

Razvoj i validacija GC-MS metode za određivanje utjecaja uređaja izvantjelesne membranske oksigenacije (ECMO) na promjenu koncentracije rokuronijeva bromida u plazmi

Smirčić, Anamarija; Lovrinov, Tanja; Jovanović, Željko

Source / Izvornik: **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2022, 58, 271 - 282**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

https://doi.org/10.21860/medflum2022_281001

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:109974>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Health Studies - FHSRI Repository](#)



Razvoj i validacija GC-MS metode za određivanje utjecaja uređaja izvantjelesne membranske oksigenacije (ECMO) na promjenu koncentracije rocuronijeva bromida u plazmi

Development and validation of the GC-MS method for determining the influence of extraorporeal membrane oxygenation (ECMO) devices on changes in plasma rocuronium bromide concentration

Anamarija Smirčić¹, Tanja Lovrinov², Željko Jovanović^{3,4*}

Sažetak. Cilj: Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS) osjetljiva je i selektivna metoda s potencijalom za standardno određivanje rocuronijeva bromida u plazmi. Primjenom u postupcima izvantjelesne membranske oksigenacije (engl. *Extracorporeal Membrane Oxygenation*; ECMO) možemo utvrditi utjecaj na koncentracije lijekova. Ciljevi rada bili su ispitati primjerenost GC-MS metode za određivanje rocuronijeva bromida u plazmi te usporediti njegove venske i arterijske koncentracije kod pacijenata s ECMO potporom. **Materijali i metode:** Korištene su standardne otopine različitih omjera, plazma te otopina rocuronijeva bromida (Esmeron, 10 mg/ml, N. V. Organon, Nizozemska), etanol, diklormetan, natrijev dihidrogenfosfat, kalijev jodid, voda, aceton. GC-MS metoda provedena je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo PGŽ-a, a klinički dio na pet slučajno odabranih pacijenata liječenih ECMO potporom u KBC-u Rijeka. **Rezultati:** Dobiveni su validacijom: GD 0,553 µg/ml, GK (potvrđen) 5 µg/ml, preciznost RSD = 2,083 % (RSD ≤ 10 %), intermedijarna preciznost RSD = 3,05 % (RSD ≤ 10 %), točnost 98,9 % (90 – 110 %), koeficijent korelacije $r = 0,9961$ ($r \geq 0,995$), selektivnost metode – RT = 23,25 min, m/z = 413. Klinička vrijednost metode potvrđena je mjerenjem koncentracija rocuronijeva bromida kod pacijenata s ECMO potporom. Sve vrijednosti bile su više u venskom nego u arterijskom uzorku u svim mjerenjima. **Zaključci:** Validacijom GC-MS metode potvrđeno je kako se validacijski parametri nalaze u kriteriju prihvatljivosti te je metoda primjenjiva za određivanje rocuronijeva bromida u plazmi. ECMO potpora smanjuje razinu lijeka u arterijskom uzorku, ali zbog malog broja uzoraka i velike varijabilnosti u koncentraciji nije postignuta statistički značajna razlika.

Ključne riječi: izvantjelesna membranska oksigenacija; plinska kromatografija; rocuronijev bromid

Abstract. Objective: Gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) is a sensitive and selective method with the potential for standard determination of rocuronium bromide in plasma. The use of Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) can be used to determine the effect on drug concentrations. The aim of the study was to examine the suitability of the GC-MS method for the determination of rocuronium bromide in plasma and to compare its venous and arterial concentrations in patients with ECMO support. **Materials and methods:** Standard solutions of different ratios, plasma and rocuronium bromide solution (Esmeron, 10 mg/ml, N.V. Organon, The Netherlands), ethanol, dichloromethane, sodium dihydrogen phosphate, potassium iodide, water, acetone were used. GC-MS was performed in the Teaching Institute for Public Health Rijeka, and the clinical part on five randomly selected patients treated with ECMO support in University hospital of Rijeka. **Results:** obtained by validation are: GD 0.553 µg/ml, GK (confirmed) 5 µg/ml, accuracy RSD = 2.083% (RSD ≤ 10%),

¹ Dom zdravlja Primorsko-goranske županije, Rijeka, Hrvatska

² Specijalna bolnica Medico, Rijeka, Hrvatska

³ Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Osijek, Hrvatska

⁴ Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija, Katedra za temeljne medicinske znanosti, Rijeka, Hrvatska

*Dopisni autor:

Prof. dr. sc. Željko Jovanović, dr. med.
Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija, Katedra za temeljne medicinske znanosti
Viktora Cara Emina 5, 51000 Rijeka, Hrvatska
E-mail: zeljko.jovanovic@uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

intermediate accuracy RSD = 3.05% (RSD ≤ 10%), accuracy 98.9% (90 – 110%), correlation coefficient $k = 0.9961$ ($r \geq 0.995$), selectivity of the method – RT = 23.25 min, $m/z = 413$. The clinical value of the method was confirmed by measuring the concentrations of rocuronium bromide in patients with ECMO support. Rocuronium bromide values were higher in the venous than in the arterial sample in all measurements.

