

〔原著〕 松本歯学 6 : 95~100, 1980

2回抽出法による血液中の局所麻酔剤の抽出と Gas Chromatograph による分析

磯 勝彦, 植田洋一郎*, 清水文夫, 山岡 稔
松本歯科大学 口腔外科学第2講座 (主任 待田順治 教授)

石 井 孝
大阪大学歯学部 口腔外科学第1講座 (主任 宮崎 正 教授)

The Twice Extracting Method of the Local Anesthetics
in Human Blood for the Gas Chromatographic Study

KATSUHIKO ISO, YOICHIRO UEDA, FUMIO SHIMIZU and MINORU YAMAOKA

*Department of Oral Surgery II, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. J. Machida)*

TAKASHI ISHII

*Department of Oral Surgery I, Osaka University Dental School
(Chief: Prof. T. Miyazaki)*

Summary

It has been thought important to study the concentration levels of the local anesthetics, because to which toxic symptoms induced by local anesthesia in the oral region is considered proportional.

In the gas chromatographic studies for this purpose, it is necessary to refer to the method of extracting the local anesthetics in the blood plasma.

We examined the two times extracting method, utilizing a peculiarity of that the local anesthetics being easily solved in organic solvent in alkaline solution and in water (aqueous layer) in acid solution. The specimen of blood containing local anesthetics was resolved with CCl_4 by stirring repeatedly with alkaline solution and acid solution.

Consequently the peaks of the local anesthetics on the gas chromatogram (by GC-

* 現 埼玉医科大学口腔外科学講座 (主任 高久 暹 教授)

本論文の要旨は、第9回松本歯科大学学会 (総会) (昭和54年12月1日)において発表された。(1980年5月13日受理)

4BPTF, Shimadzu) showed that the mutual intervention of the organic substances in the blood was distinctly eliminated.

The peak heights of the local anesthetics and the internal standard were measured and the ratios of them were compared with the control, and the regression lines were calculated.

Thus the two times extracting method of the local anesthetics was confirmed to be valid in the gas chromatography.

緒 言

局所麻酔剤は除痛剤として最も多く使われているものの一つであるが、局所麻酔剤の使用による合併症も多く就中局所麻酔剤による中毒は重篤なものとして挙げられる¹⁾。この中毒症状は局所麻酔剤の血液中の濃度に関係があり一定以上に上昇した場合に発現すると考えられている^{2) 3)}。そこで我々は口腔外科手術時における局所麻酔剤の使用量と血中濃度の関係を追求するにあたり、その前段階として血漿中に含まれる各種局所麻酔剤の抽出法と gas chromatography による分析について検討した。

方 法

抽出方法；

(1) 血漿を使わないもの (対照)

表1のように、濃度 1.25 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ の Lidocaine と Prilocaine を 1 ml ずつ試験管にとり、有機溶媒として CCl_4 を各々に 2 ml ずつ加える。さらに内部標準物質として、濃度が 5 $\mu\text{g/ml}$ または 10 $\mu\text{g/ml}$ の Mepivacaine を 1 ml ずつと、5 N-NaOH を 1 ml ずつ加えることによりアルカリ溶液とする。これらを stirrer にて 5 分間混和し上層(肉眼的に確認できる)を吸引除去する。以上の操作により各種局所

表1：対照 (血液を用いない) 試料

試料番号	(1)	(2)	(3)	(4)
5 N-NaOH	1	1	1	1 ml
Lidocaine	1.25	2.5	5	10 $\mu\text{g/ml}$
Prilocaine	1.25	2.5	5	10 $\mu\text{g/ml}$
Mepivacaine	5	5	10	10 $\mu\text{g/ml}$
CCl_4	2	2	2	2 ml

麻酔剤を CCl_4 層に移行さす (表1, 図1)。

(2) 血漿を使ったもの

50 ml 砲弾型遠沈管 4 本にヒトの血漿 2 ml を各々とり、濃度が 1.25 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ の Lidocaine と Prilocaine を 1 ml ずつ、有機溶媒としての CCl_4 を 10 ml それぞれに加え、さらに 5 N-NaOH 2 ml を加えることによりアルカリ溶液とする。これらを stirrer にて 5 分間混和することにより各種局所麻酔剤を血漿中より CCl_4 層に移行させることができるが、同時に血漿中の有機易溶性物質も移行し有機溶媒層に白濁を生じる。これを除去する目的で下記操作を追加した。上記試料を 3,000 rpm で 10 分間遠沈後、有機溶媒層を残し上層 (aqueous layer) を吸引除去する。この有機溶媒層に 1 N-HCl 10 ml を加え、stirrer にて 5 分間混和し、局所麻酔剤を酸性溶液 HCl 層に移行させる。上層である酸性溶液層を別の砲弾型遠沈管に移し、5 N-NaOH 4 ml と CCl_4 3 ml を加え、stirrer にて 5 分間混和する。以上により各種局所麻酔剤のみを CCl_4 層に移行させることができた (表2, 図2)。

