

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИСФЛУРАНА, ПРОПОФОЛА И ФЕНТАНИЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

© 2016 г. А.Ю. Елизаров

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26

E-mail: a.elizarov@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 09.04.15 г.

После доработки 07.12.15 г.

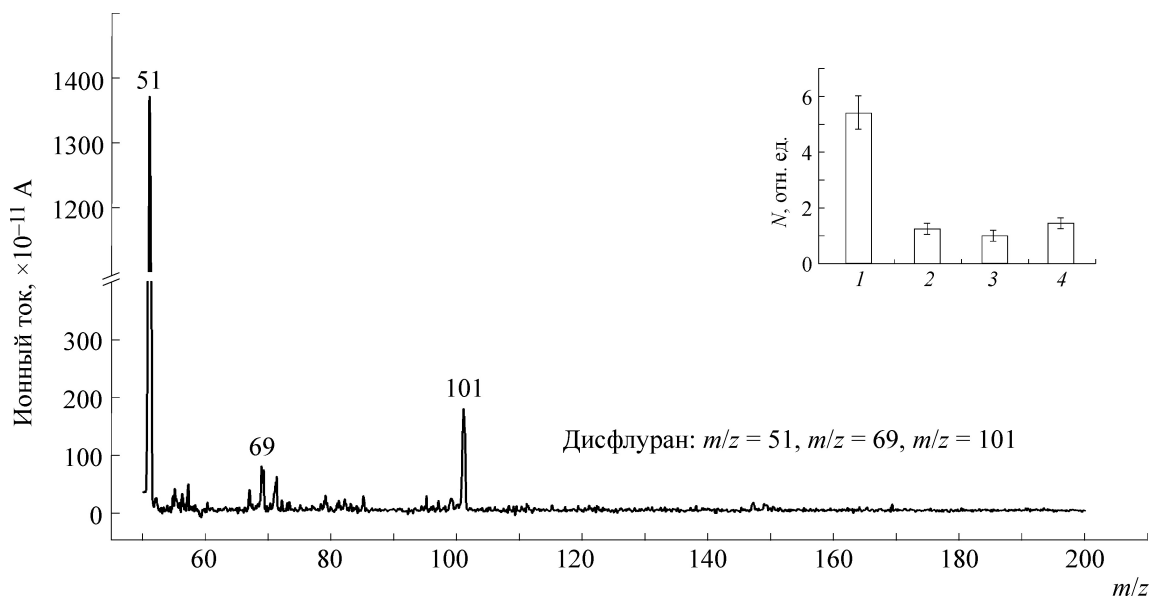
Выполнены измерения концентрации анестезиологических препаратов в плазме крови и спинномозговой жидкости при помощи масс-спектрометра с мембранным интерфейсом. Забор проб осуществлялся во время сбалансированной ингаляционной дисфлуран-фентаниловой анестезии и тотальной внутривенной пропофол-фентаниловой анестезии. Представлена экспрессная методика измерения концентрации органических молекул в биологических жидкостях, не требующая длительной пробоподготовки для ввода образца в интерфейс масс-спектрометра. В интерфейсе использовалось свойство первапарации (поглощение, диффузия, испарение) в силиконовой мембране анестезиологических препаратов из биологических жидкостей. Продемонстрирована возможность использования масс-спектрометра с мембранным интерфейсом для измерения абсолютной концентрации анестезиологических препаратов в плазме крови для изучения свойств гематоэнцефалического барьера.

*Ключевые слова:* масс-спектрометрия, мембрана, дисфлуран, фентанил, пропофол.

