[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
— 一般 論 文 —
15 (1) 55~59 (1989)

急性薬物中毒における血清中ブロムワレリル尿素の簡易比色定量^{*1}

仲村裕子^{*2}, 原 明宏^{*2}, 近藤由利子^{*2}, 森田美香^{*3},
東祐太郎^{*3}, 滝沢徳正^{*3}, 河崎秀樹^{*3}, 由岐英剛^{*3}
東邦大学医学部附属大森病院薬剤部^{*2}
東邦大学薬学部臨床化学教室^{*3}

A Simple Colorimetric Determination of Bromvalerylurea in Acute Toxicopathic Patient's Serum

YUKO NAKAMURA^{*2}, AKIHIRO HARA^{*2}, YURIKO KONDOU^{*2},
MIKA MORITA^{*3}, YUTAROU AZUMA^{*3}, NORIMASA TAKIZAWA^{*3},
HIDEKI KAWASAKI^{*3}, HIDETAKA YUKI^{*3}
Department of Pharmacy, Toho University Omori Hospital^{*2}
School of Pharmaceutical Science, Toho University^{*3}

(Received June 6, 1988)

A new method for the determination of bromvalerylurea (BVU) in the serum of acute toxicopathic patients was developed. The serum was incubated with urease to hydrolyze urea which interferes with the determination of BVU. After deproteinization with trichloroacetic acid, the sample solution was reacted with diacetylmonooxime, and the color developed was measured at 525nm. A straight calibration curve was obtained between 10 and 300 μ g BVU/ml serum. This method was simple and precise, and was applied to the acute toxicopathic patient's serum.

Keywords—serum bromvalerylurea; colorimetric determination; diacetylmonooxime; acute toxicopathic patient

緒 言

急性薬物中毒において、ブロムワレリル尿素 (BVU) は市販でも入手が可能な睡眠剤であり、田坂ら¹⁾, 堀岡ら²⁾の報告によると, BVU は中毒原因物質として第1位となっている。臨床上 BVU の急性中毒の場合において, BVU の血清中濃度及びその推移を迅速に知ることは, その処置を行う上で非常に重要である。血清中の BVU

の定量法については, ブロム比色法³⁾, GC 法⁴⁾, HPLC 法^{5~7)}等が報告されている。

著者らは, これまで操作が煩雑であった比色法に関して, 尿素の定量法とされているジアセチルモノオキシム法を応用することにより, BVU の簡易比色定量法確立の検討を行った。さらに, 本法をラット及び BVU 服用患者血清について適応し, 短時間でその濃度を求めることができた。

実 験 方 法

1. 試薬及び試料

BVU は日本新薬製, ジアセチルモノオキシム (DAM) 及びチオセミカルバゾン (TSC) は和光純薬製 試薬特級, 標準血清はネスコール X 化血研を用いた。ウレアー

*1 本報の要旨は日本薬学会 (第106年会, 千葉市) で発表。

*2 東京都大田区大森西6丁目11-1; 11-1, Omori Nishi 6-chome, Ota-ku, Tokyo, 143 Japan

*3 千葉県船橋市三山2丁目2-1; 2-1, Miyama 2-chome, Chiba-shi, 274 Japan

ゼ(ナタ豆製)はシグマ社製 Type III のものを、活性を測定した後使用した。DAM-TSC 試薬は、1.2% DAM 水溶液及び 0.06% TSC 水溶液を反応直前に等量混合して用いた。その他の試薬は、すべて市販特級規格品を用いた。

2. 装置及び器具

装置：島津製作所社製ダブルビーム分光光度計 UV-200S

恒温槽：大和社製インキュベータ BT222

遠心分離器：国産社製遠心分離器

ミキサー：サーモニクス社製 THERMO-MIXER TM105

3. 操作方法

BVU の含まれる血清または血漿 0.2ml に、ウレアーゼ溶液 0.1ml と 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.2ml を加え、37°C でインキュベートし、尿素を分解する。10%トリクロ酢酸 (TCA) 0.3ml を加え遠沈して除蛋白する。上澄液 0.5ml を共栓つき褐色試験管にとり、DAM-TSC 試液 0.5ml を加え、最終濃度が 5N となるように塩酸 3ml を加え、水浴上で 100°C 20 分間加熱し、冷後 525nm で比色する。

4. 検量線の作成

10~300 μ g/ml 相当の BVU を添加した標準血清を調製し、これを前述の方法に従って測定した。吸光度を BVU の濃度に対しプロットし検量線を得た。

結 果

1. 縮合反応時の溶媒の塩酸濃度

縮合反応時において、従来の DAM 直接法の通りリン酸を用いると、BVU の感度は低く使用は困難であった。そこで溶媒を塩酸に変えたところ感度が上昇したため、

溶媒として塩酸を用いることとした。

その際の塩酸濃度と感度の関係を Fig.1 に示した。塩酸の濃度は 5N のとき最も感度が高かったため、反応時の塩酸をこの濃度とするため 6.67N の塩酸を加えることとした。