Conclusions: Validation of the GC-MS method confirmed that all performed validation parameters are in the acceptance criterion and the method is applicable for the determination of rocuronium bromide. ECMO support reduces the drug level in the arterial sample, but due to the small number of samples and high variability in concentration, no statistically significant difference was achieved.

Keywords: chromatography, gas; extracorporeal membrane oxygenation; rocuronium

GC-MS je zbog svoje selektivnosti i osjetljivosti primjerena, pouzdana i u praksi primjenjiva analitička metoda za određivanje rocuronijeva bromida u plazmi, što je važno za pacijente i pravilno doziranje lijeka, a koristi se i kao indikator eliminacije lijeka iz organizma jer može detektirati vrlo niske vrijednosti kada istraživani analit pokazuje visok stupanj eliminacije.

UVOD

Izvantjelesna membranska oksigenacija (engl. *Extracorporeal Membrane Oxygenation*; ECMO) postupak je izvantjelesne mehaničke cirkulacijske ili respiracijske potpore koji se primjenjuje primarno u bolesnika sa životno ugrožavajućim oblicima zatajavanja rada srca ili pluća. ECMO je invazivan i tehnički složen postupak koji se obavlja u kritično bolesnih pa stoga nosi visok rizik od pojave komplikacija¹⁻³. Poseban je oprez potreban zbog nastajanja krvnih ugrušaka i krvarenja. Uočen je i utjecaj ECMO uređaja na biodostupnost lijekova koji se koriste u terapiji te je potreban dodatni oprez kod doziranja i sigurna analitička metoda za određivanje koncentracija lijekova u plazmi⁴. Jedan od lijekova koji primaju pacijenti na ECMO potpori jest rocuronijev bromid, koji se ubraja u mišićne relaksatore srednje dugog djelovanja. Često se koristi u pedijatrijskoj populaciji, i to upravo zbog svojeg srednje dugog djelovanja, ali i minimalne rezidualne paralize te bržeg početka djelovanja nego u odraslih⁵⁻⁷. Kod primjene rocuronijeva bromida u populaciji pretilih osoba, zbog njihove veće tjelesne mase, doziranje bi se trebalo temeljiti na izra-

čunu količine lijeka koja je 20 % veća od izračuna za suhu tjelesnu masu osobe iste visine i spola, a ne za ukupnu tjelesnu masu osobe⁸⁻¹⁰. Zbog svega navedenog od iznimne je važnosti razviti analitičku metodu kojom se može odrediti njegova koncentracija u biološkim uzorcima s ciljem postizanja optimalne doze. GC-MS je metoda koja bi mogla biti opravdana i primjerena za određivanje koncentracije rocuronijeva bromida u plazmi. Neka područja dijagnostike GC-MS metodu koriste kao primarnu metodu identifikacije i kvantifikacije analita u uzorku, a neka područja kao potvrđnu metodu drugih dijagnostičkih testova¹¹⁻¹³. Proces razvitka GC-MS metode za primjenu na kliničkim uzorcima plazme preduvjet je sigurne terapije. Također, kako bi se osigurala pouzdanost mjerenja, sve novorazvijene metode potrebno je validirati^{1, 2, 14}. Validacijom metode potvrđujemo valjanost metode i osiguravamo povjerenje u točnost rezultata ispitivanja. Kao dokazi validnosti neke metode koriste se parametri validacije, i to linearnost, preciznost (ponovljivost), granica detekcije i granica kvantifikacije¹⁴. Postupak validacije omogućuje uvođenje GC-MS metode u rutinska dokazivanja lijeka u uzorcima i njezinu kliničku primjenu^{2, 15-17}. Stoga su ciljevi ovog rada bili ispitati primjerenost GC-MS metode za određivanje rocuronijeva bromida u plazmi, utvrditi specifičnost/selektivnost, osjetljivost, linearnost, radno područje, točnost i preciznost metode te nakon razvoja i validiranja metode odrediti koncentraciju rocuronijeva bromida u venskom i arterijskom uzorku kod pacijenata s ECMO potporom i provjeriti smanjuje li ECMO sustav značajno koncentraciju rocuronijeva bromida u arterijskom uzorku^{1, 2}.