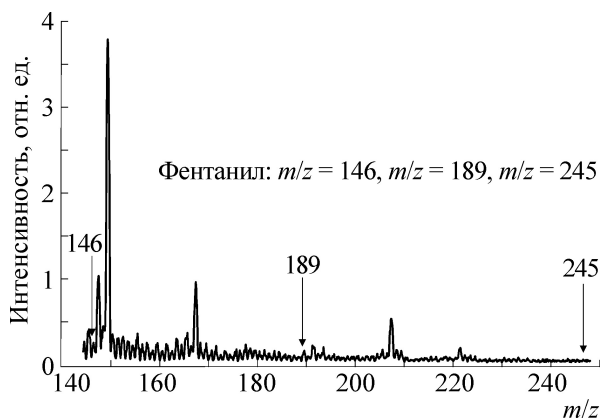
Хроматографические методы измерения концентрации органических молекул в биологических жидкостях требуют длительной пробоподготовки, которая сопряжена с использованием жидкофазной или парофазной экстракции препарата или, в последнее время, твердофазной экстракции. Для решения практических задач анестезиологии (в том числе мониторинга глубины анестезии и оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера), является актуальным создание экспрессной методики, позволяющей проводить измерения концентрации анестетиков в биологических жидкостях. Метод, использующий для абсолютных измерений концентрации широкого класса органических соединений, растворенных в воде, масс-спектрометр с мембранным интерфейсом, обладает пределом обнаружения в несколько единиц ррб [1]. Первое описание мембранного интерфейса для масс-спектрометра было представлено в 1961 г., в качестве мембраны применяли полидиметилсилоксан (силикон) [2]. При использовании мембранного интерфейса обогащение анализа осуществляется с помощью первапарации (поглощение, диффузия и испарение) через

мембрану химических соединений из водного раствора или, в случае нерастворимого в воде соединения, из водной эмульсии [1]. К недостаткам мембранного интерфейса следует отнести зависимость скорости первапарации через мембрану от полярности молекул, температуры и невозможности анализировать молекулы с соотношением  $m/z$  более 300. В 1963 г. этот метод впервые был использован для определения относительной концентрации  $O_2$  и  $CO_2$  в воде [3]. В настоящей работе для исследования концентрации органических молекул в биологических жидкостях впервые применили масс-спектрометрический мембранный сепараторный интерфейс, в котором использовали силиконовую мембрану толщиной 75 мкм. Для фиксации мембраны на отверстиях диаметром 6 мм во фланце интерфейса, расположенном перед ионным источником масс-спектрометра, задействовали пористую титановую пластину с диаметром пор 200 мкм. Мембранный интерфейс был использован с квадрупольным масс-спектрометром PrismaPlus (Pfeiffer Vacuum, Германия). Камеру масс-спектрометра откачивали турбомолекулярным насосом производительностью 80 л/с. Вакуум в камере поддерживался на уровне  $2 \cdot 10^{-5}$  мбар. Конструкция интерфейса позволяла осуществлять его нагрев до температуры 45°C.

Сокращения: ПВ – периферическая вена, ГМ – головной мозг, СЖ – спинномозговая жидкость.



**Рис. 1.** Масс-спектр дисфлурана в плазме крови, забор которой осуществляли во время сбалансированной ингаляционной анестезии (2,4 об %). На врезке – отношение концентраций ( $N$ ) медикаментозного агента в ПВ и ГМ: 1 – дисфлуран (ПВ/ГМ), 2 – дифлуран (ПВ/СЖ), 3 – фентанил (ПВ/ГМ), 4 – пропофол (ПВ/ГМ).



**Рис. 2.** Масс-спектр фентанила и плазмы крови, забор которой осуществляли во время сбалансированной ингаляционной анестезии.

На рис. 1 представлен участок масс-спектра плазмы крови, полученный при помощи мембранного интерфейса. Забор образцов крови осуществляли во время сбалансированной ингаляционной анестезии дисфлураном при его концентрации 2,5 об.% в дыхательном контуре аппарата ингаляционной анестезии. Забор осуществляли из периферической вены (ПВ) и из хирургической раны в хиазмально-селлярной области головного мозга (ГМ) во время аденомэктомии гипофиза. Образцы крови и спинномозговой жидкости (СЖ) центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. Образец объемом 10 мкл наносили непосредственно на мембрану

интерфейса в закрытую камеру, расположенную непосредственно над мембраной. Массовые пики с  $m/z = 51$ ,  $m/z = 101$  и  $m/z = 149$  соответствуют дисфлурану ( $C_3H_2F_6O$ , Baxter Healthcare, США) [4].