乾燥、濃縮；局所麻酔剤を含んだ CCl_4 層をスピッツ型試験管に移し 40°C で吸引乾燥を行う。

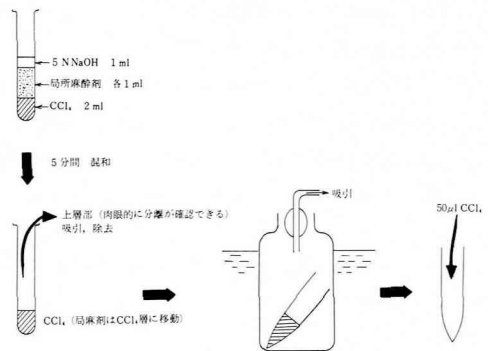


図1：対照群の抽出方法

表 2 : 血液を用いた試料

試料番号	(1)	(2)	(3)	(4)
5 N-NaOH	2	2	2	2 ml
Lidocaine	1.25	2.5	5	10 μ g/ml
Prilocaine	1.25	2.5	5	10 μ g/ml
Mepivacaine	5	5	10	10 μ g/ml
ヒトの血漿	2	2	2	2 ml
CCl ₄	10	10	10	10 ml

表 3 : 使用したガスクロマトグラフの要点

機種	GC-4B PTF (島津製作所製)
分離カラム	ガラス製カラム 2 m
充填剤	Silicon SE 30, Chromosorb WAW DMCS
カラム温度	200°C
検出器	水素炎イオン化検出器
キャリアガス	40 ml/min.
窒素流量	
恒温槽温度	200°C

これに 50 μ l の CCl₄ を加え、直ちに閉栓後 stirrer にて 5 分間振動させる事により、壁面に付着している局所麻酔剤を機械的に溶解させる。この内 1 μ l をガスクロ用マイクロシリンジにてガスクロマトグラフに注入し分析を行う。

ガスクロマトグラフィーによる分析; ガスクロマトグラムは島津製 GC-4 BPTF でありカラムは直径 4 mm, 長さ 2 m のガラス製を用い、充填剤は Silicone SE-30, support: Chromosorb WAW DMCS を使用した。温度設定にあたってはピークの現われ方などからカラム温度を 200°C, Detector 及び注入温度を 250°C とした。キャリアガスは N₂ を用い、その流速を 40 ml/min. とした (表 3)。

分析方法; 今回の我々の実験は 2 回抽出法の有効性に主眼を置いたので、分析は操作上簡単なピーク高の測定による方法を用いた。即ち、内部標準物質としての Mepivacaine のピーク高を基準に Lidocaine 及び Prilocaine のピーク高について、濃度及び感度により補正を行ない検量線を作製した。

結 果

資料のガスクロマトグラフによる分析結果の 1

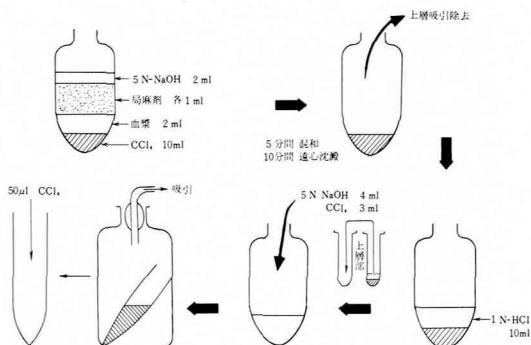


図 2 : 血液に含まれる局麻剤の抽出方法

例を図 3 に示した。この例は血漿を使わずに (対照) 感度 8×10^3 , 濃度 10μ g/ml の Lidocaine, Prilocaine を調べたものである。横軸は局所麻酔剤の保持時間 (分) を示し, Lidocaine 4 分 25 秒, Prilocaine 5 分 30 秒, Mepivacaine 10 分 40 秒であった。一方縦軸によりピークの高さ, 面積を知る。このように Lidocaine, Prilocaine, Mepivacaine のピークを明瞭に認め, 他に有機易溶性物質によるピークや干渉を認めなかった。

