

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.06.003

❖ 基础研究 ❖

# 一次平衡法和二次平衡法在测定七氟烷代谢产物六氟异丙醇中的联合应用

林芷萱<sup>1</sup>, 杨小霖<sup>2</sup>

(川北医学院, 1. 麻醉学系; 2. 第二附属医院麻醉科, 四川 南充 637000)

**【摘要】目的:** 探讨顶空一次平衡法和二次平衡法在大鼠吸入七氟烷麻醉后血中生成游离六氟异丙醇 (HFIP) 浓度测定中的联合应用。**方法:** 选取 42 只健康成年 SD 大鼠, 其中 6 只采血用于测定标准品 HFIP 的血/气分配系数 (B/G), 将其余大鼠随机分成 6 组, 分别接受 1.0 MAC (2.32%) 浓度的七氟烷麻醉 0.5 h (S<sub>1</sub> 组)、1.0 h (S<sub>2</sub> 组)、1.5 h (S<sub>3</sub> 组)、2.0 h (S<sub>4</sub> 组)、3.0 h (S<sub>5</sub> 组)、4.0 h (S<sub>6</sub> 组), 每组各 6 只。随后立即腹主动脉取血 5~7 mL, 使用一次平衡法联合二次平衡法测定血中游离 HFIP 及七氟烷浓度。**结果:** 6 个时点均能测出七氟烷的代谢产物游离 HFIP 浓度, 但含量较低, 最大浓度出现在 S<sub>2</sub> 组 (0.81%)。血中七氟烷浓度随着吸入麻醉时间的延长逐渐增加, 而血中游离 HFIP 随着七氟烷麻醉时间的延长呈先增加后降低的趋势。**结论:** 联合应用一次平衡法和二次平衡法能有效测定大鼠血中 HFIP 浓度, 可为七氟烷的代谢研究奠定方法学基础。

**【关键词】** 一次平衡法; 二次平衡法; 六氟异丙醇; 七氟烷

**【中图分类号】** R614.2 **【文献标志码】** A

## Combined application of one-stage headspace equilibration and two-stage headspace equilibration in the determination of sevoflurane metabolite hexafluoro-isopropanol

LIN Zhi-xuan<sup>1</sup>, YANG Xiao-lin<sup>2</sup>

(1. Department of Anesthesiology, North Sichuan Medical College; 2. Department of Anesthesia, the Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】 Objective:** To investigate the combined application of one-stage headspace equilibration and two-stage headspace equilibration to determination the concentration of free hexafluoro-isopropanol (HFIP) in whole blood after inhalation of sevoflurane in rats. **Methods:** 42 healthy adult SD rats were selected. 6 rats were used to measure the blood gas partition coefficient of HFIP. The rest rats were randomly divided into six groups with 1 MAC (2.32%) sevoflurane anesthesia for 0.5 h (Group S<sub>1</sub>), 1.0 h (group S<sub>2</sub>), 1.5 h (group S<sub>3</sub>), 2.0 h (group S<sub>4</sub>), 3.0 h (group S<sub>5</sub>) and 4.0 h (Group S<sub>6</sub>), respectively. When the anesthesia time in each group was reached, 5~7 mL blood in each rat was drawn from abdominal aorta immediately. The concentrations of free HFIP and sevoflurane in blood were determined by the method of one-stage equilibration combined with two-stage equilibration. **Results:** The concentration of free HFIP can be determined by the method of one-stage equilibration combined with two-stage equilibration in each group for different anesthesia time, but the content was low, and the maximum concentration (only 0.81%) was found in group S<sub>2</sub>. The concentration of sevoflurane in blood gradually increased with the increase of anesthesia time, but the concentration of free HFIP increased at first and then decreased. **Conclusion:** The determination of HFIP in rat's blood by the combined method of one-stage and two-stage headspace equilibration has laid a methodological foundation for the study of sevoflurane metabolism.

