

Analytisch-toxicologische Evaluatie van Potentiële Sevofluraan Toxiciteit met behulp van Kwantitatieve Compound A Bepaling door Gaschromatografie - Massaspectrometrie

Apr. Marie-Paule Bouche
Aspirant F.W.O.-Vlaanderen

Faculteit Farmaceutische Wetenschappen
Universiteit Gent



Overzicht

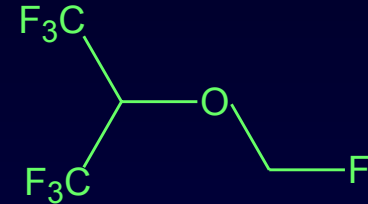
1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstelling
3. Ontwikkeling van de analytische procedure
4. Validatie van de analytische procedure
5. Klinische toepassingen
6. Besluit



Inleiding en probleemstelling

■ Sevofluraan:

- ✓ Inhalatie anestheticum
- ✓ Wereldwijd gebruikt
- ✓ Gunstige fysicochemische eigenschappen



→ vlotte en aangename **inductie** van anesthesie
snel **ontwaken en herstel**
nauwkeurige controle over de diepte van de anesthesie

⇒ **Ideaal anestheticum ?**

■ Echter:

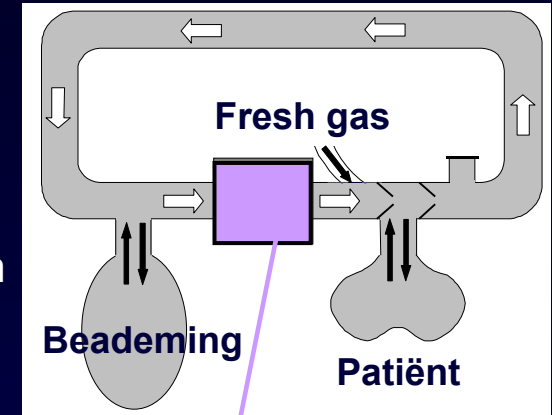
- ✓ In vivo metabolisatie
- ✓ Degradatie door CO₂-absorbentia:

→ in **low-flow** en **gesloten-circuit** anesthesie



■ Low-flow en gesloten-circuit anesthesie:

- ✓ Toevoer verse gassen < 1 L/min
- ✓ Voordelen
 - « Rebreathing » ⇒ ↓ verbruik anestheticum



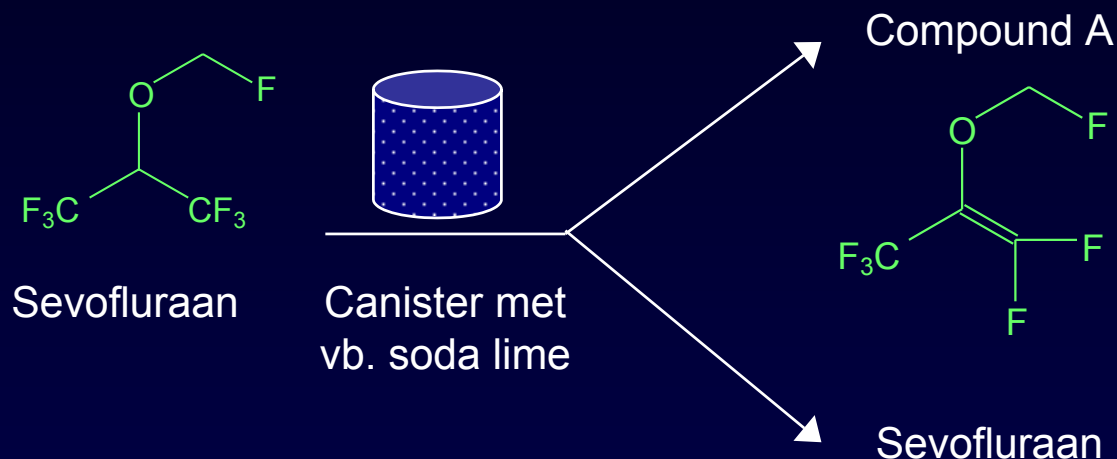
✓ CO₂-absorbens

- Alkalische kalken
- Vb. soda lime: Ca(OH)_2 , H_2O , NaOH , KOH
- Chemische binding van uitgeademde CO_2
- Risico op degradatie van het anestheticum

→ vorming van potentieel toxische afbraakproducten



■ **Compound A:**



✓ **Gekende nefrotoxiciteit** bij ratten

- LD_{50} : 120 -1100 ppm
- Drempelwaarde voor nefrotoxiciteit: 50 -114 ppm

Sevofluraan + low-flow = veilig?



- ✓ **VS:** FDA restrictie voor gebruik < 2 L/min
- ✓ **Europa:** geen restrictie

- ✓ **Compound A debat**

Compound A productie
≠ parameters

- Sevofluraan concentratie
- Vers gas aanvoersnelheid
- Duur van de anesthesie
- Chemische samenstelling absorbens
- Temperatuur absorbens → CO₂ productie
- Watergehalte absorbens

Hoeveel productie ? **Literatuur:** 20 - 40 ppm

Hoe minimaliseren ?

Compound A toxiciteit

Toxiciteitsmechanisme ?
Toxische effecten bij patiënten ?



Overzicht

1. Inleiding en probleemstelling
2. **Doelstelling**
3. Ontwikkeling van de analytische procedure
4. Validatie van de analytische procedure
5. Klinische toepassingen
6. Besluit



Doelstelling

1. Vanuit **anesthesiologisch standpunt**:

Onderzoeken of het gebruik van sevofluraan in de hedendaagse low-flow en gesloten-circuit anesthesie **veilig** is

- ✓ Moderne apparatuur en producten
- ✓ Beperkte tot verwaarloosbare productie van compound A

2. Vanuit **analytisch standpunt**:

Ontwikkelen van een **betrouwbare analytische** methode voor kwantitatieve bepaling van **lage** concentraties compound A in **gasstalen**



Overzicht

1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstelling
3. **Ontwikkeling van de analytische procedure**
 - Ontwikkeling van de compound A bepaling met GC-MS
 - Optimalisatie van de injectie procedure
4. Validatie van de analytische procedure
5. Klinische toepassingen
6. Besluit



Overzicht

1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstelling
3. **Ontwikkeling van de analytische procedure**
 - Ontwikkeling van de compound A bepaling met GC-MS
 - Optimalisatie van de injectie procedure
4. Validatie van de analytische procedure
5. Klinische toepassingen
6. Besluit



Ontwikkeling van de GC-MS methode

- **Vertrekpunt:**

- ✓ Sevofluraan en compound A:

- Vluchtig
- Gasstalen
- Volledige resolutie

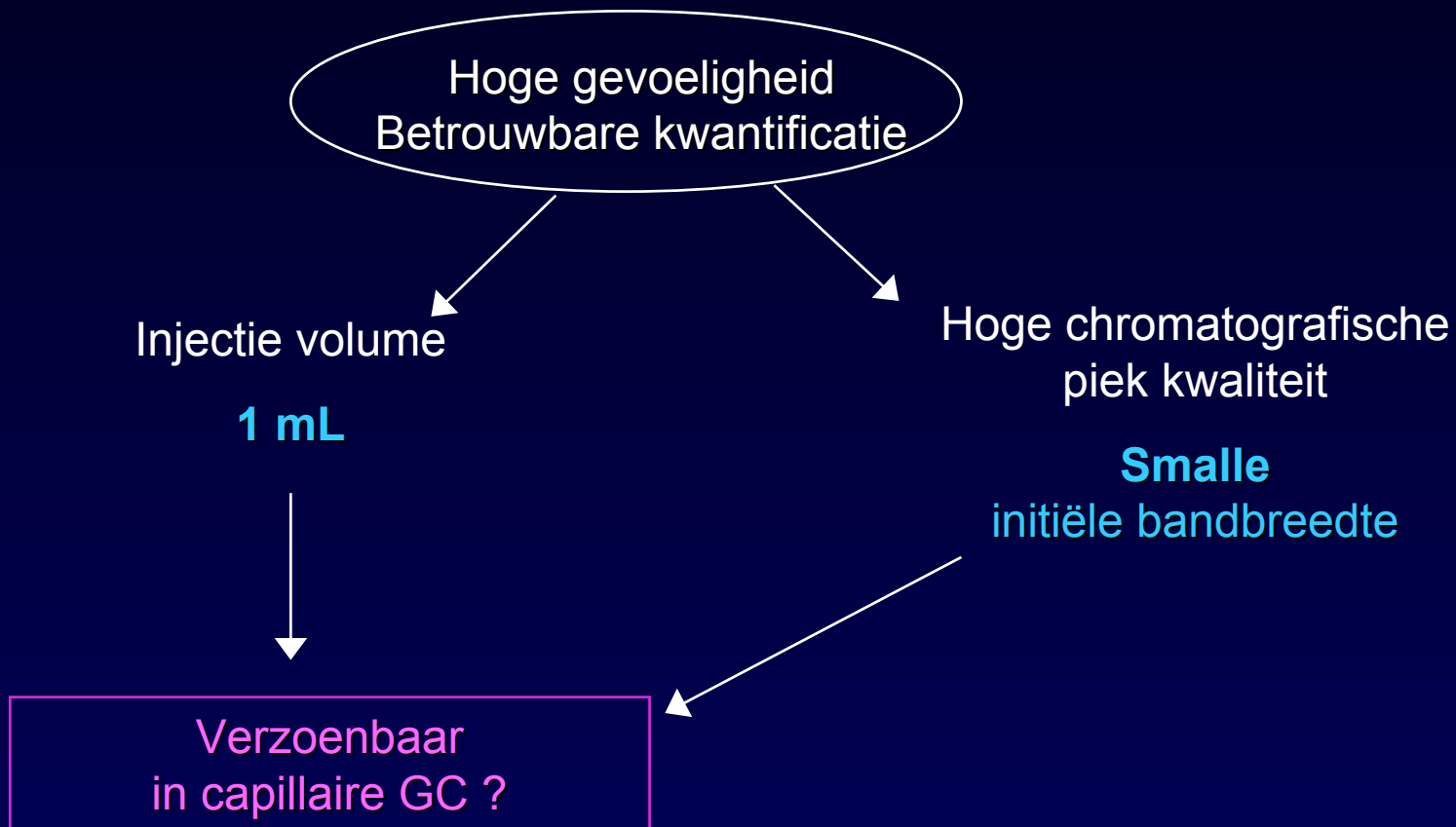
⇒ Capillaire gaschromatografische analyse