MATERIJALI I METODE

Razvoj analitičke metode i validacija metode provedeni su kroz pripremu standarda, temeljne standardne otopine, pripremu uzorka te primjenu postavki plinskog GC-MS-a kao metode detekcije analita u uzorku. Kemikalije koje su korištene u radu su i. v. otopina rocuronijeva bromida (Esmeron, 10 mg/ml, otopina za injekciju/infuziju – lijek, N. V. Organon, Nizozemska), etanol, diklormetan, natrijev dihidrogenfosfat, kalijev jodid, voda i aceton. Temeljnu standardnu otopinu činila je intravenska otopina rocuronijeva bromi-

da (10 mg/ml). Radna standardna otopina sastojala se od prethodno navedene temeljne standardne otopine razrijeđene s etanolom i vodom u omjeru 20 : 1. Tako pripremljene otopine korištene su za procjenu linearnosti i kalibracijski pravac kako bi se dobilo šest kalibracijskih točaka te se svaku ponovilo tri puta. Izuzevši vodu iz otopine, pH mora biti oko 5,5 zbog stabilnosti rokuronijeva bromida tijekom rada. Uzorak za izradu studije bila je radna standardna otopina s različitim koncentracijama rokuronijeva bromida te plazma bez lijeka. Plazma je dobivena tako da se uzorak pune krvi autora istraživanja izvadio u epruvetu od 5 ml s antikoagulansom (litijev heparin). Takvu epruvetu centrifugira se na 3000 g tijekom 10 minuta unutar 30 minuta od vađenja. Ako se uzorak ne upotrijebi odmah, mora se zakiseliti s 1 M natrijeva dihidrogenfosfata, i to u omjeru 200 µl na 1 ml plazme te pohraniti na temperaturi od 20 °C. Metoda koja se koristila za određivanje rokuronijeva bromida i čija je validacija provedena, jest GC-MS kao metoda kvantifikacije lijeka. Kako se GC sastoji od mobilne i stacionarne faze, obje treba prethodno pripremiti. Mobilna faza u GC-u je inertni plin koji je nositelj uzorka, a to je helij. Stacionarnu fazu čini kolona kroz koju uzorak nošen mobilnom fazom putuje do detektora te je to u ovom slučaju bio maseni spektrometar. Uzorak koji je prethodno zaleđen otapa se na sobnoj temperaturi. 1 ml plazme zakiseli se s 0,2 ml 1 M natrijeva dihidrogenfosfata i 1,5 ml kalijeva jodida te 7 ml diklormetana kako bi se provela ekstrakcija uzorka. Slijedi 30 minuta ekstrakcije na mješalici, nakon čega se uzorak centrifugira na 3000 g tijekom 15 minuta. Gornju fazu u kojoj se nalazi diklormetan prebaci se u staklenu tubu. U tom sloju nalazi se ekstrahirani rokuronijev bromid koji se ukoncentrira u rotavaporu kako bi otapalo isparilo i uzorak koncentrirao. Tako ukoncentrirani uzorak otapa se u 50 µl acetona te se 2 µl tako dobivenog uzorka injektira u uređaj GC-MS-a putem injektora. Uređaj na kojem se radila analiza je GC-MS s određenim postavkama. Temperatura injektora prilikom uzimanja uzorka iznosi 280 °C te je vrijeme uzorkovanja 30 sekundi. Uzorak je nošen inertnim plinom (helij) protokom od 46 cm/s. Kolona koja se nalazi u uređaju je RTX 5MS (30 m * 0,25 mm, film 0,25 µm), protoka 1 ml

kroz minutu. Tlak kolone iznosi 26 kPa tijekom 5 minuta te za svaku minutu duže raste 6 kPa do vršne granice od 69 kPa. Pećnica grije kolonu kako bi se uzorak mogao razdvojiti na fragmente, a temperatura pećnice na početku iznosi 120 °C tijekom 5 minuta, zatim se pećnica svake minute zagrijava 30 °C više da bi na kraju postigla temperaturu od 300 °C i takvu zadržala 10 minuta. Nakon razdvajanja uzorka na fragmente u GC-u, slijedi detekcija uzorka MS-om. Energija ionizacije iznosi 70 eV te služi kako bi se uzorak podijeljen na fragmente ionizirao prije razdvajanja na temelju mase i naboja. Temperatura u MS-u iznosi 280 °C. Brzina detekcije je 2000 amu/s. Spektar snimanja masa iona postavljen je u rasponu od m/z 40 – 600 daltona. Validacija je provedena prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji. Ispitana je kroz parametre linearnosti, osjetljivosti, ponovljivosti, točnosti, granica detekcije i granica kvantifikacije te selektivnosti¹⁴. Nakon uspješne uspostave i potvrđene validacije metode klinički dio istraživanja proveden je od lipnja do rujna 2020. na pacijentima liječenim u Jedinici intenzivnog liječenja KBC-a Rijeka koji su zbog komplikacija bolesti priključeni na ECMO potporu. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Rijeka i provedeno je kao presječno istraživanje. Svakome je pacijentu u istome intervalu uzorkovan venski i arterijski uzorak, i to u razmacima 8, 16, 24, 32 i 40 sati nakon postavljanja ECMO uređaja. Korišteno je po pet uzoraka od svakog pojedinog pacijenta. Za istraživanje je uzimana venska i arterijska krv vađena u standardizirani *vacutainer* s litij-heparinom kao antikoagulansom. Istovremeno su uzimani uzorci venske i arterijske krvi istoga pacijenta koji se i uobičajeno uzimaju u dijagnostičko-terapijske svrhe. Svim se pacijentima na liječenju s ECMO sustavom u svrhu doziranja kisika uzimaju venski i arterijski uzorci za određivanje acidobaznog statusa u pravilnim intervalima od 8 sati, što je bila i dinamika uzoraka potrebnih za ovo istraživanje. Uzorci su dostavljeni u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Rijeka gdje su zakiseljeni s 1 M NaH₂PO₄ zbog očuvanja stabilnosti lijeka. Centrifugirani su na 3000 RPM/10 min, a odvojena plazma pohranjena je na -18 °C do analitičkog dijela. Metoda koja je primijenjena za određivanje koncentracije rokuronijeva bromida i korište-