Гематоэнцефалический барьер расположен между эндотелиальными клетками, выстилающими кровеносные капилляры в мозге, поэтому концентрация анестезиологического препарата в крови из хирургической раны в ГМ соответствует его концентрации после прохождения гематоэнцефалического барьера [5]. В работе были измерены отношения концентрации дисфлурана в ПВ к его концентрации в ГМ. Результат измерений по шести операциям составил (ПВ)/(ГМ) =  $5,4 \pm 0,4$  (см. рис. 2). Различие концентраций дисфлурана в ПВ и ГМ обусловлено свойствами гематоэнцефалического барьера пациента. В тканях злокачественных новообразований свойства гематоэнцефалического барьера атрофированы и анализ его проницаемости для анестезиологического препарата может служить для предварительного гистологического анализа опухоли непосредственно в режиме *in situ*. Традиционные исследования свойств гематоэнцефалического барьера требуют дорогостоящих и длительных исследований, обусловленных тем, что образцы ткани ГМ забирают от умерших во время операции пациентов [6,7]. Эти результаты используются в фармакологии и в том числе для создания математической модели, позволяющей проводить

аналитические вычисления свойств гематоэнцефалического барьера [8,9].

Забор спинномозговой жидкости осуществляли во время вентрикулоперитонеального шунтирования, обусловленного необходимостью компенсации повышенного внутричерепного давления. Отношение концентраций дисфлурана в периферической вене к его концентрации в спинномозговой жидкости составляло ( $PВ/СЖ$ ) =  $1,25 \pm 0,2$  (см. рис. 1, врезка). Разница между значениями для дисфлурана ( $PВ/ГМ$ ) и ( $PВ/СЖ$ ) обусловлена тем, что аденома гипофиза, в отличие от повышенного внутричерепного давления, не приводит к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера. В результате повышения внутричерепного давления происходит скопление СЖ в межклеточных пространствах, приводящее к вазогенному отеку мозга, который вызывает повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера. Эти результаты были получены при проведении четырех операций.

Для поддержания нейролептаналгезии каждые 20 мин внутривенно вводили 0,1 мг фентанила ( $C_{22}H_{28}N_2O$ , Гос. завод медпрепаратов, Россия). Масс-спектр фентанила в плазме представлен на рис. 2. Измеренное отношение фентанила в ПВ к его концентрации в ГМ составило ( $PВ/ГМ$ ) =  $1,0 \pm 0,2$  (см. рис. 1, врезка), и, следовательно, фентанил проникает в центральную нервную систему беспрепятственно, что совпадает с результатами, полученными на крысах [10].

Во время тотальной внутривенной анестезии использовали режим инфузии, управляемой по целевой концентрации пропофола ( $C_{12}H_{18}O$ , Fresenius-Kabi, Германия) в крови. Его заданную концентрацию (2 мкг/мл) обеспечивали при помощи шприцевого насоса (B|Braun, Германия) с режимом управления по целевой концентрации гипнотика. Масс-спектр плазмы крови, забранной во время тотальной внутривенной анестезии пропофолом и фентанилом, представлен на рис. 3. Внутривенный гипнотик пропофол практически нерастворим в воде, но хорошо растворяется в жирах, поэтому его вводят внутривенно в составе эмульсии, состоящей из 10% соевого масла, 1,2% очищенных яичных фосфолипидов (эмульгатор), 2,25% глицерина, воды и гидроксида натрия. Высокая растворимость пропофола в липидах позволяет ему легко проходить в центральную нервную систему, что объясняет быструю медикаментозную активность препарата. Эмульсифицированная форма пропофола поступила на фармацевтический рынок в 1986 г. и в настоящее время является гипнотиком «выбора» при проведении ингаля-