**【Key words】** One-stage headspace equilibrium method; Two-stage headspace equilibrium method; Hexafluoro-isopropanol; Sevoflurane

目前, 气相色谱仪常用于测定气相和液相中的挥发性吸入麻醉药浓度。气相色谱法 (gas chromatography, GC) 具有效能高、相对灵敏、选择性强、快

速、稳定、重复性好等特点。七氟烷因具有诱导快、对呼吸和循环影响小、苏醒迅速等优点广泛应用于临床。七氟烷进入体内后绝大部分以原型经呼吸道

基金项目: 四川省南充市市校合作项目 (19SXHZ0151)

作者简介: 林芷萱 (1991 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: lufflx2021@163.com

通讯作者: 杨小霖。E-mail: yang\_xl\_yang@126.com

排出,仅约 5% 在肝脏内代谢<sup>[1]</sup>,在细胞色素 P450 酶系作用下转生成无机氟离子及六氟异丙醇(hexafluoro-isopropanol, HFIP)<sup>[2-4]</sup>。国外研究<sup>[5]</sup>报道,吸入七氟烷麻醉后所生成的游离 HFIP 浓度不足血中七氟烷浓度的 1%。有研究<sup>[6]</sup>表明, HFIP 在 SD 大鼠的最低肺泡有效浓度极低(0.004 4%),说明 HFIP 具有很强的潜在麻醉作用,且可能协同影响七氟烷的麻醉强度。由于 HFIP 的血/气分配系数极大,体内排出缓慢,可能导致患者苏醒延迟或苏醒期躁动的发生。但大鼠吸入一定浓度的七氟烷麻醉后血中游离 HFIP 的生成规律尚不清楚。本小组前期研究<sup>[7-8]</sup>中发现,由于 HFIP 具有极大的血/气分配系数(B/G),若常规使用顶空二次平衡法测定其浓度,则在第二次平衡完成时,要从气相中测出 HFIP 的浓度则极为困难且偏差较大。本研究旨在探讨联合应用一次平衡法和二次平衡法准确测定大鼠吸入七氟烷麻醉后血中 HFIP 含量的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验药品及仪器

液态七氟烷:120 mL/瓶(上海恒瑞医药有限公司);液态 HFIP:10 mL/瓶(美国 Sigma Aldrich 公司);肝素钠注射液:2 mL:12 500 单位/支(马鞍山丰原制药有限公司);0.9% 氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司)。Agilent Technologies 气相色谱仪(GC7890A);Ugo 动物麻醉机(Ugo Basile,意大利);七氟烷专用蒸发器(Vaor2000,德国);SPH-300A 氢气发生器(北京中惠普)等。气相色谱仪测定条件:色谱柱(Agilent19091J-413):325 ℃,30.00 m×320.00 μM×0.25 μM,柱箱温度 45 ℃,氢离子火焰检测器温度 200 ℃,后进样口温度 100 ℃,氢气流速 30 mL/min,空气流速 400 mL/min,氮气流速 20 mL/min。

### 1.2 方 法

1.2.1 待测气体标准曲线的制备 在上述气相色谱测定条件下,采用倍比稀释法利用已知浓度的七氟烷(或 HFIP)标准气制备色谱峰面积-麻醉药物浓度的标准曲线<sup>[9]</sup>,并得出相应的线性回归方程( $y = mx + b$ )及相关系数( $r$ ),其中  $x$  为麻醉药浓度(%), $y$  为峰面积,相关系数  $r$  应达到 >0.999。需要注意的是,当日待测气体浓度范围要包含在该标准曲线建立的范围之内,即建立的标准曲线方程中  $x$  的范围应覆盖所有待测气体浓度。