ne kemikalije jednake su kao u prethodno razvijenoj i opisanoj GC-MS metodi. Dobiveni rezultati mjerenja koncentracije rokuronijeva bromida izraženi su u obliku kromatograma i uspoređeni s postavljenim standardom kako bi se mogli očitati rezultati. Međusobno su uspoređene dobivene vrijednosti koncentracije venske i arterijske krvi. Niže vrijednosti u arterijskom uzorku koji se nalazi iza oksigenatora potvrdile bi da se molekule lijeka zadržavaju na membrani oksigenatora, što je važno imati na umu kod određivanja optimalnog doziranja^{1,2}. Za statističku obradu laboratorijskih podataka analitičkog i kliničkog dijela rada korišten je program Microsoft Office Excel i MedCalc statistički softver v.12.5.0.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020)^{1,2}. Osnovni parametri obrađeni su metodom deskriptivne statistike te prikazani tablično i grafički. Otopine za kalibracijski pravac pripremane su iz intravenske otopine rokuronijeva bromida i različitih volumena etanola kako bi se dobilo šest kalibracijskih točaka te se svaku ponovilo tri puta. Jednadžba kalibracijskog pravca je $y = ax + b$ te je određen Pearsonov koeficijent korelacije (r) i koeficijent determinacije (r^2) kao mjere stupnja povezanosti dviju različitih veličina. Kada je $r \geq 0,95$, tada je signal mjerne metode proporcionalno ovisan o koncentraciji analita u uzorku. Preciznost, ponovljivost, prikazana je kao aritmetička sredina (X) ponovljenih mjerenja te je iz nje izračunato relativno standardno odstupanje (RSD). Statistički granica detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) određena je na bazi standardne devijacije (SD) signala i nagiba prema jednadžbama: $GD = 3,3 \sigma/a$ i za $GK = 10 \sigma/a$, pri čemu je a nagib, a σ SD signala uzorka koji mjerimo GC-MS-om. GD je najniža vrijednost određivanja s nedostatnom pouzdanosti za razliku od GK koji predstavlja najnižu vrijednost određivanja s određenom pouzdanošću. Rezultati dobivenih vrijednosti GD i GK potvrđeni su kroz dva postupka: prvo kroz šest ponovljenih mjerenja standardne otopine koncentracije 5,00 $\mu\text{g/ml}$ te naciyepljenim uzorkom plazme koncentracije 5,00 $\mu\text{g/ml}$ simulirajući stvarne uvjete. Točnost metode provedena je ponovljenim mjerenjem standardne otopine različitih koncentracija u tri mjerenja te ponovljenim mjerenjem (šest mjerenja) standardne otopine koncentracije 5,00 $\mu\text{g/ml}$. Selektiv-

nost je izražena preko retencijskih vremena (RT) i spektra mase (m/z) rokuronijeva bromida. U završnom kliničkom dijelu istraživanja, kojim se procjenjivao utjecaj ECMO aparata na koncentraciju rokuronijeva bromida u plazmi, kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim.

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom, a zbog malog uzorka koristile su se neparametrijske metode. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike u koncentraciji lijeka po mjerenjima testirane su Friedmanovim testom (Post hoc Conover), a između arterijske i venske krvi Mann Whitney U testom. Sve su P-vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\text{Alpha} = 0,05$.

