局所麻酔剤の微量分析法(Ⅲ)*¹脳脊髄液中の局所麻酔剤の分析法について*²

武田 寧, 丹沢珪子, 星野乙松, 浮田忠之進
(東京大学薬学部衛生化学, 裁判化学教室*³)

Microanalysis of Local Anesthetics (Ⅲ)*¹On the Analysis of Local Anesthetics in Cerebro-spinal Fluid*²

Yasushi Takeda, Keiko Tanzawa, Otomatsu Hoshino
Tyunosin Ukita

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo*³)

The conversion of local anesthetics in human cerebro-spinal fluid was investigated in vitro and an improved method for analysis of the local anesthetics in cerebro-spinal fluid was proposed.

When hexylcaine, procaine and tetracaine were incubated with cerebro-spinal fluid, ester bonds of the compounds were hydrolysed mainly due to the increase of pH of cerebro-spinal fluid on standing, while amide bonds of dibucaine, lidocaine and carbocaine were unchanged.

In the analysis of local anesthetics in cerebro-spinal fluid, it is desirable to estimate the ultra-violet spectrum of the sample and to determine the aromatic carboxylic acid liberated, as well as the determination of the unchanged anesthetics.

(Received December 11, 1965)

局所麻酔剤の使用による事故の場合には、局所麻酔剤の注射部位、血液、脳脊髄液、尿などの生存試料中の微量分析が必要である。

著者らはこれまでに局所麻酔剤の微量分析法としてガスクロマトグラフィーによる分離¹⁾、薄層クロマトグラフィー、前処理ろ紙によるペーパークロマトグラフィーによる定性分析法*¹を報告した。

脳脊髄液は脊髄麻酔による事故の場合に重要な分析試料であり、脳脊髄液中での局所麻酔剤の変化については、Foldes *et al*²⁾によってプロカイン、2-クロルプロカインの脳脊髄液中での分解は、エステル結合の化学的なアルカリ性加水分解と、酵素的加水分解の両者によることが報告されている。今回脳脊髄液中における局所麻酔剤の変化について検討を加えたところ、脳脊髄液中の局所麻酔剤の分析法に関して有用な知見が得られたので報告する。

実験材料および実験方法

1. 試 料

ヒト脳脊髄液：東京大学附属病院脳神経外科より分与された、なるべく新鮮なものを使用した。

2. 試 薬

市販品を用いた。使用した局所麻酔剤の化学構造、略号は TABLE I に示した。*p*-*n*-Butyl-amino benzoic acid は *p*-アミノ安息香酸エチルから合成した³⁾。

3. 分 析 法

1) 局所麻酔剤の分解量の測定：Kalow の方法⁴⁾により、各局所麻酔剤の吸収極大波長での吸光度の変化から算出した。測定は反応液を 0.2*M* リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、局所麻酔剤のかわりに蒸留水を加え、同様に操作したものを対照として用いて行なった。測定液の pH は 7.0±0.1 であった。

2) ペーパークロマトグラフィー (PC)：東洋ろ紙 No. 51 を用い、上昇法で行なった。用いた溶媒系および R_f 値は TABLE II に示した。

3) 薄層クロマトグラフィー (TLC)：5%ギブスを含むシリカゲル薄層 (Silica Lader, 第一化学) を用

*¹ 前報(Ⅱ)：丹沢珪子, 星野乙松, 浮田忠之進：本誌, 投稿中。

*² 第20回薬学大会(福岡)にて発表(1965)。

*³ 東京都文京区本郷7-3-1; Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo.