1.2.2 实验大鼠的麻醉处理 将室温控制在 25 ℃,从预定的 42 只健康成年 SD 大鼠中随机选取 6 只,采用水合氯醛腹腔注射麻醉后,随即腹主动

脉取血 5~7 mL 转移至带有三通的气密性良好的注射器内,用于测量 SD 大鼠标准品 HFIP 的血/气分配系数<sup>[10]</sup>。余下 36 只大鼠,用随机数字表法分成 6 组,每组各 6 只,分别接受 1 MAC(2.32%)浓度的七氟烷麻醉<sup>[11]</sup>,麻醉时间分别为 0.5 h( $S_1$ 组)、1.0 h( $S_2$ 组)、1.5 h( $S_3$ 组)、2.0 h( $S_4$ 组)、3.0 h( $S_5$ 组)和 4.0 h( $S_6$ 组)。麻醉开始时将麻醉装置氧流量调至 2 L/min,利用气相色谱仪校正七氟烷挥发罐浓度,确保挥发罐实际输出的七氟烷浓度接近设定值。随后向自制大鼠麻醉装置预充七氟烷(时间 ≥5 min),将其中一组大鼠放入麻醉框中开始计时。当吸入麻醉达设定时间后,在尽可能使得大鼠不脱离原七氟烷麻醉环境条件下,迅速开腹从腹主动脉取血 5~7 mL,转移至带有三通的密闭注射器,置于恒温箱内,进行平衡处理。其余各组均按上述要求完成麻醉并取样。

1.2.3 样本中七氟烷及 HFIP 浓度测定 首先应用注射器顶空二次平衡法完成 HFIP 样品血/气分配系数的测定<sup>[9,12-14]</sup>。用上述装有未经七氟烷麻醉的大鼠血液样本的 6 支注射器分别吸取 6 mL 当日所配制的较高浓度的 HFIP 标准气,吸空气至 18 mL 刻度处并关闭三通,放入 37 ℃ 恒温箱内进行空气浴。每 15 min 取出震荡 20 次,然后重新置于恒温箱内,如此反复至 1.5 h 时,取出注射器,抽吸空气至 20 mL 刻度处后继续于恒温箱中进行重新平衡 1.0 h,总平衡时间为 2.5 h。此时 HFIP 在液相及气相中达第一次平衡,采用顶空法用气相色谱仪测出此时注射器内气相中 HFIP 的浓度,记为  $C_1$ 。排出注射器内全部气体及部分液体,使注射器内剩余 3 mL 液体,随即抽吸空气至 18 mL 刻度处,关闭三通继续上述平衡,步骤同第一次平衡。2.5 h 后 HFIP 在气、液相中达第二次平衡。用气相色谱仪测定此时气相中 HFIP 浓度,记为  $C_2$ 。由于第二次平衡结束后两相中麻醉药总量等于第二次平衡开始时的药物量,得出以下公式:

$$C_2 \times V_2 + C_{12} \times V_{12} = C_{11} \times V_{12} \quad (1)$$

其中  $C_2$  为第二次平衡结束后用气相色谱仪测得的气相中吸入麻醉药浓度(vol%,气态容积百分比浓度); $V_2$  和  $V_{12}$  分别为第二次平衡时注射器内气体和剩余液体的容积(mL), $C_{11}$  和  $C_{12}$  分别为第一次和第二次平衡结束时注射器内液相中吸入麻醉药浓度(vol%)。液/气分配系数为达到平衡时液相中麻醉药浓度与气相中麻醉药浓度的比值:

$$\lambda = C_{11}/C_1 \text{ 或者 } \lambda = C_{12}/C_2 \quad (2)$$

公式中  $C_1$  为第一次平衡结束时测得的气相中 HFIP 浓度(vol%)。将公式(1)、(2)换算可推出:

$$\lambda = (V_2/V_{12}) \times C_2 / (C_1 - C_2) \quad (3)$$

此公式即为二次平衡法测定 HFIP 血/气分配系数  $\lambda$  的计算公式。

一次平衡法测定血中 HFIP 浓度:取上述装有麻醉后血液样本的注射器,抽空气使注射器内总体积达 18 mL,关闭三通,将其放入 37 °C 的恒温箱内进行一次平衡,步骤同上。2.5 h 后测得此时注射器内气相中 HFIP 的浓度,记为  $C_1$ 。根据第一次平衡结束时两相中麻醉药总量守恒,可得出以下公式:

$$V_0 \times C_0 = V_{G1} \times C_1 + V_0 \times C_{L1} \quad (4)$$

将公式(2)和公式(4)进行转换,可推出待测液体中实际挥发性麻醉药浓度:

$$C_0 = C_1 \times (V_{G1}/V_0 + \lambda) \quad (5)$$

其中  $V_0$  表示被测液体的体积 (mL);  $C_0$  表示被测液体中挥发性麻醉药的浓度 (vol%);  $V_{G1}$ 、 $C_1$  分别表示平衡结束时注射器内气体的体积和气相中麻醉药浓度;  $C_{L1}$  表示平衡结束时液相中麻醉药浓度 (vol%)。  $\lambda$  引用前面测得的 HFIP 在 SD 大鼠体内的血/气分配系数进行计算。

二次平衡法测定血中七氟烷浓度:操作步骤与测定 HFIP 的血/气分配系数时相同。当达到一次平衡时,注射器内七氟烷总量等于平衡最初待测血液中所含七氟烷的量,因此有:

$$V_{G1} \times C_1 + V_0 \times C_{L1} = V_0 \times C_0 \quad (6)$$

结合公式(2)、(6)可得出待测血液中七氟烷浓度  $C_0$  的计算公式为:

$$C_0 = V_{G1} \times C_1 / V_0 + C_1 \times \lambda \quad (7)$$

由以上公式(3)、(7)即能得出待测样本血液中七氟烷血/气分配系数及其浓度。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析与处理。HFIP 和七氟烷浓度以  $(\bar{x} \pm s)$  表示; HFIP 和七氟烷的血/气分配系数用所有样本的平均值表示;不同时间点血中游离 HFIP 及七氟烷浓度的比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

本实验测得 37 °C 条件下,SD 大鼠 HFIP 的血/气分配系数为  $453.18 \pm 74.20$ 。吸入 1 MAC 浓度七氟烷麻醉不同时间后各组大鼠血中均能测出游离 HFIP 及七氟烷。血中游离 HFIP 浓度随着吸入麻醉时间延长其浓度呈先增高后降低趋势,其峰值出现在吸入七氟烷麻醉后 1.0 h。血中七氟烷浓度随着吸入时间的延长逐渐增加,2.0 h 后趋于平稳。见表 1 及图 1。

表 1 各时点血中游离 HFIP 及七氟烷浓度  $(\bar{x} \pm s, n = 36)$

麻醉时间 (h)	HFIP (%)		七氟烷 (%)	
	浓度	P 值	浓度	P 值
0.5	0.055 ± 0.004 *	0.001	0.592 ± 0.102	-
1.0	0.081 ± 0.008	-	0.648 ± 0.042	0.195
1.5	0.061 ± 0.005 *	0.001	0.680 ± 0.051	0.488
2.0	0.056 ± 0.004 *	0.046	0.729 ± 0.047	0.311
3.0	0.049 ± 0.004 *	0.026	0.735 ± 0.070	0.887
4.0	0.042 ± 0.003 *	0.064	0.765 ± 0.087	0.504