- **Analytische uitdaging:**

- ✓ Kwantitatieve analyse van gasstalen
- ✓ Beperkt staalvolume: 1 – 2 mL
- ✓ Gevoeligheid ↑



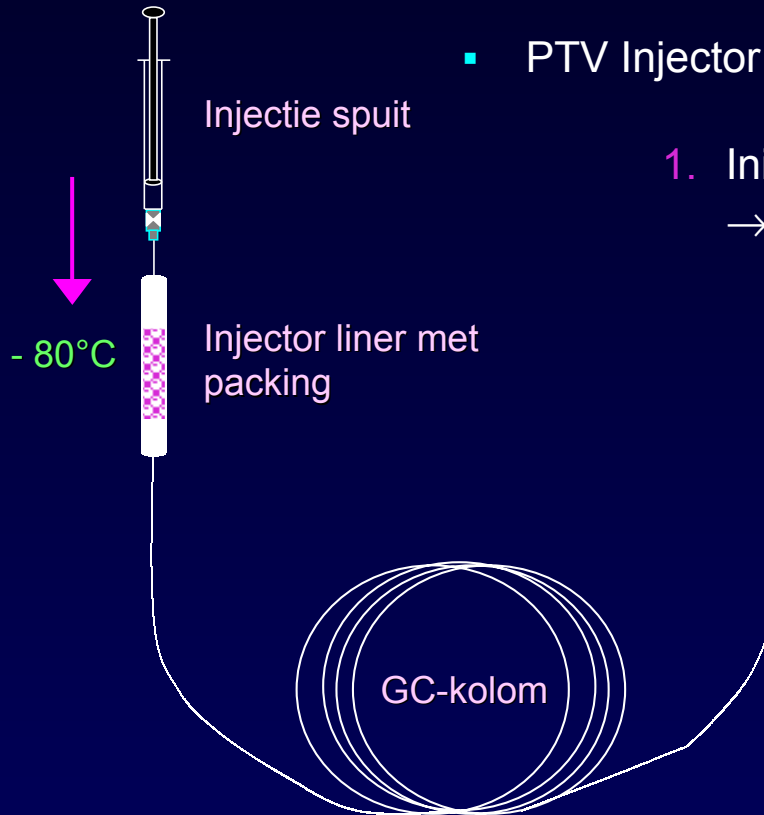
- **Injectie** procedure:



✓ Cryogene condensatie + flash desorptie:

- Geautomatiseerde « headspace » autosampler
- PTV Injector

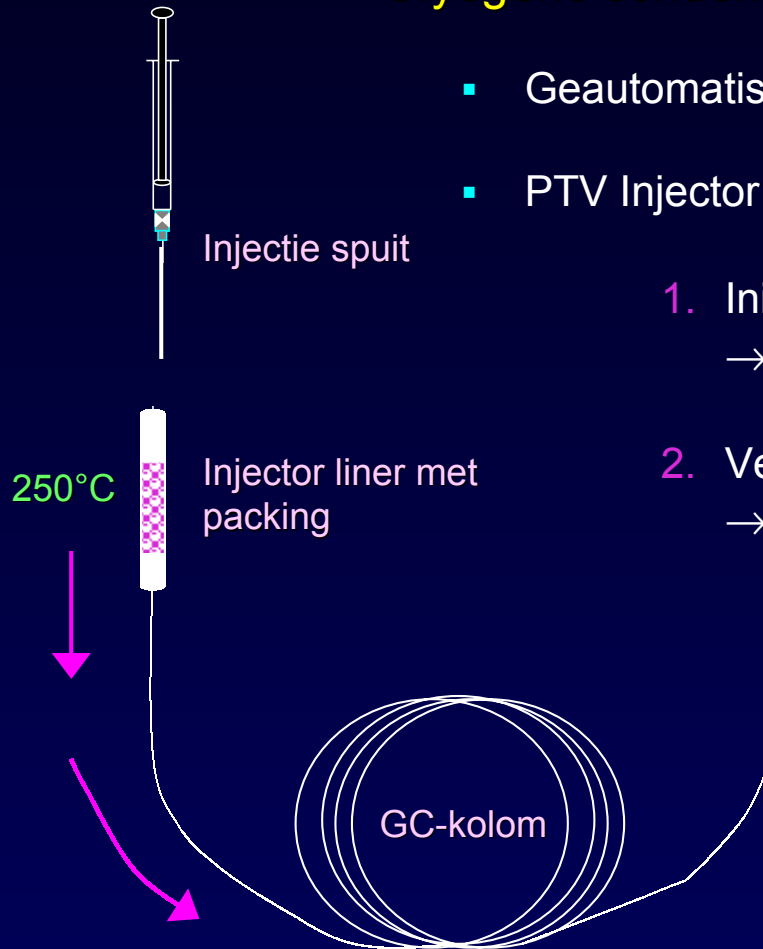
1. Initieel: -80°C (vloeibare N_2)
→ Adsorptie aan packing (Tenax TA) + aanconcentratie



✓ **Cryogene condensatie + flash desorptie:**

- Geautomatiseerde « headspace » autosampler
- PTV Injector

1. Initieel: -80°C (vloeibare N_2)
→ Adsorptie aan packing (Tenax TA) + **aanconcentratie**
2. Vervolgens: $T^{\circ} \uparrow$
→ **Desorptie + transfer** naar de analytische kolom



**Robuuste, geautomatiseerde
injectie procedure**



- **Chromatografie:**

- ✓ Dikke-film kolom: CP Select-624
6% cyanopropylfenyl dimethyl silicone

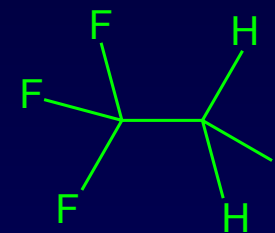
- Retentie van compound A
- Scheiding tussen sevofluraan en compound A
- Goede piekvorm