REZULTATI

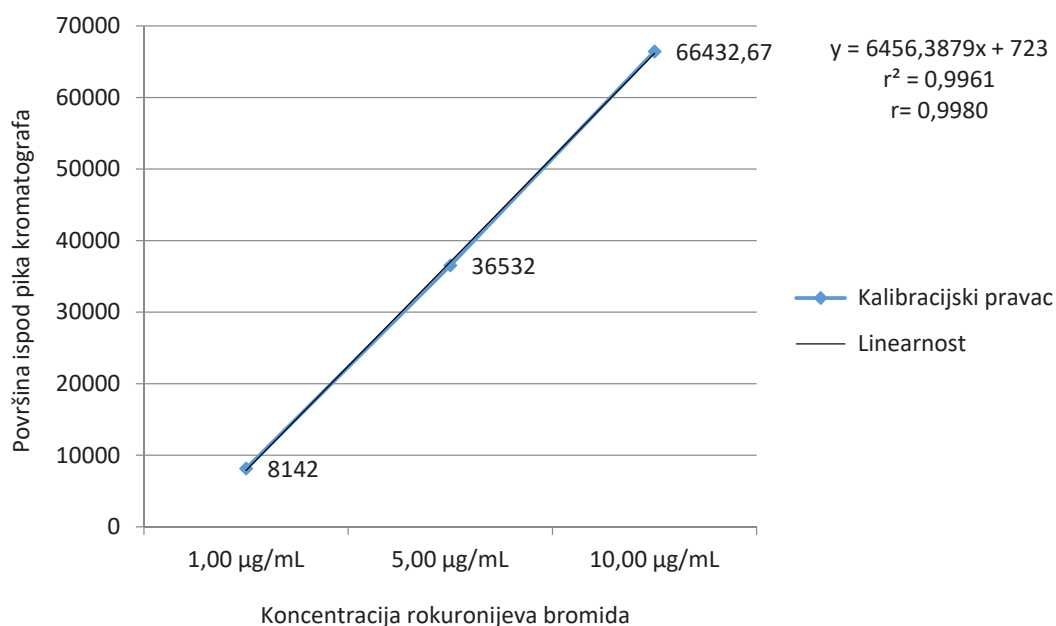
Rezultati ispitivanja linearnosti metode, kojima se dokazuje da se unutar određenog mjernog područja dobivaju rezultati proporcionalni koncentraciji analita u uzorku, prikazani su u tablici 1, a dodatna potvrda linearnosti metode vidi se na slikama 1 – 3. One predstavljaju grafički prikaz kalibracijskih pravaca kojim se dokazuje ovisnost odziva i koncentracije, gdje su na osi apscise (x) prikazane vrijednosti koncentracije rokuronijeva bromida u $\mu\text{g/ml}$ te na osi ordinate (y) površine ispod pika kromatografa izmjerenih koncentracija otopina. Točke prikazane u grafičkom prikazu jesu srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija rokuronijeva bromida prikazanih u tablici 1. Dakle, kako je i naglašeno u metodama, točke kalibracijskog pravca dobivene su aritmetičkom sredinom izmjerenih koncentracija rokuronijeva bromida. Linearnost mjerenja ispitana je u području koncentracija od 1 $\mu\text{g/ml}$ do 200 $\mu\text{g/ml}$ te su dobivene vrijednosti koje pokazuju da je radno područje od 1 do 50 $\mu\text{g/ml}$ najprihvatljivije za određivanje lijeka u uzorku ($r = 1$) u odnosu na postavljeni kriterij prihvatljivosti ($r \geq 0,995$). GD iznosi 0,5535 $\mu\text{g/ml}$, a GK 1,676 $\mu\text{g/ml}$. U tablici 2 prikazana je potvrda granice kvantifikacije, gdje su uspoređene izmjerene koncentracije standardne otopine i naciyepljenog uzorka plazme. Preciznost je potvrđena na temelju podataka dobivenih ponovljenim mjerenjem (tablica 3) gdje se iz 18 ponovljenih mjerenja vidi da X RSD iznosi 2,05 %,

2,45 i RSD 2,58 %. Točnost, odnosno iskorištenje kod određivanja rokuronijeva bromida dobiveno je na temelju usporedbe triju mjerenja pet različitih koncentracija i iznosi 98,9 %, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (točnost ± 10 %, tj. iskorište-