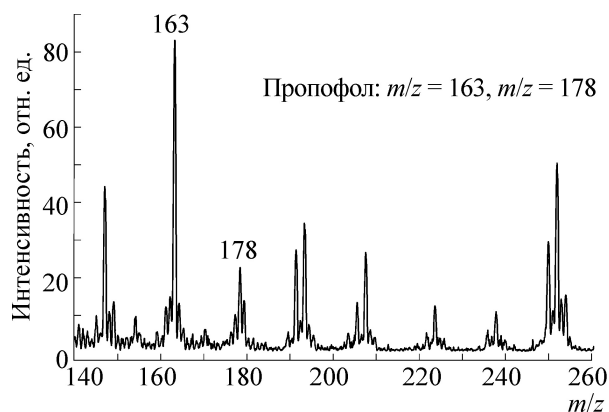
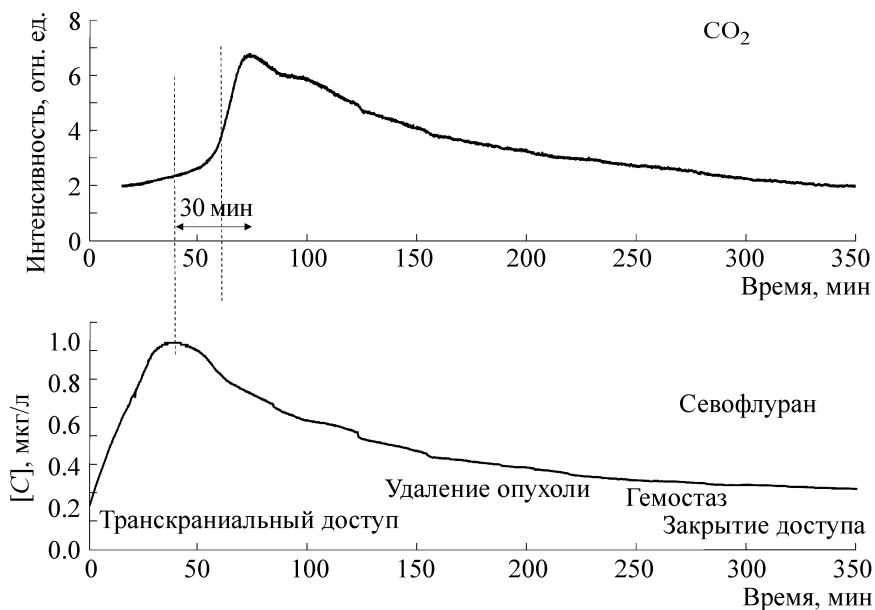


Рис. 3. Масс-спектр препарата пропофол в плазме крови, забор которой осуществляли во время тотальной внутривенной пропофол-фентаниловой анестезии.

ционной или внутривенной анестезии. В качестве внутреннего стандарта был приготовлен раствор пропофола в препарате интралипид (Fresenius-Kabi, Германия) для парентерального (внутривенного) питания, состав которого соответствовал растворителю пропофола. В результате серии из четырех измерений концентрация пропофола в плазме совпадала с концентрацией заданной по целевой концентрации с точностью не хуже 5%.

В работе производили забор крови из ПВ и ГМ во время пропофол-фентаниловой анестезии. Было получено, что концентрация пропофола в ГМ ниже, чем в периферической вене: ( $PВ/ГМ$ ) =  $1,45 \pm 0,2$  (см. рис. 1, врезка). Измерение отношений концентраций пропофола осуществляли по осколочному массовому пику с  $m/z = 163$ .