- **Detectie:** Massaspectrometrische detectie

- **Interne standaardisatie:**

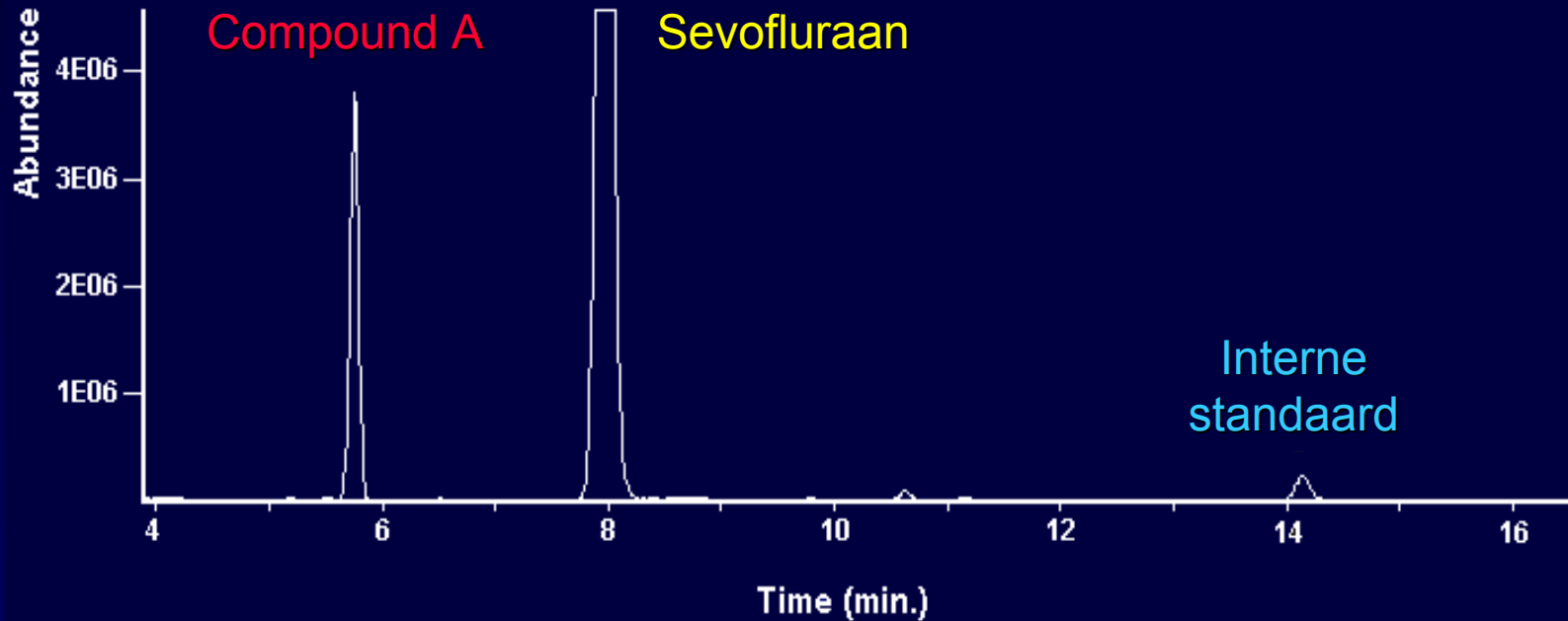
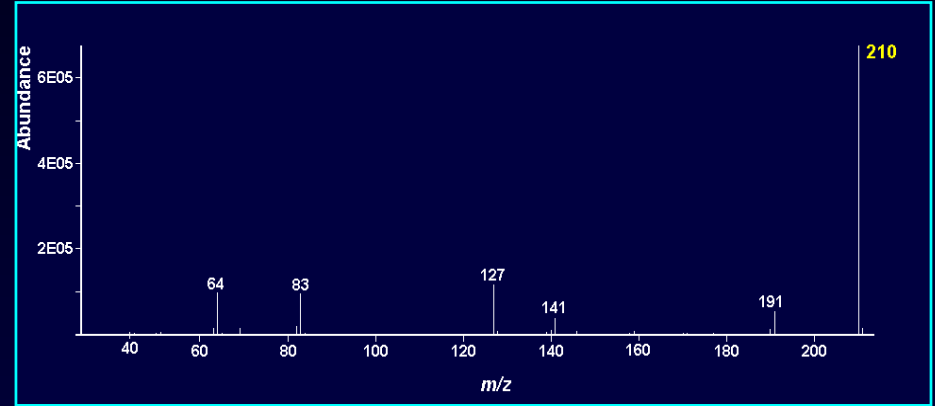
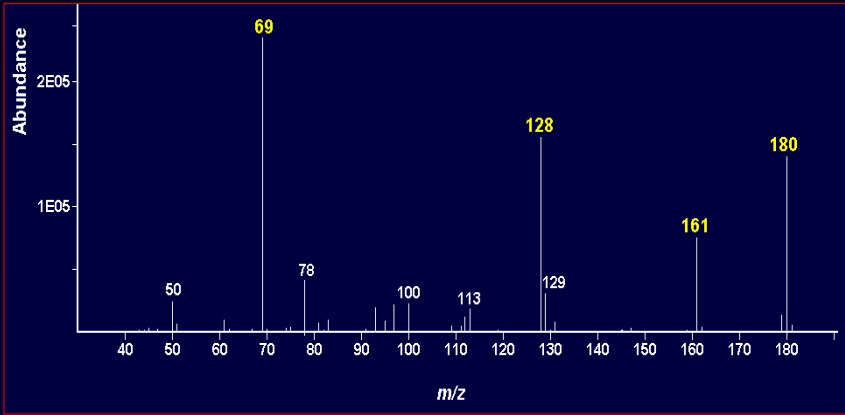
- ✓ Precisie ↑ :

- Variabel vialvolume
- Variabel injectievolume
- Variabele omstandigheden tijdens analyse (t°)



- ✓ 1,1,1-trifluoro-2-iodoethaan





- **Calibratieprocedure:**

- ✓ **Anesthesiestalen:** [sevofluraan] ↑, [compound A] ↓

- Calibratoren:** ≠ [compound A] + = [sevofluraan]

- ✓ **Vlot uitvoerbaar:**

- Reeks calibratoren voor elke analytische run



Statische methode

Vloeibare oplossingen van compound A en sevofluraan



Vloeibare
stockoplossingen

Sevofluraan in EtAc

Compound A in EtAc

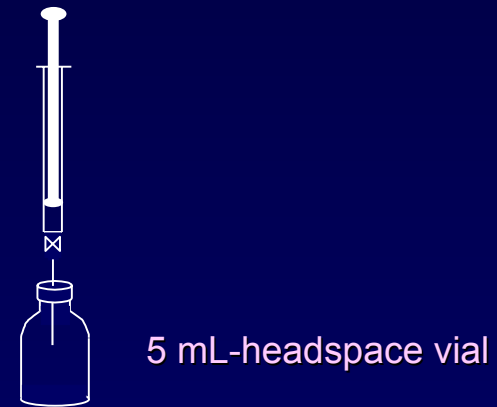
Vloeibare
werkverdueningen

Vloeibare
standaard-
oplossingen

Zero calibrator

Variërende concentraties compound
A in EtAc

Overgang naar de
gasfase



Overzicht

1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstellingen
3. **Ontwikkeling van de analytische procedure**
 - Ontwikkeling van de compound A bepaling met GC-MS
 - Optimalisatie van de injectie procedure
4. Validatie van de analytische procedure
5. Klinische toepassingen
6. Besluit



Optimalisatie van de injectieprocedure

- Geautomatiseerde injectieprocedure:
 - ✓ 20 parameters
 - ✓ Aansturing:
 1. Headspace autosampler
 2. PTV injector
 3. GC
- Optimalisatie ?
 - ✓ Klassieke aanpak: ~~2^{16} experimenten~~
 - ✓ Chemometrische aanpak:

Experimental design



- **Experimental design:** ≠ stappen
 1. Selectie van **parameters** en **experimenteel domein**
 2. Selectie van **responsen**
 3. « **Screening design** »
 - Alle parameters evalueren op 2 niveaus (laag, hoog)
 - Significante parameters identificeren
 4. « **Optimization design** »
 - Finale optimalisatie: evaluatie van significante parameters op meerdere niveaus

Resultaat: optimale injectieparameters
optimale injectie-efficiëntie

→ optimale kwantificatiekwaliteit (piekvorm, piekgrootte)



- Experimental design: ≠ stappen

- Selectie van parameters en experimenteel domein

Parameter	Low	High	Unit
1 Prewarm temperature	30	60	°C
2 Prewarm time	4	20	min
3 Fill speed	1000	10000	µl/min
4 Equilibrium pressurization time	0.2	5	min
5 Injection volume	100	1000	µl
6 Injection speed	1000	10000	µl/min
7 Adsorbent type	Tenax TA	Chromosorb W	
8 Adsorbent quantity	5	30	mg
9 Adsorbent particle size	20/35	80/100	mesh
10 Trap temperature	-110	-30	°C
11 Trap time	0	2	min
12 Trap split	5	20	(ratio)
13 Vent pressure	60	100	kPa
14 Desorption time	0.1	2	min
15 Desorption split	0.1	5	(ratio)
16 Flush split	20	60	(ratio)