TABLE I Local Anesthetics Tested

Hexylcaine (Hex)

Procaine (Pro)

Tetracaine (Tet)

Dibucaine (Dib)

Lidocaine (Lid)

Carbocaine (Car)

い、常法によって行なった。用いた溶媒系および Rf 値は TABLE II に示した。

4) ろ紙電気泳動 (PE): 東洋ろ紙 No. 51 を用いて常法にしたがって行なった。緩衝液、移動度は TABLE II に示した。移動度は 500V/25cm で 30 分間泳動したときの泳動距離を cm で示し、陽極側へ泳動した場合は +, 陰極側へ泳動した場合は - をつけて示した。

5) スポットの検出: 紫外線ランプ, ドラージェンドルフ試薬, エールリッヒ試薬によって行なった。

実験結果

1. 脳脊髄液中での局所麻酔剤の変化

TABLE I に示した 6 種の局所麻酔剤の塩酸塩を 1.5~3 ml の脳脊髄液に 30~400 μ g/ml の濃度に加え, 防腐剤として CHCl_3 少量を加えて 37° 48 時間孵置後, アルカリ性クロロホルム抽出物を TLC, PE によって検索した。分子内にアミド結合をもつ Dib, Lid, Car は, それぞれを未変化で回収した。一方分子内にエステル結合をもつ Hex, Pro, Tet では, そのアルカリ性クロロホルム抽出物はドラージェンドルフ試薬に陰性であった。

脳脊髄液 1 ml に Pro·HCl 10mg を加え, 37° 48 時間孵置したものを直接 PC, PE で検索したところ, 未

TABLE II Chromatographic and Electrophoretic Data

a) Paper chromatography

	Rf Value			
	Solv. 1	Solv. 2	Solv. 3	Solv. 4
Procaine	0.41	0.30	0.55	-
Diethylamino ethanol	0.27	0.20	0.64	-
p-Aminobenzoic acid	0.85	0.80	0.88	0.33

Solvent 1: n-BuOH-1M HCOOH (84:16)

Solvent 2: n-BuOH-1M Formate buffer (pH 4.0) (84:16)

Solvent 3: i-PrOH-1N HCl (7:3)

Solvent 4: i-PrOH-conc. NH_4OH - H_2O (7:1:2)

b) Thin layer chromatography

	Rf Value	
	Solvent 5	Solvent 6
Lidocaine	0.59	0.55
Carbocaine	0.54	0.46
Dibucaine	0.45	0.49

Solvent 5: CHCl_3 -EtOH (9:1)

Solvent 6: CHCl_3 -Acetone-Diethylamine (5:4:1)

c) Paper electrophoresis

	Mobility	
	0.05M Formate buffer (pH 4.0)	0.05M Phosphate buffer (pH 7.0)
Lidocaine	-	-2.7
Carbocaine	-	-2.6
Dibucaine	-	-1.8
Procaine	-2.8	-2.6
Diethylaminoethanol	-3.4	-3.7
p-Aminobenzoic acid	+1.3	+3.4

変化の Pro とともに p-アミノ安息香酸 (PABA), ジエチルアミノエタノールを検出した。Pro および PABA のスポットの抽出液の紫外吸収スペクトルは標準品と一致した (Fig. 5 参照)。

2. 脳脊髄液中でのプロカインの加水分解に対する加熱処理, 緩衝化の影響

脳脊髄液またはそれを 100°, 15 分間加熱処理したものに, 同容の 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.0) または生理食塩水を加え, それに Pro·HCl を $5 \times 10^{-4}M$ になるように加え, 37°, 24 時間孵置後, 加水分解率を測定し

(37°, 24hr.)

	Buffer (pH 7.0)	Heat Treatment 100°, 15min.	Hydrolysis (%)
			50 100
CSF	—	—	████████████████████
	—	+	████████████████████
	+	—	██████████
	+	+	██████████
Blood Plasma	+	—	████████████████████
	+	+	██████████

Fig. 1 Effects of pH and Heat Treatment of Cerebro-spinal Fluid (CSF) and Blood Plasma on Hydrolysis of Procaine

Fig. 2 pH Change of Cerebro-spinal Fluid as a Function of Time. Each of the Four Lines Indicates pH Change of Different Sample.