2. BVU 反応後の吸収スペクトルと安定性

BVU 反応後の吸収スペクトルとその安定性を Fig.2 に示す。525nm で極大値が得られたため、測定は 525nm で行うこととした。また、正常血清で同様に操作した場合、この波長で吸収がわずかに見られたため、測定値から血清ブランク値を引くこととした。

反応後の吸光度は 6 時間後まで変化が見られず、測定操作時間内で十分安定であった。

3. 添加ウレアーゼ量の検討

腎機能低下等の血清中尿素の増加した患者において

Fig.1. Effect of HCl Concentration on Color Development of BVU

Fig.2. Spectrum of Colored Reaction Product and Its Stability at Room Temperature

も、尿素を完全に分解するだけのウレアーゼの量を決定するために、正常血清にさらに尿素を 100mg/dl の割合で添加し、ウレアーゼの量を10, 20, 30, 50, 70国際単位として実験を行った。その結果を Fig.3 に示す。

反応時間10分とした場合、用いるウレアーゼの量は、10国際単位でも十分であったが、さらに安全を期して30国際単位とした。

4. 反応時間の検討

DAM-TSC 試薬を加えた後の、反応時間と呈色の強さとの関係を検討するために、100°C で5分間隔で30分まで経時的に加熱し、吸光度の変化を観察した。Fig.4 に示すように、吸光度は20分でほぼ一定となったため、加熱反応時間は20分とした。

なお、全体の操作を Fig.5 に示した。

Fig.3. Determination of Urease Unit for Complete Hydrolysis of Serum Urea

Fig.4. Effect of Reaction Time on Color Development of BVU

5. 検量線の検討

BVU10~300 μ g/ml相当を添加した標準血清を作成後、本法の条件下で測定した結果、 $y=2.13 \times 10^{-3}x + 6.29 \times 10^{-4}$ ($n=11$), 相関係数 0.999 の良好な直線性が得られた (Fig.6)。

また、それより低濃度の 10~100 μ g/ml の BVU 添加血清についても検量線を作成したが、同様に $y=1.99 \times 10^{-3}x + 2.69 \times 10^{-4}$ ($n=11$), 相関係数 0.999 の良好な直線性が得られた。

6. 再現性の検討

BVU 10, 50, 100 μ g/ml を含む血清について本法で行った再現性及び回収率の結果を Table 1 に示した。いずれも良好な結果が得られたが、同時再現性、日差再現性ともに 10 μ g/ml における変動係数が 50, 100 μ g/ml

- 1) Serum or standard solution.....0.2ml
Buffer solution pH 7.00.2ml
Urease solution0.1ml
Incubation at 37°C for 10 min.
- 2) 10% TCA solution0.3ml
3000 rpm for 10 min.
- 3) Supernatant0.5ml
DAM-TSC solution.....0.5ml
6.67N HCl3.0ml
Heating at 100°C for 20 min.
- 4) Measurement at 525 nm

Fig. 5. Procedure for the Determination of BVU in Serum

Fig. 6. Calibration Curves of BVU

Table 1. Precision and Recovery in Determination of BVU in Serum

BVU (μg/ml)	Within-run (n=8)		Between-run(n=8)	
	Mean ± S.D. (μg/ml)	C. V. (%)	Mean ± S.D. (μg/ml)	C. V. (%)
10.0	9.8 ± 0.7	7.46	9.3 ± 0.8	8.13
50.0	48.2 ± 0.9	1.92	46.7 ± 1.7	3.59
100.0	95.4 ± 1.8	1.90	89.5 ± 2.9	3.21

	Concentration (μg/ml)	Recovery (%)
BVU	10.0	99.1
	50.0	96.0
	100.0	95.7

に比較して大きくなったため、10μg/mlの濃度が定量限界と思われる。

7. 交差反応の検討

本法は、BVUの尿素構造による反応を用いた定量法であるため、尿素構造を有する薬物を併用していた場合、その交差反応が問題となる。そのため尿素構造を有する薬物また薬物中毒で上位にランクされるものについて、BVUとの交差性の検討を行った。BVU 100μg/mlの標準液に同濃度他剤を添加し測定を行った。結果は、BVUのみのものを100%として表した。

Table 2に示すように、アセチル尿素は反応機構上当然高い値を示したが、この物質は医薬品として用いられ

Table 2. Cross Reaction of Various Substances (100μg/ml) Mixed with BVU (100μg/ml)

Additives	BVU found
BVU only	100.0 (%)
Acetylurea	353.2
Urea	99.0
Acetylpheneturide	158.0
Phenobarbital	99.5
Nitrazepam	94.7
Phenytoin	90.0
Chlorpromazine	95.8
Carbamazepine	96.3
Estazolam	105.0
Diazepam	104.5
Medazepam	104.5
Levomepromazine	100.0
Bromazepam	95.0

ることはない。点線以下が医薬品として使用されるものであるが、部分的にアセチル尿素の構造を有しているアセチルフェネトライドのみ高い値を示した。尿素及びフェノバルビタール以下のものについては、この測定法に影響を与えなかった。