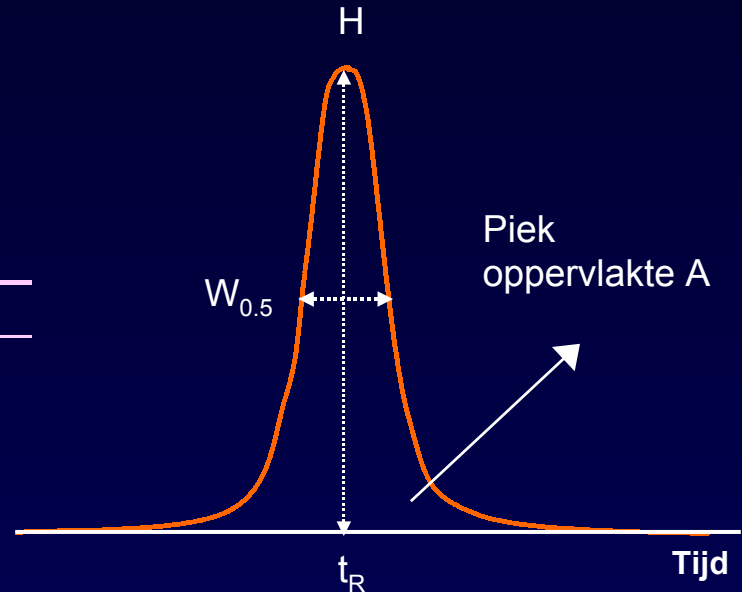
- Experimental design: ≠ stappen

- Selectie van parameters en experimenteel domein
- Selectie van **responsen**

Goede kwantificatie van compound A:

« Ideale piek » voor compound A en IS

Response	Symbol
Area Compound A	A_{CA}
Area Internal Standard	A_{IS}
Peak Height Compound A	H_{CA}
Peak Height Internal Standard	H_{IS}
Peak Width at half height Compound A	$W_{0.5 CA}$
Peak Width at half height Internal Standard	$W_{0.5 IS}$
Peak Shape Compound A	PS_{CA}
Peak Shape Internal Standard	PS_{IS}
Baseline Asymmetry Factor Compound A	$BAsF_{CA}$
Baseline Asymmetry Factor Internal Standard	$BAsF_{IS}$



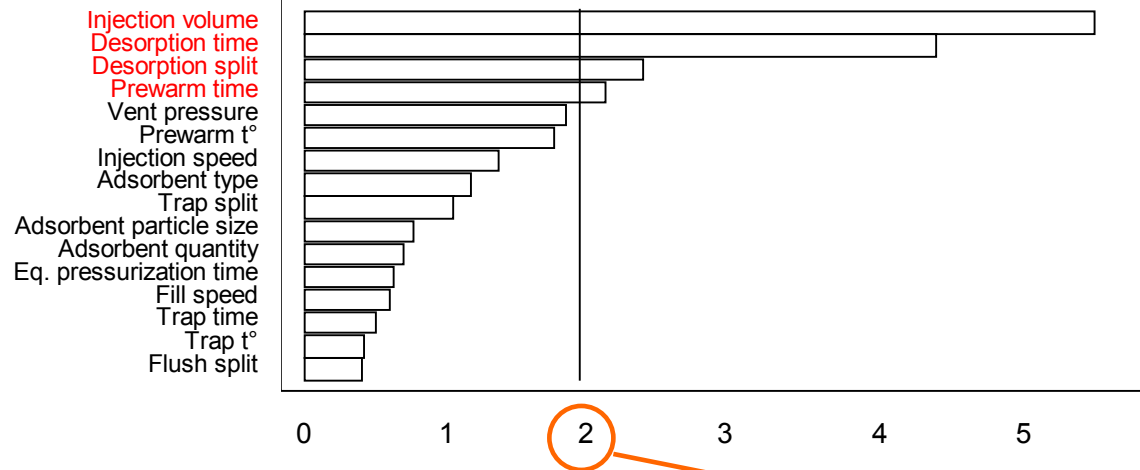
- **Experimental design**: ≠ stappen

1. Selectie van parameters en experimenteel domein
2. Selectie van responsen
3. « **Screening design** »
 - Plackett-Burman design met fold-over
 - 16 parameters: 2 niveaus → (-) en (+), 40 ≠ combinaties
 - 80 experimenten
 - Voor elke respons:
 - Numeriek: ANOVA → $p < 0.05$
 - Grafisch: Pareto chart

⇒ Identificatie van de significante parameters

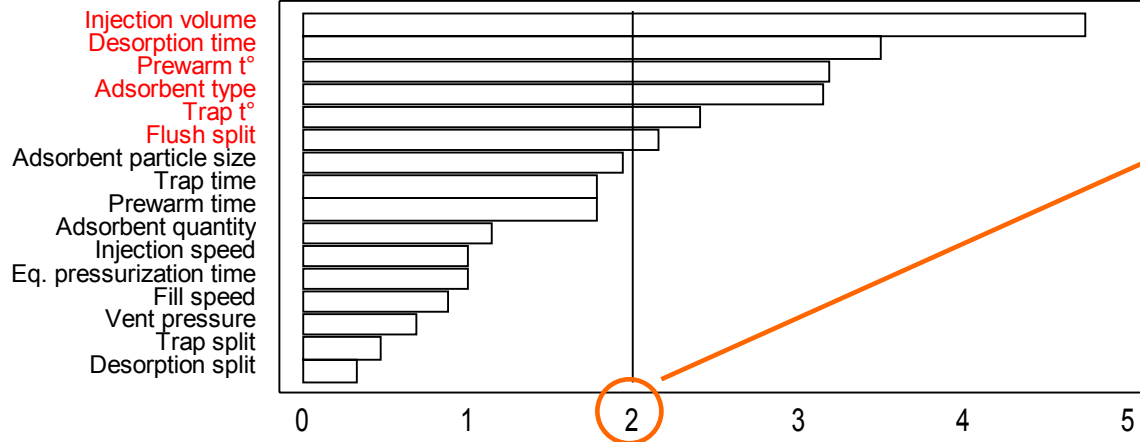


Standardized Pareto Chart A_{CA}



Lengte horizontale balk ~ effect van de parameter op de respons

Standardized Pareto Chart H_{CA}



Grens voor significantie



	A_{CA}	A_{IS}	H_{CA}	H_{IS}	$W_{0.5 CA}$	$W_{0.5 IS}$	PS_{CA}	PS_{IS}	$BAsF_{CA}$	$BAsF_{IS}$
Desired outcome	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1 Prewarm temperature			-							
2 Prewarm time	+									-
3 Fill speed										
4 Equilibrium press. time									-	-
5 Injection volume	+	+	+	+	-	-				
6 Injection speed										
7 Adsorbent type			-		-	-	-	-	-	
8 Adsorbent quantity				+						
9 Adsorbent particle size										
10 Trap temperature			+	+						-
11 Trap time										
12 Trap split				+						
13 Vent pressure							+	+		
14 Desorption time	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15 Desorption split	-	-			+	+	+	+		+
16 Flush split			-	-						



	A_{CA}	A_{IS}	H_{CA}	H_{IS}	$W_{0.5 CA}$	$W_{0.5 IS}$	PS_{CA}	PS_{IS}	$BAsF_{CA}$	$BAsF_{IS}$
Desired outcome	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1 Prewarm temperature			-							
2 Prewarm time	+									-
3 Fill speed										
4 Equilibrium press. time									-	-
5 Injection volume	+	+	+	+	-	-				
6 Injection speed										
7 Adsorbent type			-		-	-	-	-	-	
8 Adsorbent quantity				+						
9 Adsorbent particle size										
10 Trap temperature			+	+						-
11 Trap time										
12 Trap split				+						
13 Vent pressure							+	+		
14 Desorption time	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15 Desorption split	-	-			+	+	+	+		+
16 Flush split			-	-						

⇒ 4 parameters niet significant
12 parameters significant



	A_{CA}	A_{IS}	H_{CA}	H_{IS}	$W_{0.5 CA}$	$W_{0.5 IS}$	PS_{CA}	PS_{IS}	$BAsF_{CA}$	$BAsF_{IS}$
Desired outcome	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1 Prewarm temperature			-							
2 Prewarm time	+									-
3 Fill speed										
4 Equilibrium press. time									-	-
5 Injection volume	+	+	+	+	-	-				
6 Injection speed										
7 Adsorbent type			-		-	-	-	-	-	
8 Adsorbent quantity				+						
9 Adsorbent particle size										
10 Trap temperature			+	+						-
11 Trap time										
12 Trap split				+						
13 Vent pressure							+	+		
14 Desorption time	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15 Desorption split	-	-			+	+	+	+		+
16 Flush split			-	-						