これらの記録からピーク値を求め, さらに感度, 濃度により補正をおこなったところ表 4, 5 の如くであった。この補正值より図 4 の検量線を得た。

検量線の横軸は局所麻酔薬の血中濃度であり, 縦軸は補正值である。この結果 Lidocaine では対照では $Y = 24.9 X - 23$, 血漿を使った場合 $Y = 24.6 X - 15$ であり, Prilocaine では対照 $Y = 7.9 X - 11$, 血漿を使った場合 $Y = 4.8 X - 4.4$ であった。このように対照と血漿を使った場合とはほぼ近似した検量線が示された。

考 察

血漿中から微量の局所麻酔剤を抽出しガスクロマトグラフィーを用いて定量する場合, 抽出過程において血漿中に含まれる有機易溶性物質が混入することがある。これよりガスクロマトグラム上で局所麻酔剤に起因しないピークの発現を認めることがあり, ピークの干渉による測定誤差を生ずる結果となる。これを防止する為には抽出段階において局所麻酔剤以外の物質を排除することが欠かせない^{4) 6)}。通常は CCl₄ を抽出溶媒として用い, 血漿中の局所麻酔剤を 1 回抽出を行うが, この方法では CCl₄ に白濁を生じ乾燥, 濃縮も困難になるのみでなく, ガスクロマトグラム上でも

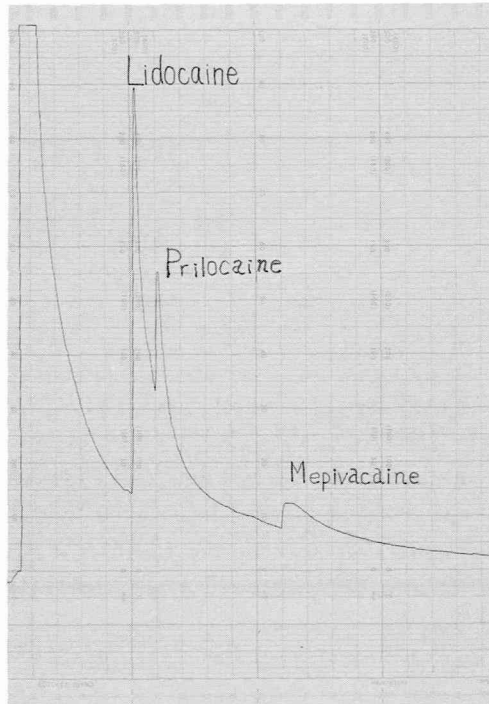


図3：得られた結果の1例

表4：対照試料のガスクロマトグラフによる分析値

試料番号		(1)	(2)	(3)	(4)
感 度		8×10^3	8×10^3	16×10^3	32×10^3
Lido-caine	濃 度	1.25	2.5	5	10
	Peak height	45	89	68	170
	補正值	6.9	14.8	90.7	236.5
Prilo-caine	濃 度	1.25	2.5	5	10
	Peak height	1.4	8	12	55
	補正值	0.2	1.3	16	76.5
Mepiva-caine	濃 度	5	5	10	10
	Peak height	26	24	12	23

表5：血液中に含まれた局麻剤のガスクロマトグラフによる分析値

試料番号		(1)	(2)	(3)	(4)
感 度		8×10^3	8×10^3	16×10^3	64×10^3
Lido-caine	濃 度	1.25	2.5	5	10
	Peak height	57	111	143	104
	補正值	4.6	14.8	143	221.9
Prilo-caine	濃 度	1.25	2.5	5	10
	Peak height	8	24	19	21
	補正值	0.64	3.2	19	44.8
Mepiva-caine	濃 度	5	5	10	10
	Peak height	50	30	16	30

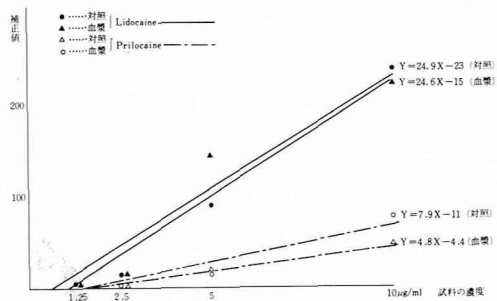


図4：Lidocaine 及び Propitocaine の検量線

上にのべたピーク干渉が現われる。そこで浅田ら⁴⁾は HCl を用い局所麻酔剤を抽出し、他の有機易溶解性物質の溶出による移行を防止する2回抽出法を発表した。

局所麻酔剤はアルカリ溶液中では非イオン型が多くなり有機溶媒に溶け易く、酸性溶液中ではイオン型が多くなり水に溶け易くなることはよく知られている^{4) 5)}。これに基づいて、血漿中からの局所麻酔剤の分離は非イオン化した状態で有機溶媒に移行させ、濃縮し測定するが、無機溶媒から有機溶媒中へ移行させる過程で血漿中に含まれている脂肪などの有機易溶解性の物質も同時に移行し、これらが測定上誤差を生ぜしめる原因となる。そこで血漿中に含まれる有機易溶解性の物質を除去するために無機溶媒中に移し、さらに有機溶媒中に移す操作が必要となる。