\*  $P < 0.05$ , 与麻醉 1.0 h 比较。

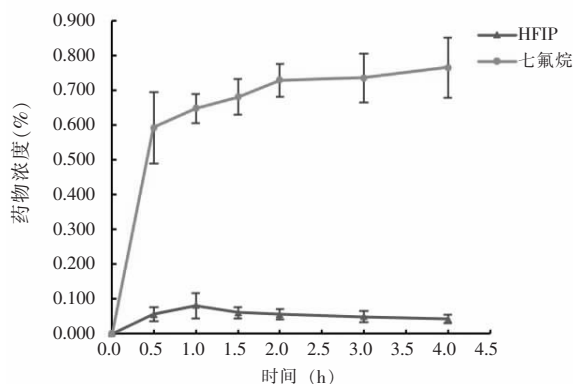


图 1 各时点血中游离 HFIP 及七氟烷浓度变化趋势

## 3 讨论

气相色谱法现已广泛应用于测定挥发性吸入麻醉药在气相和液相中的浓度。顶空法 (Headspace) 通过气相色谱仪可测定液相中挥发性麻醉药的液/气分配系数 ( $\lambda$ ), 从而进一步得出液相中麻醉药浓度<sup>[12]</sup>。液相中挥发性麻醉药浓度的测定可使用一次平衡法和二次平衡法。一次平衡法需引用参考文献中已有的分配系数进行计算。二次平衡法则可同时测出该种药物的液/气分配系数  $\lambda$  和浓度, 减少了实验的个体误差, 提高了测定结果的准确性, 但二次平衡法较一次平衡法耗时更长<sup>[10,12-14]</sup>。

七氟烷吸入麻醉后, 在体内通过肝脏代谢生成的 HFIP 含量很低, 且大部分与葡萄糖醛酸结合生成结合型 HFIP, 并通过肾脏排出, 仅约 15% 的 HFIP 以游离型存在于血液中。由于 HFIP 本身具有麻醉作用, 可能影响七氟烷的麻醉效应<sup>[2,15]</sup>。本小组前期临床试验在 37 °C 条件下测得人体 HFIP 的血/气分配系数为  $452.25^{[16]}$ , 与本试验测得的 SD 大鼠 HFIP 的血/气分配系数极为相似 ( $453.18$ ), 可见动物及人体 HFIP 的血/气分配系数均很大。血/气分配系数是指在一定大气压和一定温度条件下, 吸入麻醉药在液、气两相间运动达到平衡时的浓度比值。血/气分配系数越大说明该药物越容易溶解于血液

中,在两相中达到平衡所需时间越长,诱导和苏醒越缓慢。因七氟烷麻醉生成的游离 HFIP 含量较低 (<1%),加之 HFIP 血/气分配系数大,可推知血液样本在注射器内进行平衡时气相中 HFIP 浓度很低,如果使用二次平衡法,在第二次平衡时血中含量极低的游离 HFIP 便不容易挥发出来,将对测定结果的准确性产生一定影响。因此,本实验将一次平衡法及二次平衡法联合应用,先利用已知高浓度的标准品 HFIP 气体通过二次平衡法测得 SD 大鼠 HFIP 的血/气分配系数,再使用一次平衡法并引用已测得的 HFIP 血/气分配系数,从而推算出七氟烷麻醉后血中所生成的游离 HFIP 浓度,以减少实验误差。同时,由于七氟烷血/气分配系数较小,平衡时易从液相中挥发出来,故可直接采用二次平衡法同时测得其分配系数及血中七氟烷浓度,而无需引用文献中血/气分配系数数据。本研究结果显示,七氟烷麻醉后 0.5 h,即能在血中监测出游离 HFIP,说明 HFIP 在体内生成迅速,与 Kharasch<sup>[1]</sup>报道相符。随着吸入麻醉时间的延长,血中所生成的游离 HFIP 浓度增加,在吸入麻醉 1.0 h 后达峰值,随后逐渐下降。Eger 等<sup>[6]</sup>研究表明,SD 大鼠 HFIP 的 MAC 值为 0.004 4%。由于 HFIP 的血/气分配系数很大,在体内半衰期长(20.1 ± 8.2 h)<sup>[15]</sup>,排出缓慢,由此可以推测七氟烷麻醉一定时间后,代谢所生成的游离 HFIP 可在体内蓄积,并产生麻醉作用,由此可能影响七氟烷的 MAC 值。同时,本研究小组推知,临床上七氟烷麻醉后较高的苏醒期躁动发生率<sup>[17]</sup>可能与其代谢产物 HFIP 的影响有关。

本实验将一次平衡法及二次平衡法结合起来,用于测定七氟烷麻醉后血中生成的游离 HFIP 浓度,解决了单独使用二次平衡法在第二次平衡时无法测出血中极低 HFIP 含量的问题,为动物实验及临床试验中测定 HFIP 含量提供了方法性参考,为七氟烷的代谢研究奠定了方法学基础。该方法适用于样本中药物含量低,且血/气分配系数较大的挥发性麻醉药的浓度测定。