⇒ 8 parameters: « best result » waarde



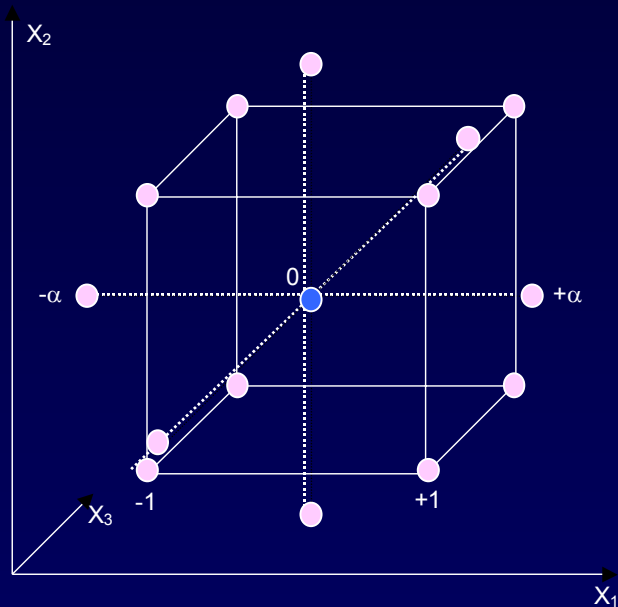
		A _{CA}	A _{IS}	H _{CA}	H _{IS}	W _{0.5 CA}	W _{0.5 IS}	PS _{CA}	PS _{IS}	BAsF _{CA}	BAsF _{IS}
Desired outcome		↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1	Prewarm temperature			-							
2	Prewarm time	+									-
3	Fill speed										
4	Equilibrium press. time									-	-
5	Injection volume	+	+	+	+	-	-				
6	Injection speed										
7	Adsorbent type			-		-	-	-	-	-	
8	Adsorbent quantity				+						
9	Adsorbent particle size										
10	Trap temperature			+	+						-
11	Trap time										
12	Trap split				+						
13	Vent pressure							+	+		
14	Desorption time	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15	Desorption split	-	-			+	+	+	+		+
16	Flush split			-	-						

⇒ 4 parameters: verder te optimaliseren



- **Experimental design**: ≠ stappen

1. Selectie van parameters en experimenteel domein
2. Selectie van responsen
3. « Screening design »
4. « **Optimization design** »



- Central composite design
- 4 parameters: 5 niveaus
- 54 experimenten
- Voor elke respons:

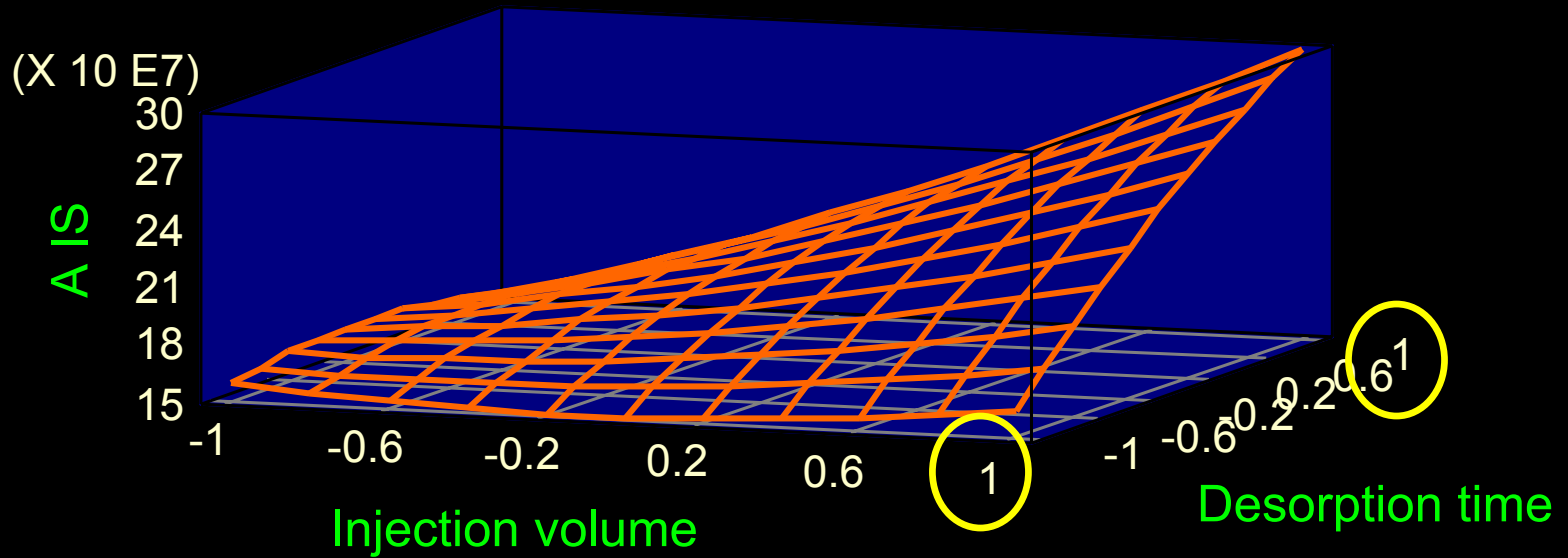
Significante parameters en interacties

- Numeriek: ANOVA $\rightarrow p < 0.05$
- Grafisch: pareto + respons oppervlak

⇒ Bepalen van de optimale waarde voor de 4 significante parameters



Estimated Response Surface



- ✓ **Voor elke respons**: # geassocieerde respons oppervlakken
- ✓ Optimale waarden **voor alle responsen samen**:

⇒ Gewogen optimalisatie functie

Injection parameter	Value	Injection parameter	Value
1 Prewarm temperature	30 °C	11 Trap time	0.3 min
2 Prewarm time	10 min	12 Trap split	5:1 (ratio)
3 Fill speed	5000 µl/min	13 Vent pressure	100 kPa
4 Equilibrium pressurization time	0.2 min	14 Desorption time	2 min
5 Injection volume	1000 µl	15 Desorption split	0.7:1 (ratio)
6 Injection speed	5000 µl/min	16 Flush split	20:1 (ratio)
7 Adsorbent type	Tenax TA	17 Depth of injection	20 mm
8 Adsorbent quantity	Full liner	18 Fill volume	1000 µl
9 Adsorbent particle size	20/35 mesh	19 Syringe temperature	39 °C
10 Trap temperature	-30°C	20 Desorption temperature	250 °C



Overzicht

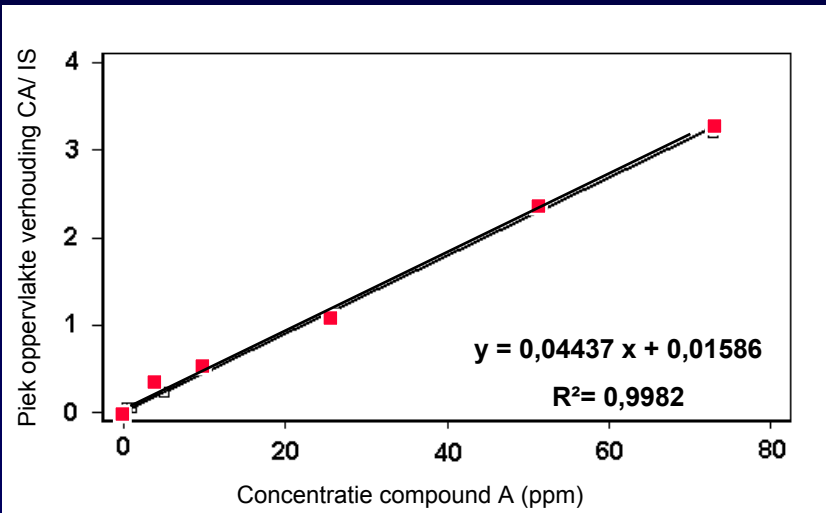
1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstellingen
3. Ontwikkeling van de analytische procedure
4. **Validatie** van de **analytische procedure**
5. Klinische toepassingen
6. Besluit



Validatie

- Lineariteit:

- ✓ **Range:** 0 - 75 ppm toegevoegd compound A
- ✓ Gewogen lineaire regressie: $1/y$



$n = 10$	R^2	Slope	Intercept
mean	0.996	0.048	0.018
SD	0.003	0.003	0.003
CV (%)	0.3	6.9	16.2



■ Selectiviteit:

✓ Interferentietesten:

- Inhalatie anesthetica
- Gassen, vluchtige verbindingen en solventen

■ Andere validatieparameters:

Validation parameter	Concentration added (ppm or $\mu\text{L/L}$ air)		
	0.5	10	75
Precision (CV, %)			
within-day ($n = 6$)	9.6	9.9	5.7
total ($n = 10$)	10.0	7.1	4.1
Accuracy (recovery, %)			
mean	101.16	101.27	99.00
SD	10.09	6.57	4.10
CV (%)	9.97	6.49	4.14
LOD (ppm)	0.1		
LOQ (ppm)	0.3		