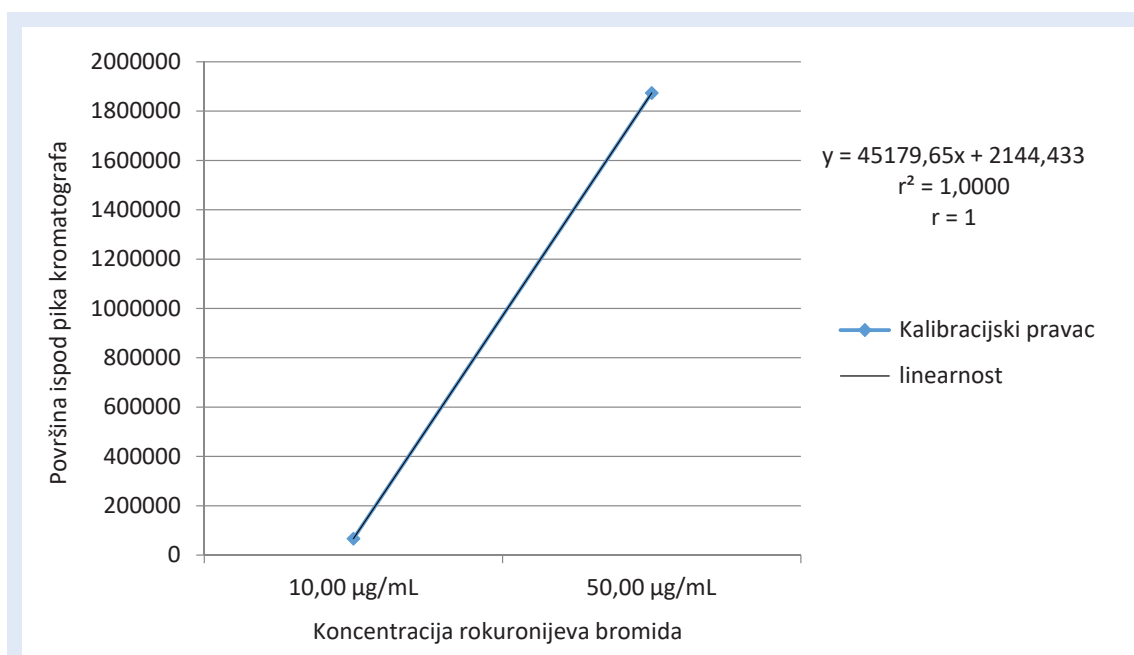
nje 90 – 10 %). Ponovljivost pripreme uzorka provedena je kroz pripremu uzorka dvaju analitičara (tablica 6). Izračunom X RSD, koji iznosi 1,62 %, utvrđeno je da ponovljivost pripreme uzorka zadovoljava kriterij prihvatljivosti (≤ 10 %). Točnost

Tablica 1. Rezultati ispitivanja linearnosti GC-MS metode

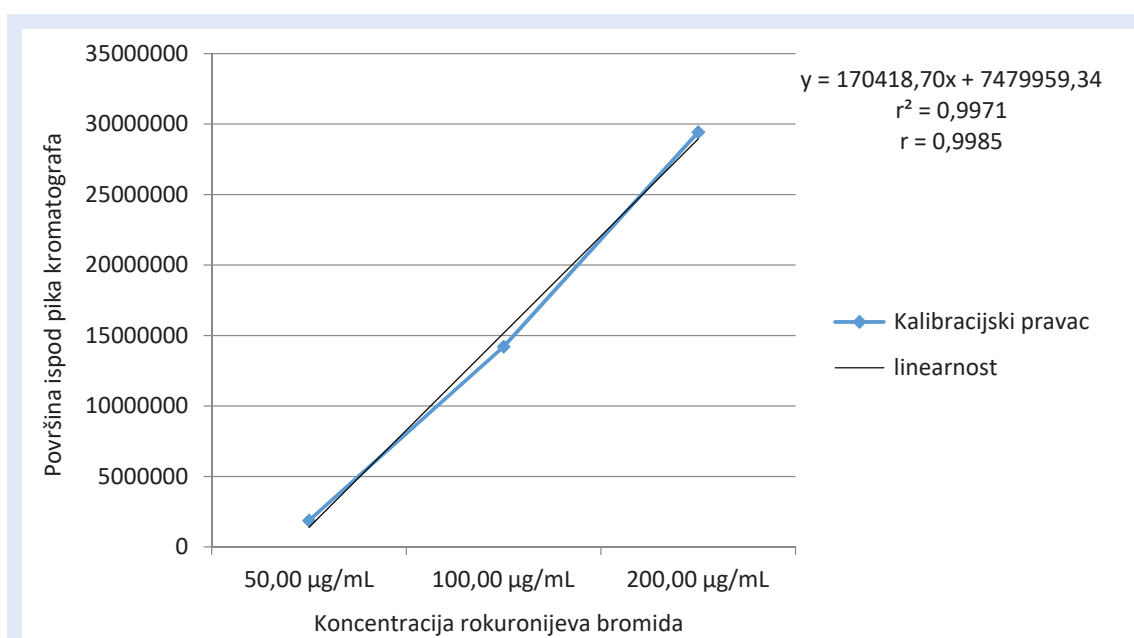
Dodane koncentracije rokuronijeva bromida	1 [µg/ml]	5 [µg/ml]	10 [µg/ml]
Izmjerene koncentracije rokuronijeva bromida (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml)	1,1764	4,5327	9,2108
	1,1998	4,6542	9,0420
	1,0819	4,8595	8,9100
Koeficijent korelacije r	0,9980		
Koeficijent determinacije r ²	0,9961		
Jednadžba pravca	y = 6456,3879 x + 723		
Dodane koncentracije rokuronijeva bromida	10 [µg/ml]	50 [µg/ml]	
Izmjerene koncentracije rokuronijeva bromida (10 µg/ml, 50 µg/ml)	9,2108	51,9413	
	9,0420	51,3630	
	8,9100	51,9649	
Koeficijent korelacije r	1,0000		
Koeficijent determinacije r ²	1,0000		
Jednadžba pravca	y = 45179,65 x + 2144,433		
Dodane koncentracije rokuronijeva bromida	50 [µg/ml]	100 [µg/ml]	200 [µg/ml]
Izmjerene koncentracije rokuronijeva bromida (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml)	51,9413	98,5235	200,0055
	51,3630	99,2289	201,7926
	51,9649	99,5348	201,8221
Koeficijent korelacije r	0,9985		
Koeficijent determinacije r ²	0,9971		
Jednadžba pravca	y = 170418,70 x + 7479959,34		