た。比較のためにエステラーゼの存在が認められているヒト血漿⁴⁾による Pro の加水分解に対する加熱処理の影響を調べた。血漿を生理食塩水で5倍に希釈したものおよびそれを100°, 15分間加熱処理した後に遠心分離した上清を用い、脳脊髄液と同様に操作した。結果は Fig. 1 に示した。

3. 脳脊髄液の pH の経時的変化

なるべく新鮮な脳脊髄液（採取後2時間以内）を25°に孵置し、ガラス電極 pH 計を用いて、経時的にその pH を測定した。結果は Fig. 2 に示した。

4. エステル型局所麻酔剤の安定性

Hex, Pro, Tet の各塩酸塩を0.1M 緩衝液 (pH 7.0 および 7.5 はリン酸緩衝液, pH 8.0~9.0 は Tris-HCl 緩衝液) に $5 \times 10^{-4}M$ の濃度に加え、CHCl₃ 少量を加えて25°, 24時間孵置後、それぞれの加水分解率を測定

Fig. 3 pH Stability of Hexylcaine, Procaine and Tetracaine

した。結果は Fig. 3 に示した。

5. 脳脊髄液の紫外外部吸収スペクトルの経時的変化

新鮮な脳脊髄液を25°に孵置し、経理的にその一部をとり、0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で2倍に希釈し紫外外部吸収スペクトルを測定した。Fig. 4 に示したように、新鮮な脳脊髄液にみられる265mμ 附近の吸収極大は時間とともに減ずる。

6. 脳脊髄液中の局所麻酔剤およびその分解成績体の紫外外部吸収スペクトルによる検索

Fig. 5 に示したように Hex, Pro, Tet とそれらの加水分解によって生じる芳香族カルボン酸および Dib は紫外部に特徴ある吸収を有し、一方この波長領域での脳脊髄液の吸収係数は、とくに採取後ある程度の時間を経たものでは、小さいので (Fig. 4 参照)、脳脊髄液の紫外外部吸収スペクトルを直接測定することによって脳脊髄液中の局所麻酔剤の検索が可能であろうと考え、検討した。265mμ 附近の吸収が消失した脳脊髄液に局所麻酔剤を加えた直後および37°, 21時間孵置後に、それぞれを0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で2倍に希釈し、紫外外部吸収スペクトルを測定した (Fig. 6)。37°に孵置したものでは、エステル結合の加水分解によって吸収が短波長側に移動するが、それらの吸収極大波長からそれぞれの局所麻酔剤の存在を推定することが可能であり、予試験的検索法として有用である。また濃度と吸光度の関係は直線性を示すので定量も不可能ではないが、脳脊髄液自体の吸光度にも個体差があり、正確な定量はできない。Hex は吸収極大が短波長領域にあり、脳脊髄液自体の吸収が検出を著しく妨害する。Lid, Car は分子吸光係が小さく紫外外部吸収スペクトルによっては検

Fig. 4 UV Spectra of Cerebro-spinal Fluid

Fig. 5 UV Spectra of Local Anesthetics and Aromatic Carboxylic Acids Liberated from them

A : CSF B : Pro·HCl in CSF (20μg/ml) C : Tet·HCl in CSF (20μg/ml) D : Dib·HCl in CSF (80μg/ml) (pH 7.0)

Fig. 6 UV Spectra of Local Anesthetics in Cerebro-spinal Fluid (CSF)