#### 参考文献

[1] Kharasch ED. Biotransformation of sevoflurane[J]. *Anesth Analg*, 1995,81(Suppl):27-38.  
[2] Kharasch ED, Armstrong AS, Gunn K, et al. Clinical sevoflurane metabolism and disposition. II. The role of cytochrome P450 2E1 in fluoride and hexafluoroisopropanol formation[J]. *Anesthesiol-*

*gy*, 1995,82(6):1379-1388.  
[3] Ed K, Ke T. Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane [J]. *Anesthesiology*, 1993,79(4):795-807.  
[4] Accorsi A, Morrone B, Domenichini I, et al. Urinary sevoflurane and hexafluoro-isopropanol as biomarkers of low-level occupational exposure to sevoflurane [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2005,78(5):369-378.  
[5] Lerman J, Gregory GA, Eger EI. Hematocrit and the solubility of volatile anesthetics in blood [J]. *Anesth Analg*, 1984,63(10):911-914.  
[6] Eger EI, Ionescu P, Laster MJ, et al. Minimum alveolar anesthetic concentration of fluorinated alkanols in rats: relevance to theories of narcosis [J]. *Anesthesia and Analgesia*, 1999,88(4):867-876.  
[7] 冯艳,杨小霖,陈小波,等.吸入不同浓度七氟醚患者全血游离六氟异丙醇浓度的比较:与苏醒期躁动的关系[J]. *中华麻醉学杂志*, 2018,38(3):274-278.  
[8] 李明,杨小霖.肝功能障碍对七氟烷代谢产物游离六氟异丙醇的影响[J]. *川北医学院学报*, 2019,34(3):378-381,388.  
[9] 杨小霖, Eger E, Sharma M. 七氟烷在小鼠中的代谢研究[J]. *四川医学*, 2012,33(11):1884-1886.  
[10] Yang XL, Ma HX, Yang ZB, et al. Comparison of minimum alveolar concentration between intravenous isoflurane lipid emulsion and inhaled isoflurane in dogs [J]. *Anesthesiology*, 2006,104(3):482-487.  
[11] 黄艳,杨小霖,黄三.新生及成年大鼠七氟醚 MAC 值的测定[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016,32(8):803-805.  
[12] Yu RG, Zhou JX, Liu J. Prediction of volatile anaesthetic solubility in blood and priming fluids for extracorporeal circulation [J]. *Br J Anaesth*, 2001,86(3):338-344.  
[13] Zhou JX, Luo NF, Liang XM, et al. The efficacy and safety of intravenous emulsified isoflurane in rats [J]. *Anesth Analg*, 2006,102(1):129-134.  
[14] Yang XL, Zhang WS, Liu J, et al. Pharmacokinetics of intravenous emulsified isoflurane in beagle dogs [J]. *Br J Anaesth*, 2013,110(1):128-136.  
[15] Kharasch ED, Karol MD, Lanni C, et al. Clinical sevoflurane metabolism and disposition. I. Sevoflurane and metabolite pharmacokinetics [J]. *Anesthesiology*, 1995,82(6):1369-1378.  
[16] Feng Y, Chen XB, Yuan WG, et al. Comparison of the Level of Free Hexafluoro-isopropanol in Adults' Blood and the Incidence of Emergence Agitation After Anesthesia With Different Concentrations of Sevoflurane in Laparoscopic Gastrointestinal Surgery: A Randomized Controlled Clinical Trial [J]. *Clinical Therapeutics*, 2019,41(11):2263-2272.  
[17] Kim HJ, Kim DK, Kim HY, et al. Risk factors of emergence agitation in adults undergoing general anesthesia for nasal surgery [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2015,8(1):46-51.

(收稿日期:2021-10-17 修回日期:2022-01-21)