Slika 1. Grafički prikaz ovisnosti odziva i koncentracije rokuronijeva bromida (1 – 10 µg/ml)



Slika 2. Grafički prikaz ovisnosti odziva i koncentracije rokuronijeva bromida (10 i 50 µg/ml)



Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti odziva i koncentracije rokuronijeva bromida (50, 100 i 200 µg/ml)

što zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD \leq 10\%$). Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti metode, dobiveni u dvama eksperimentima ponovljenim mjerenjem radnog standarda iste koncentracije, pokazali su raspon izmjerenih koncentracija od 4,5327 µg/ml do 4,895 µg/ml sa srednjom vrijednosti 4,682 µg/ml ($SD = 0,1652$) u prvom i 4,733 µg/ml ($SD = 0,1233$) u drugom eksperimentu. RSD u prvom eksperimentu je 3,5 %,

a u drugom 2,6 %, te X RSD 3,05 %. Dodatna potvrda intermedijarne preciznosti vidi se iz rezultata ponovljenih mjerenja nacijepjenog uzorka plazme iste koncentracije dvaju različitih analitičara (A i B), prikazanih u tablici 4. Rezultati ispitivanja točnosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (šest mjerenja) standardne otopine koncentracije 5,00 µg/ml, prikazani u tablici 5, pokazuju da je X iskorištenja (točnost) 94,7, uz SD

Tablica 2. Potvrda granice kvantifikacije (GK) kroz šest ponovljenih mjerenja standardne otopine koncentracije 5,00 µg/ml i na naciepljenom uzorku plazme koncentracije 5,00 µg/ml

Broj analize	Izmjerene koncentracije standardne otopine od 5,00 µg/ml	Iskorištenje [%]	Izmjerene koncentracije naciepljenog uzorka plazme od 5,00 µg/ml
1	4,533	90,654	4,849
2	4,654	93,084	4,770
3	4,860	97,19	4,847
4	4,772	95,43	5,229
5	4,837	96,744	5,328
6	4,744	94,872	5,075
X	4,733	94,66	5,016
SD	0,1223	2,45	0,2294
RSD (%)	2,6	2,58	4,6

X – Aritmetička sredina; SD – Standardno odstupanje; RSD – Relativno standardno odstupanje

Tablica 3. Rezultati ispitivanja preciznosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (tri puta) radnih standarda šest različitih koncentracija

Koncentracije radnih standarda	1 [µg/ml]	5 [µg/ml]	10 [µg/ml]	50 [µg/ml]	100 [µg/ml]	200 [µg/ml]
Izmjerene koncentracije radnih standardnih otopina rokuronijeva bromida [µg/ml]	1,1764	4,5327	9,2108	51,9413	98,5235	200,0055
	1,1998	4,6542	9,0420	51,3630	99,2289	201,7926
	1,0819	4,8595	8,9100	51,9649	99,5348	201,8221
*X	1,153	4,682	9,054	51,756	99,096	201,025
*SD	0,062	0,165	0,151	0,341	0,519	0,920
*RSD, %	5,4	3,5	1,7	0,7	0,5	0,5
*X RSD, %	2,05					

X – Aritmetička sredina; SD – Standardno odstupanje; RSD – Relativno standardno odstupanje; X RSD – Aritmetička sredina relativnog standardnog odstupanja

Tablica 4. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti za rokuronijev bromid dobiveni ponovljenim mjerenjem (šest puta) naciepljenog uzorka plazme iste koncentracije od dvaju različitih analitičara (A i B).

