\text{AH}^+]}{[\text{A}]} = \frac{X_+^w}{X_0^w} = 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})} \quad (10)$$

と表せる。ここで、 $[\text{AH}^+]$ 及び $[\text{A}]$ はそれぞれ解離型及び非解離型麻酔薬のモル濃度である。

ゆえに、式(8)は式(10)により次式のように表すことができる。

$$K = \frac{X_+^m + X_0^m}{X_+^w + X_0^w} = \frac{K_0 + K_+ \cdot \beta}{1 + \beta} \quad (11)$$

$$K(1 + \beta) = K_+ \cdot \beta + K_0 \quad (12)$$

$K(1 + \beta)$ を β の関数として表すことにより、解離型及び非解離型それぞれの分配係数を分割算出することができる。

Fig. 6 に $K(1 + \beta)$ を β に対してプロットしたものを示す。各点により相関関係が見られた。各点を通る直線は、式(12)から傾きが解離型の分配係数を、切片が非解離型の分配係数を示す。本実験によりそれぞれの分配係数は、Table 1 に示すように解離型DCは 1.6×10^4 、非解離型DCは 8.0×10^6 と分割算出された。非解離型DCは解離型に比べ約 5.0×10^2 倍の分配量を示した。

更に分割されたそれぞれの分配係数を式(9)に代入することにより、ベシクル膜中でのDCの $\text{p}K_a$ が算出される。溶液中での $\text{p}K_a$ とともに Table 2 に示す。溶液中に比べ膜中での $\text{p}K_a$ は下がることが示された。

本電極は生体膜への麻酔薬の分配係数測定に有用であり、更に分配係数のpH依存性から解離型及び非解離型麻

Table 1 Partition coefficients of the charged and uncharged dibucaine between 0.1 M phosphate buffer solution and lecithin membrane at 25.0°C

Partition coefficients		K_0/K_+
K_+	K_0	
1.6×10^4	8.0×10^6	5.0×10^2

Table 2 Ionization constant pK_a of dibucaine in water and lecithin membrane

pK_a	
in membrane	in water
6.02	8.72

酔薬それぞれの分配係数の分割算出が可能である。

本研究は財団法人日本科学協会の笹川科学研究助成を得て行われたことを付記します。

(本研究の一部は 2002 年 11 月, 日本化学会西日本大会において一部発表)

文 献

- 1) N. Janes, J. W. Hsu, E. Rubin, T. F. Taraschi: *Biochemistry*, **31**, 9467 (1992).
- 2) K. Fukushima, M. Someya, R. Shimozaawa: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 1613 (1993).
- 3) M. S. Ionescu, S. Sitarn, G. E. Baiulescu, V. V. Consofret: *Rev. Chem.*, **38**, 256 (1987).
- 4) A. F. Shoukry, Y. M. Issa, R. El-Shiekh, M. Zareh: *Anal. Lett.*, **24**, 1581 (1991).
- 5) H. Satake, T. Miyata, S. Kaneshina: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 3029 (1991).
- 6) 佐竹 弘, 若槻美保, 金品昌志, 横野敦子, 横野論, 小栗顕二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, 573 (1992).
- 7) E. J. D. Lee, S. B. Ang, T. L. Lee: *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **64**, 302 (1991).
- 8) M. R. Eftink, R. K. Puri, M. D. Ghahramani: *Biochim. Biophys. Acta*, **813**, 137 (1985).
- 9) H. A. Adams, J. Biscopig, K. Ludoif, A. Boergmann, M. B. Bachamann, G. Hempelmann: *Reg-Anesth.*, **12**, 53 (1989).
- 10) R. Blomstrand: *Acta Ohysiol. Scand.*, **34**, 147 (1955).
- 11) H. Kamaya, J. J. Jr. Hayes, I. Ueda: *Anesth. Analg.*, **62**, 1025 (1983).

要 旨

局所麻酔薬ジブカインカチオンに選択的に応答する被覆線型イオン選択性電極を用いて, pH 5.5~6.5 の範囲におけるレシチンベシクル膜へのジブカインの分配係数を測定した。各 pH での分配係数は濃度依存性を示したが, ジブカインの低濃度領域では一定値を示すことから, 麻酔薬の無限希釈における分配係数を決定した。分配係数は pH が上昇するに伴い増大する傾向を示した。これは, ジブカインの 25°C における pK_a が 8.72 であることから, 溶液中の非解離型分子種が増すとその分配係数が大きいため, 分配係数は pH の上昇に伴って増大すると考えられる。分配係数の pH 依存性の解析から麻酔薬の解離型・非解離型それぞれの分配係数への分割を行った。分配係数はそれぞれ, 解離型では 1.6×10^4 , 非解離型では 8.0×10^6 の値を示した。本研究の局所麻酔薬電極は, 生体膜への麻酔薬分配計測に有用であると考えられる。