出できない。

7. 改良分析法による脳脊髄液中のプロカインの分析

脳脊髄液 1.5ml に Pro-HCl 150 μ g を加え室温に 46 時間放置したものを試料として、Chart 1 に示した改良分析法によって分析した。試料の一部 0.5ml を 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 10 倍に希釈したものの紫外外部吸収スペクトルを Fig. 7 に示した。残りの試料は 2N HCl で pH を約 3.5 に調製したのち、1M ギ酸緩衝液 (pH 3.5) 1 ml を加え、2 ml のエーテルで 3 回抽出し、エーテル抽出物を PC (Solvent 4) によって分析し、PABA に一致するスポット (Rf 0.33) を紫外線ランプによって検出した。このスポットの抽出液の紫外外部吸収スペクトルは PABA と一致した ($\lambda_{\max}^{\text{pH } 7.0}$ 265m μ)。またその吸光度から、PABA の回収率は加えた Pro の 30% であった。pH 3.5 でのエーテル抽出水層は 10N NaOH で pH > 10 とし、同様にエーテル抽出し PC (Solvent 2) により Pro (Rf 0.30) を検出し、紫外外部吸収スペクトルも Pro に一致した ($\lambda_{\max}^{\text{pH } 7.0}$ 290m μ)。回収率は加えた Pro の 50% であった。

8. 実 例

昭和 40 年 5 月 8 日午後 3 時頃、61 才の女子に痔の手術の目的で 2% 塩酸プロカイン 15ml を仙骨の硬膜外に注射したところ、5 分後にショックを起し、救急治療を行なったが 1 時間後に死亡したプロカインによるショック死と認められる事件で、5 月 9 日東京大学医学部法医学教室で解剖し、5 月 10 日当教室に鑑定依頼があった。検体は心臓内血液 (A) 90ml、脳脊髄液 (頸部血液混入) (B) 2.5ml、脳脊髄液 (仙骨部) (C) 0.5ml、仙骨部硬膜外出血血液 (D) 0.5ml、注射部皮下脂肪組織 (E) 12g および注射に用いた 2% 塩酸プロカイン溶

液 (F) 100ml であった。

検体 A, B, D, E, F については 7. に準じて、pH 3.5 および pH > 10 のエーテル抽出物と PC によって分析した。

pH 3.5 抽出物の PC (Solvent 1, 4) によって、検体 A, B, E, F から、PABA を検出した。検体中の PABA の濃度は、スポット抽出液の吸光度から計算すると、A 0.4 μ g/ml, B 1 μ g/ml, E 1 μ g/ml, F 50 μ g/ml であった。

アルカリ性抽出物の PC (Solvent 1 および n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5) によって、検体 E, F から Pro と同一 Rf 値を示すスポットを検出した。

検体 C は抽出操作を行わず直接ろ紙にスポットし、PC (Solvent 1, 4) を行ない PABA (36 μ g/ml) を検出したが、Pro は検出されなかった。

考 察

局所麻酔剤を脳脊髄液中 37°, 48 時間孵置すると、分子内にアミド結合を有する Lid, Car, Dib は何ら変化を受けないが、エステル結合を有する Hex, Pro, Tet はアルカリ性クロホルムに抽出されない物質に変化した。Pro を高濃度に脳脊髄液に加え、37°, 48 時間孵置したのち、反応液を直接 PC で分析すると、Pro とともにそのエステル結合の加水分解生成体である PABA およびジエチルアミノエタノールを検出した。血中では Pro などのエステル結合を有する局所麻酔剤は、血中エステラーゼによって加水分解されるが、Dib のアミド結合は変化を受けないことが知られている⁴⁾。脳脊髄液中でみられたエステル結合の加水分解が血中の場合と同様に酵素的加水分解であるのか否かを明らかにするために、加熱処理の影響をみたところ、血漿では Pro の加水分解率が加熱処理によって著しく低下するのに対して、脳脊髄液では加熱処理とは無関係に反応系を pH 7.0 に緩衝化することによって加水分解率が著しく低下した (Fig. 1)。脳脊髄液の pH を経時的に測定すると、Fig. 2 に示したように pH は時間とともにアルカリ側に傾いた。