Overzicht

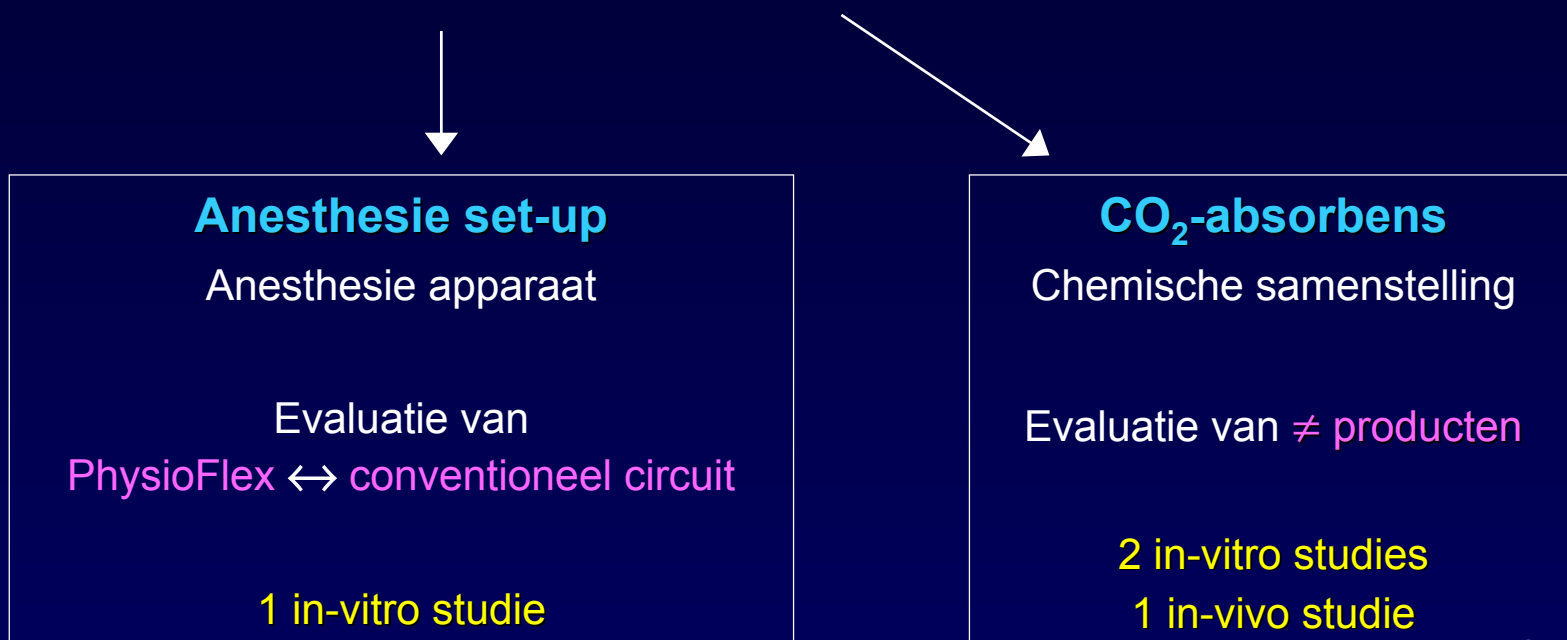
1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstellingen
3. Ontwikkeling van de analytische procedure
4. Validatie van de analytische procedure
- 5. Klinische toepassingen**
6. Besluit



Klinische toepassingen

- Compound A productie:

- ✓ Welke omstandigheden ?
- ✓ Minimaliseren ?