今回我々は CCl_4 を抽出溶媒として2回抽出法を用いた結果、有機溶媒中に白濁を生ずることもなくガスクロマトグラム上に明瞭な局所麻酔剤のピークのみを認めた。また各局所麻酔剤の保持時間は、同様な実験である浅田ら⁴⁾の報告と近似するものであった。また対照群と血漿を使った場合の検量線が互い類似していたことより、血漿を使った場合も2回抽出により局所麻酔剤が対照群と同様に抽出されると考えられた。このように2回抽出法は血漿中の有機易溶解性物質を除去できるので有利であるが、回収率の点で問題がある。浅田ら⁴⁾は2回抽出法とガスクロマトグラフィーによって Prilocaine^{7) 8)} 及び Mepivacaine を内部標準物質として Lidocaine などの同時定量を行った。これは C^{14} -Prilocaine を用いて抽出操作前後の radioactivity を測定し、そのカウント比をもって回収率としている。その結果 Prilocaine

については95%以上の回収率を得、Lidocaine 及び Mepivacaine の回収率は Prilocaine のピーク面積と比較することにより90%以上が得られたという⁴⁾。今後内部標準物質として Mepivacaine の放射性同位元素を用いた回収率の確認を行う必要がある。

内部標準物質として Mepivacaine を用いたが、その理由はガスクロマトグラフ操作時の誤差を相殺する目的では同じ非エステル型の局所麻酔剤が良いと考えたからである。

なお、実験方法について考察するとカラム温度は低い程分離は大きくなる一方、試料成分の沸点、分析に要する時間などを考慮して、分離能を妨げない最高温度を200°Cと設定した。キャリアガスは拡散係数の小さいN₂ガスを使用し、流速40 ml/min.において成分の溶出時間及び分離能に関し最も良好なピークの発現を認めることが予備実験の段階でわかった。

以上、2回抽出法は各種麻酔剤の作用発現と血中濃度の関係、経時成変化などを知る上に有用であると考えられる。

ま と め

血液中の局所麻酔剤の濃度をガスクロマトグラフで測定するために、CCl₄を抽出溶媒とした2回抽出法について検討した結果、ガスクロマトグラフ上でピークの干渉もなく、血中の局所麻酔

剤のみのピークを認め、良好な結果を得、今後十分に応用できる方法と考えられた。

参 考 文 献

- 1) 中久喜喬 (1974) 局所麻酔の合併症, 歯科麻酔学 (久保田康耶) 第2版: 206—219. 医歯薬出版, 東京.
- 2) 伊藤 哲 (1979) 歯科口腔外科領域における局所麻酔薬 Lidocaine 投与時の血清および血漿中の濃度変化に関する研究. 日歯麻誌, 7: 212—234.
- 3) 濱田晃實 (1979) 局所麻酔薬 (Lidocaine) 急性中毒の実験的研究. 日歯麻誌, 7: 235—248.
- 4) 浅田 章, 西村清司, 藤森 貢, 久保田行男 (1976) ガスクロマトグラフによる全血中の各種局所麻酔剤の同時定量法に関する研究. 麻酔, 25: 950—955.
- 5) 石川敏三 (1974) ガスクロマトグラフによる血液及び脳脊髄中局所麻酔剤の定量. 麻酔, 23: 246—250.
- 6) 浅田 章, 尾原正博, 久保田行男, 西村清司, 藤森 貢 (1978) リドカインによる喉頭および気管の表面麻酔後の血中濃度の推移. 麻酔, 27: 719—726.
- 7) Keenaghams J B (1968) The determination of lidocaine and prilocaine in whale blood by gas chromatography. Anesthesiology, 29: 110—112.
- 8) Keenaghams J B (1972) The tissue distribution metabolism and excretion of lidocaine in rats, guinea pigs, dog and man. J. Pharmacol. Exp. Ther., 180: 454—463.