В результате измерений (до 30 циклов) деградация свойств мембраны не обнаружена. Исследование возможности длительного использования мембранного интерфейса без замены мембраны было выполнено во время измерения концентрации ингаляционного анестетика и  $CO_2$ , выделяемых через кожный покров. Мембранный интерфейс фиксировали на бедре пациента при помощи эластичного бинта, который не оставлял следов на коже за время проведения исследования. Временная зависимость концентрации выделенного через кожный покров в течение всей анестезии ингаляционного анестетика севофлуран была измерена по интенсивности осколочного пика с  $m/z = 131$ . На рис. 4 представлены результаты одновременного измерения  $CO_2$  и севофлурана, выделенных через кожный покров во время операции по удалению глиомы лобной доли головного мозга. Задержка между максимумами (вызваны ва-



**Рис. 4.** Временная зависимость концентрации ингаляционного анестетика севофлурана и  $\text{CO}_2$ , выделяемых через кожный покров во время ингаляционной сбалансированной анестезии.

зодилитацией, стимулированной севофлураном и стресс-реакцией на хирургическую травму) концентрации выделения  $\text{CO}_2$  и севофлурана через кожный покров составляла 30 мин, что обусловлено временем распределения ингаляционного анестетика в жировых тканях. Калибровка концентрации севофлурана, первапо-рируемого через мембрану, была осуществлена при помощи внутреннего стандарта, выполненного из раствора аналита в оливковом масле (севофлуран практически нерастворим в воде и хорошо растворяется в жирах). Мембранный интерфейс непрерывно использовали в течение 6 ч. Дегградация мембраны обнаружена не была.

Использование мембранного интерфейса просто в эксплуатации, сервисном обслуживании и имеет перспективы использования в практической анестезиологии для экспресс-анализа концентрации анестезиологических препаратов в плазме крови, спинномозговой жидкости и моче в режиме *in situ*.

Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры анестезиологии и реаниматологии и кафедры нейрохирургии Военно-медицинской

академии им. С.М. Кирова за содействие в проведении исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. T. Short, D. P. Fries, S. K. Toler, et al., Meas. Sci. Technol. **10**, 1195 (1999).
2. A. S. Michaels and H. J. Bixler, J. Polymer. Sci. **60**, 413 (1961).
3. G. Hoch and B. Kok, Arch. Biochem. Biophys. **101**, 160 (1963).
4. E. D. Miller and N. H. Greene, Anesth. Analg. **70**, 1 (1990).
5. L. L. Rubin, K. Barbu, F. Bard, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. **63**, 420 (1992).
6. N. Yasuda, A. G. Targ, and E. I. Eger, Anesth. Analg. **69**, 37 (1989).
7. C. M. Rosales, T. Young, M. J. Laster, et al., J. Forensic. Sci. **52** (6), 1408 (2007).
8. C. C. Lu, C. S. Tsai, O. Y. P. Hu, et al., J. Formosan Med. Ass. **112**, 185 (2013).
9. C. C. Lu, C. S. Tsai, S. T. Ho, et al., Anaesthesia **59**, 216 (2004).
10. T. K. Henthorn, Y. Liu, M. Mahapatro, and N.G. Ka-Yun, J. Pharm. Exp. Therap. **289** (2), 1084 (1999).

## **Mass Spectrometry Analysis of Disflurane, Propofol and Fentanyl in Plasma and Cerebrospinal Fluid**

**A.Yu. Elizarov**

*Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, Polytechnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

Concentrations of anaesthetic agents in blood plasma and cerebrospinal fluid were measured using mass-spectrometry with membrane interface. Sampling of biological fluids was performed during balanced inhalational (disflurane, fentanyl) anaesthesia and total intravenous (propofol, fentanyl) anaesthesia. A rapid test method for the measurement of the concentration of organic molecules in biological fluids was described. This method does not require long-term sample processing before injecting the sample into mass-spectrometer interface. The pervaporation properties (uptake, diffusion, evaporation) of silicone membrane of anaesthetic agents from biological fluids was used in mass spectrometric interface. We report the possibility of using a mass spectrometer with membrane interface for the measurement of absolute concentration of anaesthetic agents in blood plasma in order to study the properties of blood brain barrier.

*Key words: mass spectrometer, membrane, disflurane, fentanyl, propofol*