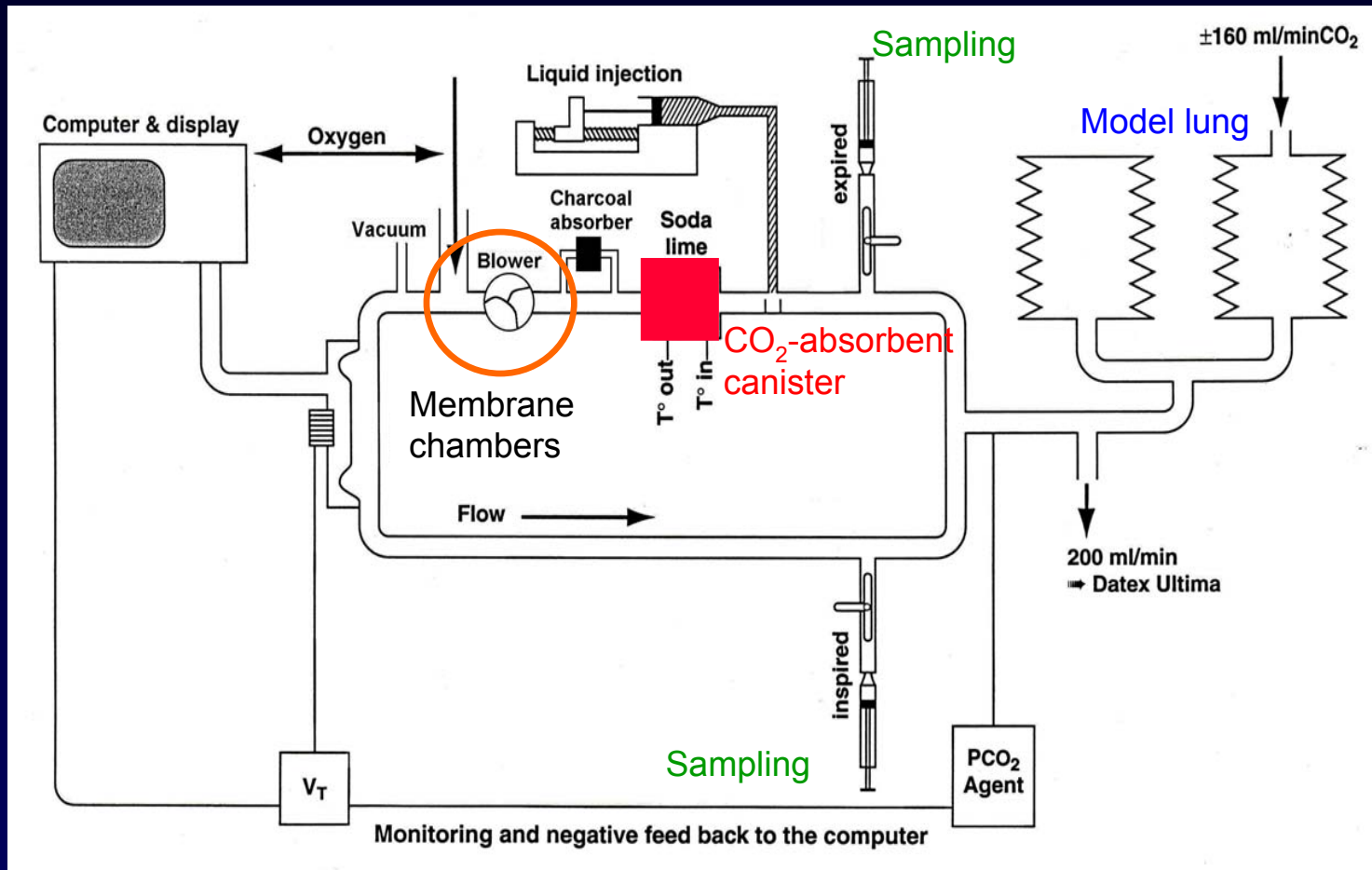


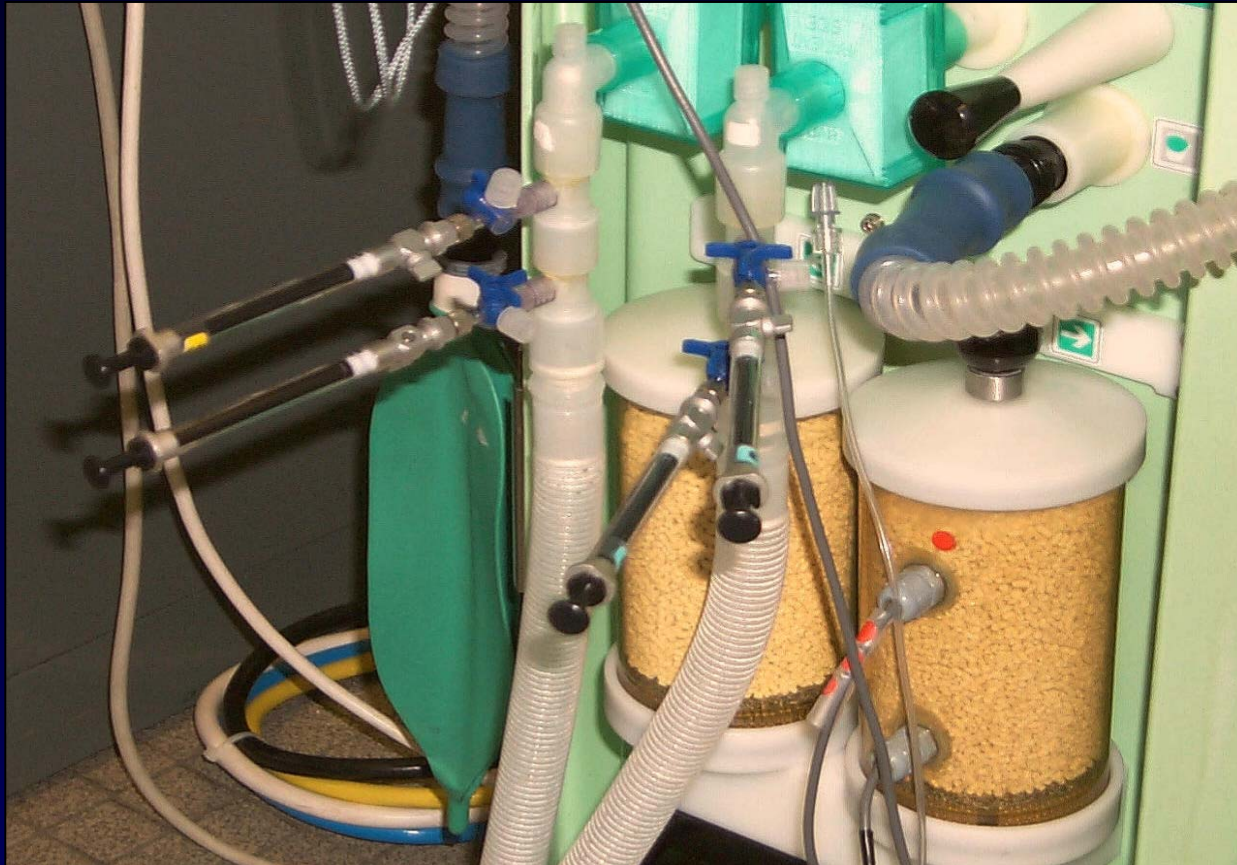
Evaluatie van de anesthesie set-up

- Studieprotocol:
 - ✓ In-vitro **gesloten-circuit** anesthesie
 - ✓ Gebruik van:
 - 1. **PhysioFlex (A)**
 - 2. **Conventioneel gesloten-circuit (B)**soda lime
 - ✓ Sevoflurane_{insp}: **2.2 %**
 - ✓ Duur: **120 min**
 - ✓ **Gasstalen (2 mL)** voor bepaling van [compound A]
 - Inspiratoir + expiratoir
 - Voor, op 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 en 120 min en na
- **Doel:** $[\text{compound A}]_A < [\text{compound A}]_B$

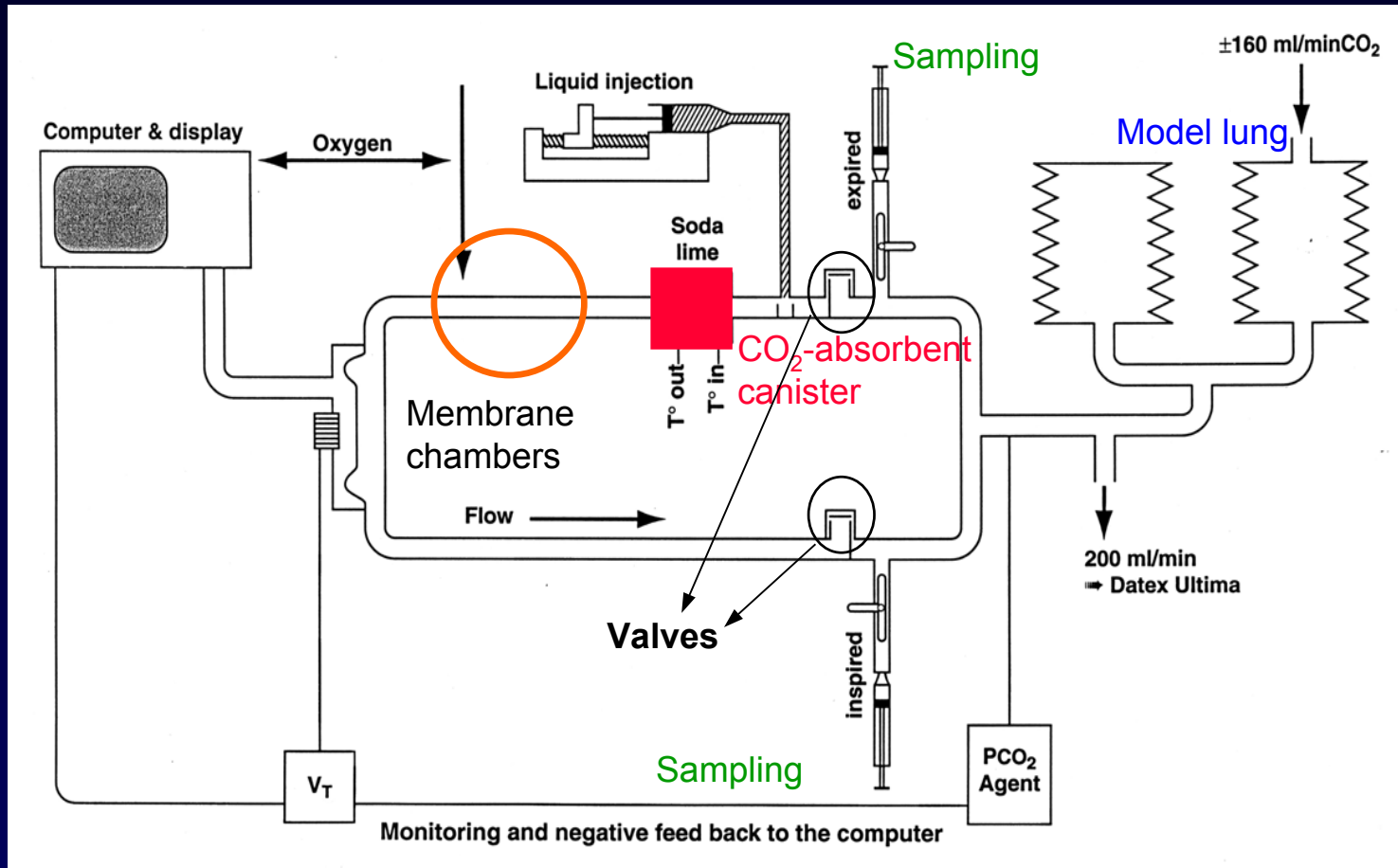


PhysioFlex (A)



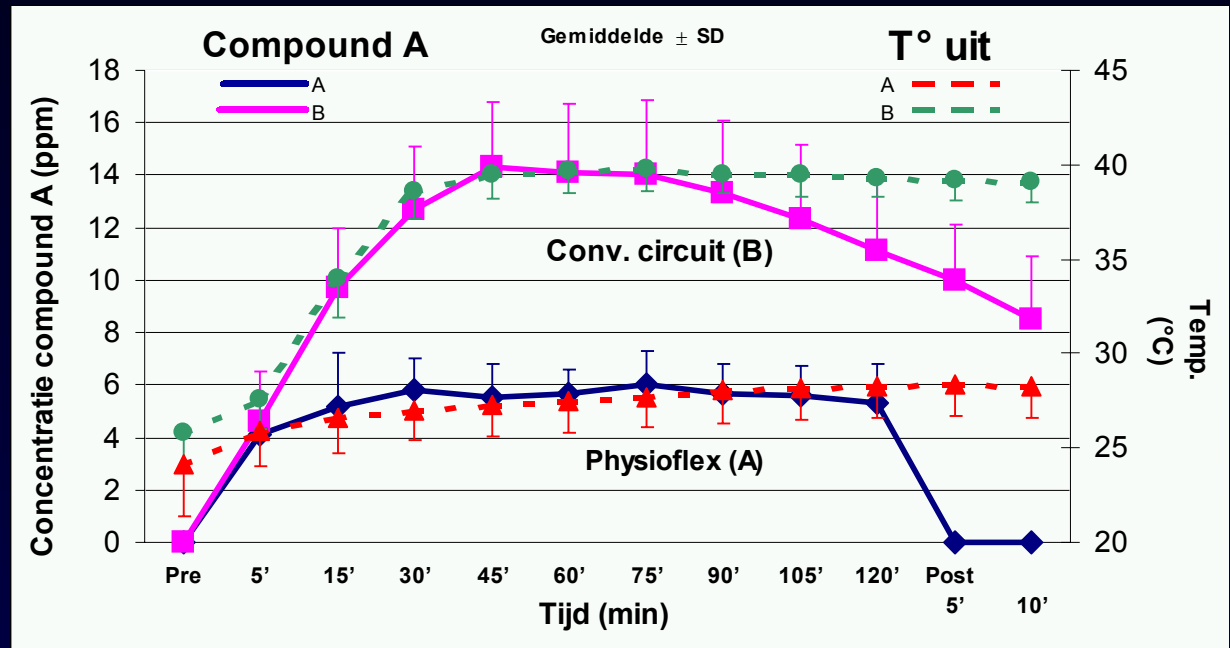


Conventioneel gesloten circuit (B)



■ Resultaten:

[compound A]_{PhysioFlex}
 < [compound A]_{Conv. circuit}



✓ Hypothese:

PhysioFlex (A)