また、ビリルビン血清に関しても検討したが、20mg/dlまでは影響が見られなかった。

8. ラット血清中 BVU の測定

体重 280~310 g のラットに人間の極量、致死量、致

Table 3. BVU Concentration in Rat Serum at One Hour after Oral Administration

Rats No.	Body Weight (g)	Dose (mg/kg)	BVU in Serum (μ g/ml)
1	295	40*	N.D.
2	280	200**	26.2
3	310	200	24.1
4	295	600	42.5
5	290	600	55.3

*: maximum dose for man

**: lethal dose for man

N.D.: not detected

死量の3倍にあたる40, 200, 600mg/kgの割合でBVUを経口投与し、投与後1時間に採血し、その血清について測定を行った。その結果、200, 600mg/kgの割合で投与したものについては、Table 3に示す測定値が得られた。極量に相当する40mg/kg投与したものからは、BVUは検出されなかった。

9. 臨床例

某BVU中毒患者の血中濃度測定について、経時的に採血し測定を行った。患者は、12月22日19時服薬後約7時間に当院ICUに意識障害、呼吸抑制の状態で入室した。薬ビンがそばにあったこと、レントゲン所見等からBVU中毒であると診断された。直ちに胃・腸洗浄、強制利尿、血液透析が施行された。

12月22日20時BVU服用後約8時間の血液透析前の血中濃度は113 μ g/mlであり、呼名反応、痛覚反応ともになかった。翌朝12月23日の血中濃度は56 μ g/mlであり、徐々に呼名反応、痛覚反応に応じるようになり、意識も回復した。服薬3日後、12月25日8時のBVU血中濃度は、検出限界以下であった。

考 察

尿素の臨床検査法の1つとして行われているジアセチルモノオキシム法は、尿素を強酸の存在下DAMとTSCとを反応させて呈色させる方法である。この反応では、DAMがTSCと縮合してチオセミカルバゾンを形成し、さらにこれが尿素と数段階の反応後、2-amino-5,6-dimethyl-2,3-dihydrotriazine-3-oneを形成する。この物質は酸性溶液中でプロトネーションを起こし、赤く呈色することが明らかにされている⁹⁾。

BVUは尿素構造を有するため、DAMによる比色法の適応が可能であろうと考え、この方法の応用を検討し

た。しかし、血清中の尿素は当然妨害となるため、この尿素をウレアーゼで分解除去を試みた。この場合ウレアーゼは特異性が高く、BVUに作用することはないと考えられる。

ヒトでのBVU中毒の際の血中濃度は真口らの報告⁹⁾によるとBr量として20~50 μ g/ml (BVUとして55.8~140 μ g/ml)であり、EssenらによるとBVU中毒患者の血清中濃度が90 μ g/mlであったと報告されている¹⁰⁾。また田坂らは予後判定の基準を100 μ g/mlとしている¹⁾。

本法の定量限界はHPLC法に比してやや低いが、10~300 μ g/mlの範囲のBVUの血中濃度測定が可能であるので、上記の文献^{9,10)}や今回の臨床例から考えて、本法はその簡便性により、BVU急性中毒患者に対し実際の適用が可能であると考えられる。

ま と め

BVU中毒患者の血清中濃度測定方法を検討した。BVUは尿素構造を有するため、血清中の尿素をあらかじめウレアーゼで分解除去した後、DAMにてBVUを呈色させることによる簡易比色定量法を開発することができた。この方法は臨床的な応用が可能と考えられる。

謝辞 ラットへのBVUの投与並びにその採血にご協力下さいました、東邦大学薬学部臨床化学教室の長谷川幸雄助手に感謝します。

引 用 文 献

- 1) 田坂定孝, 清水喜八郎, 国井乙彦, 日本医事新報, No.1879, 3 (1960).
- 2) 堀岡正義, 藤井俊志, 外科診療, 24, 796 (1982).
- 3) 日本薬学会編, “薬毒物試験法注解第3版”, 南山堂, 1985, p.89.
- 4) 小嶋 亨, 日法医誌, 25, 59 (1971)
- 5) D.R.A.Uges and P.Bouma, Arch. Toxicol., 42, 85 (1979).
- 6) 岡本光美, 山田不二造, 石黒源之, 梅村厚志, 薬誌, 100, 675 (1980).
- 7) 西原カズヨ, 幸田幸直, 小滝 一, 斎藤侑也, 森田博, 堤 晴彦, 豊岡秀訓, 三井香児, 分析化学, 35, 272 (1986).
- 8) H.Yuki, T.Ohmura, H.Kawasaki, T.Yajima and K.Saito, Chem. Pharm. Bull., 29, 1096 (1981).
- 9) 真口孝順, 北海道医学雑誌, 36, 559 (1961).
- 10) E.J.Essen, J.C.Csanky-Treels, M.C.Th.F.M.Krom and M.M.Tjoeng, Arch. Toxicol., 44, 299 (1980).