一方室温における Hex, Pro, Tet の pH による安定性は Fig. 3 のようであった。また脳脊髄液中室温 24 時間放置によるこれらの局所麻酔剤の加水分解率は Hex 89%, Pro 24%, Tet 10% であった。これらの物質の pH 変化に対する安定性と脳脊髄液中での安定性には並行性が認められる。これらのことから、脳脊髄液中でのエステル結合の加水分解は、ほとんど大部分が脳脊髄液のアルカリ性化による化学的加水分解によると考えられる。さきに述べたように Foldes ら³⁾ は化学的加水

Fig. 7 UV Spectrum of Cerebro-spinal Fluid Containing Procaine (After 46 Hours at Room Temperature)

Chart 1 The Proposed Method for the Analysis of Local Anesthetics in Cerebro-spinal Fluid

分解と同時に酵素的加水分解をも認めているが、本実験では長時間後の加水分解率を測定しているのので、脳脊髄液のアルカリ性化が顕著となり、化学的加水分解が優先した結果となったと考えられる。

このように脳脊髄液中室温放置によってもエステル結合の加水分解は著しい。すなわち脳脊髄液中の局所麻酔剤の検索にあたって、エステル結合を有する局所麻酔剤の存在が予想される場合には、未変化の局所麻酔剤の検出のみならず、その加水分解成績体の検出をもあわせて行なうことが必要である。

新鮮な脳脊髄液は 265m μ 付近に吸収極大を有するが、この吸収極大は時間とともに消失する (Fig. 4)。Pro, Tet, Dib が含まれる場合には、その脳脊髄液の紫外外部吸収スペクトルを直接測定することによって予試験的検出が可能である (Fig. 6)。

以上の知見から脳脊髄液中の局所麻酔剤の分析法として、従来のアルカリ性有機溶媒抽出法に若干の修正を加えることが望ましいと考えられる。すなわち Chart 1 に示したように、まず試料の一部をとり、その紫外外部吸収スペクトルから Pro, Tet, Dib の存在の有無およびその大体の量を知り、残りの試料は pH 3.5 に調整し、エーテルによってエステル結合の加水分解によって生じる芳香族カルボン酸を抽出し、PC, TLC, PE などに

よって分析する。水層はアルカリ性としてエーテル抽出し、未変化の局所麻酔剤を分析し、それらの結果から総合的に判定することが望ましい。

脳脊髄液に Pro·HCl を 100 μ g/ml の濃度に加え室温に 46 時間放置したものを試料として、この改良分析法を行なった。紫外外部吸収スペクトル (Fig. 7) から Pro の存在と、その濃度が塩酸塩として約 100 μ g/ml であることが推定できた。pH 3.5 およびアルカリ性でのエーテル抽出物の PC を行ない、Rf 値およびスポット抽出液の紫外外部吸収スペクトルから PABA および Pro を同定した。この結果から加えた Pro は PABA として 30%、Pro として 50% 回収したことになる。

プロカインによる事故例の鑑定分析に、この改良分析法の一部を適用したところ、プロカインが検出されない血液、脳脊髄液中に PABA を検出することができた。とくに注射部位である仙骨部の脳脊髄液中にかなりの量の PABA (36 μ g/ml) を検出した。

このように脳脊髄液中の局所麻酔剤の分析には、従来のアルカリ性有機溶媒抽出による未変化の局所麻酔剤の検索に、紫外外部吸収スペクトルによる予試験および芳香族カルボン酸の分離、同定を併用することにより、分析の確実性がより高まると考えられる。

脳脊髄液の入手に御協力いただいた東大病院脳神経外科・佐野圭司教授を始め医局員の方々に深く感謝致します。

文 献

- 1) 浜田昭, 星野乙松, 丹沢珪子, 浮田忠之進: 本誌, 10, 14 (1964).
- 2) F.F.Foldes, M.H.Aven: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 105, 259 (1952).
- 3) H.Shapiro: J. Soc. Chem. Ind., 64, 177(1945); (C.A., 39, 4857).
- 4) W.Kalow: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 104, 122 (1952).