↓

Blower 70 L/min

t° CO₂-absorbens ↓

Warmte dissipatie

↓

Vorming compound A ↓

Conventioneel gesloten-circuit (B)

↓

Geen blower

t° CO₂-absorbens ↑

↓

Vorming compound A ↑



Evaluatie van CO₂-absorbentia

■ Studieprotocol:

- ✓ In-vitro **gesloten-circuit** anesthesie
- ✓ Gebruik van: Conventioneel gesloten-circuit (**B**)
4 ≠absorbentia: **soda lime** ↔ **Sofnolime**
Amsorb
LiOH
- ✓ Sevoflurane_{insp}: **2.2 %**
- ✓ Duur: **240 min**
- ✓ **Gasstalen (2 mL)** voor bepaling van [compound A]

■ **Doel:** Chemische samenstelling absorbens ~ [compound A]_{circuit}

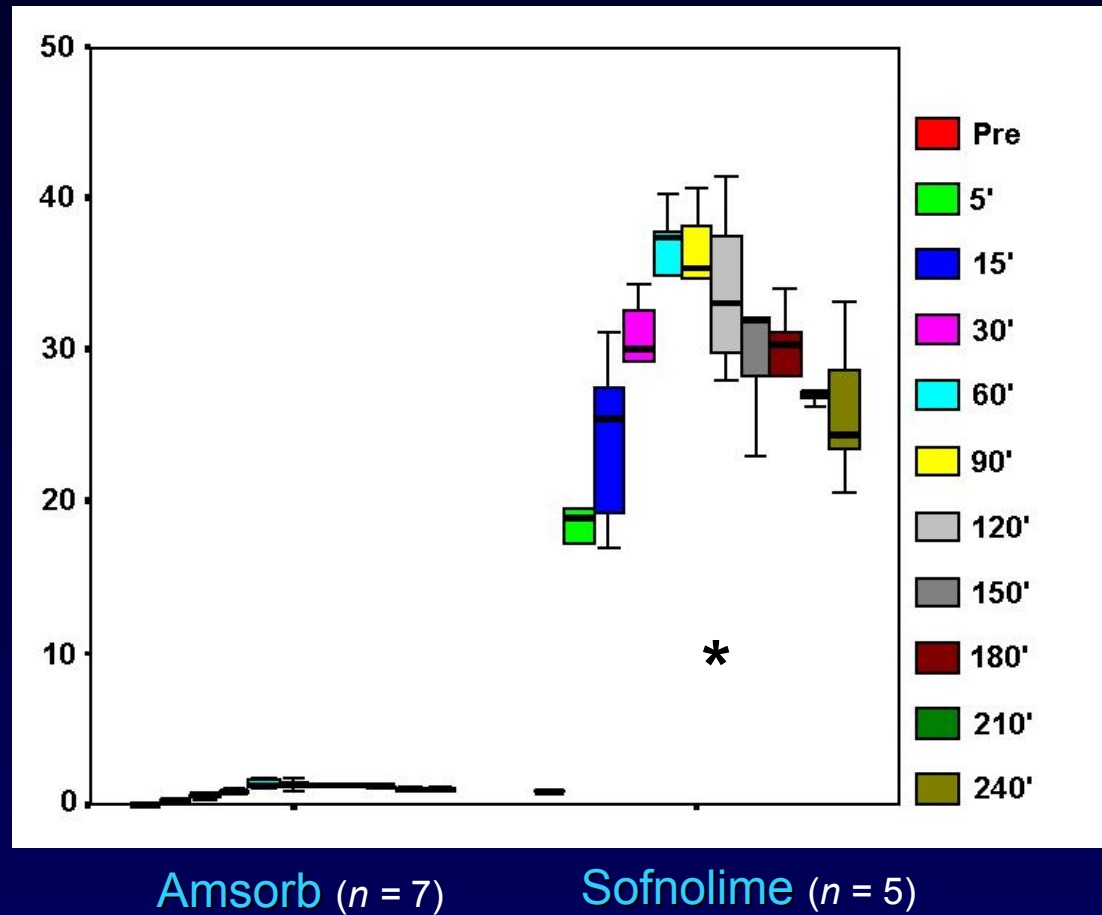


NaOH, KOH



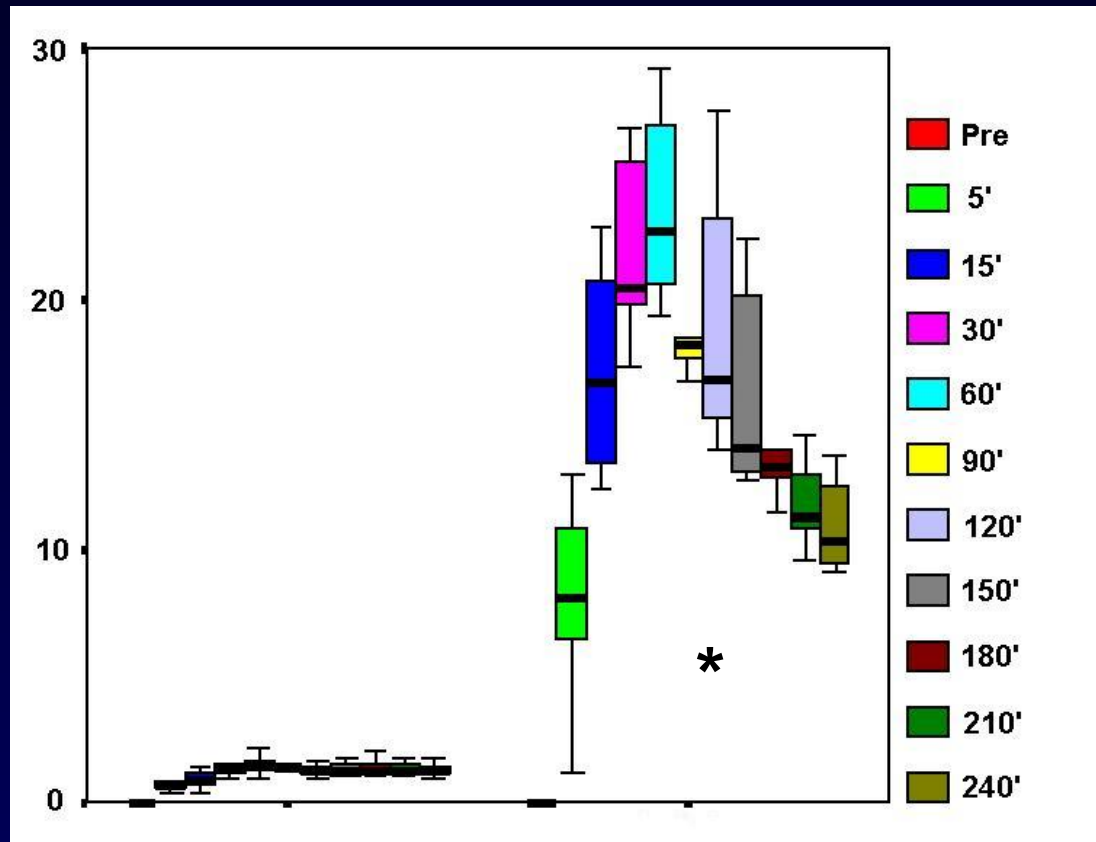
■ Resultaten:

Compound A
inspiratoire
concentratie
(ppm)



■ Resultaten:

Compound A
inspiratoire
concentratie
(ppm)



* $p < 0.05$

LiOH (n = 7)

Soda lime (n = 6)



Resultaten:

- ✓ NaOH, KOH ~ compound A vorming

Sodalime: NaOH + KOH
Sofnolime: NaOH, KOH-vrij



[Compound A]_{insp}
10 – 37 ppm

Amsorb: Ca(OH)₂ + CaCl₂
LiOH



Bijna GEEN compound A
vorming

✓ Besluit:

- ALLEEN NaOH- en KOH-vrije absorptia
→ verwaarloosbare productie van compound A
- Amsorb = beste keuze



Overzicht

1. Inleiding en probleemstelling
2. Doelstellingen
3. Ontwikkeling van de analytische procedure
4. Validatie van de analytische procedure
5. Klinische toepassingen
6. **Besluit**



Besluit

- **Ontwikkelde bepalingmethode = bruikbaar** in klinische praktijk
 - ✓ Betrouwbaar
 - ✓ Voldoende gevoelig
 - ✓ « Analytisch gereedschap »

- Gebruik van sevofluraan in **low-flow** en **gesloten-circuit** anesthesie = veilig
 - ✓ Moderne apparatuur: *vb.* PhysioFlex
 - ✓ Nieuwe, recent ontwikkelde CO₂-absorbentia: *vb.* Amsorb, Superia,...

~~Compound A
debat~~



Dank aan...

- F.W.O.-Vlaanderen
- Dienst Anesthesiologie U.Z. Gent
- Em. Prof. Dr. Rolly