Rokuronijev bromid						
Analitičar	Dodana koncentracija rokuronijeva bromida [µg/ml]	Izmjerena koncentracija rokuronijeva bromida [µg/ml]	*X, [µg/ml]	*SD	*s _p	*RSD, [%]
A	5,00	4,8489	5,0162	0,2294	0,0040	2,2862
	5,00	4,7697				
	5,00	4,8472				
	5,00	5,2287				
	5,00	5,3278				
	5,00	5,0753				
B	5,00	5,3129	5,3584	0,1033	0,0040	0,9635
	5,00	5,2634				
	5,00	5,4965				
	5,00	5,3068				
	5,00	5,4829				
	5,00	5,2879				

*X RSD, %; 1,6249

X – Aritmetička sredina; SD – Standardno odstupanje; Sp – Skupno (*pooled*) standardno odstupanje; RSD – Relativno standardno odstupanje; X RSD – Aritmetička sredina relativnog standardnog odstupanja

Tablica 5. Rezultati ispitivanja točnosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (šest mjerenja) standardne otopine koncentracije 5,00 µg/ml.

Broj dodavanja rokuronijeva bromida koncentracije od 5,00 [µg/ml]	Izmjerena koncentracija rokuronijeva bromida [µg/ml]	Iskorištenje rokuronijeva bromida [%]
1	4,5327	90,7
2	4,6542	93,1
3	4,8595	97,2
4	4,7715	95,4
5	4,8372	96,7
6	4,7436	94,9
*X		94,7
*SD		2,45
*RSD, %		2,58

*X – Aritmetička sredina; SD – Standardno odstupanje; RSD – Relativno standardno odstupanje

Tablica 6. Ponovljivost pripreme i iskorištenje uzorka koncentracije 5,00 µg/ml učinjeno od dvaju analitičara (A i B)

Dodana koncentracija od 5 [µg/ml], broj ponavljanja	Koncentracije dobivene mjerenjem analitičara A [µg/ml]	Koncentracije dobivene mjerenjem analitičara B [µg/ml]	Iskorištenje analitičar A [%]	Iskorištenje analitičar B [%]
1	4,8489	5,3129	96,977	106,258
2	4,7697	5,2634	95,393	105,268
3	4,8472	5,4965	96,944	109,93
4	5,2287	5,3068	101,506	106,135
5	5,3278	5,4829	104,573	109,658
6	5,0753	5,2879	106,555	105,757
*X	5,0162	5,3584	100,3247	107,1677
*SD	0,23	0,10		
*X SD	0,17			
*sp	0,095			
*RSD	2,29	0,96		
*X RSD	1,62			

X – Aritmetička sredina; SD – Standardno odstupanje; sp – Skupno (*pooled*) standardno odstupanje; RSD – Relativno standardno odstupanje; X RSD – Aritmetička sredina relativnog standardnog odstupanja**Tablica 7.** Sažet prikaz rezultata validacijskog postupka i potvrda prihvatljivosti metode

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat
Granica detekcije (GD)	Informacija	0,553 µg/ml
Granica kvantifikacije (GK)	Informacija	5 µg/ml
PRECIZNOST		
Ponovljivost	RSD ≤ 10 %	RSD = 2,083 %
Intermedijarna preciznost	RSD ≤ 10 %	RSD = 3,05 %
Točnost (iskorištenje)	90–110 %	98,9 %
LINEARNOST		
Koeficijent korelacije	r ≥ 0,995	0,9961
Selektivnost	Informacija (RT)	23,25 min
Selektivnost	Informacija (m/z)	413

pripreme uzorka zadovoljavajuća je kod obaju analitičara. Kriterij prihvatljivosti je od 90 do 110 % i sukladno tome vidi se da iskorištenje A iznosi 100,32 %, a B 107,17 %. Selektivnost se izražava preko RT i m/z pojedinih sastojaka u otopini ekstrakta. Svaka analitička metoda mora biti selektivna da bi se omogućilo točno i specifično te selektivno određivanje pojedinog analita u uzorku. Ova je metoda selektivna, što je prikazano na slici 4 iz koje se vidi da je RT 23,25 min i m/z rokuronijeva bromida 413. Sumarni sažetak svih rezultata validacijskih parametara – GD, GK, preciznost, intermedijarna preciznost, točnost (iskorištenje), koeficijent korelacije i selektivnost, prikazan je u tablici 7.

Utjecaj ECMO uređaja na koncentraciju rokuronijeva bromida u plazmi

Uzorci venske i arterijske krvi petero ispitanika uzorkovani su u deset mjerenja u pravilnim intervalima od 8 sati. Dobiveni rezultati za uzorke vađene nakon 8, 16, 24, 32 i 40 sati prikazani su u tablici 8. Razlike u koncentraciji lijeka po mjerenjima testirane su Friedmanovim testom (Post hoc Conover), a razlike između arterijske i venske krvi Mann Whitney U testom. Iako je koncentracija lijeka nakon 16 i 24 sata u venskoj krvi nešto viša, ona se ne razlikuje značajno u odnosu na ostala mjerenja (Friedmanov test $P = 0,27$). Koncentracija lijeka u arterijskoj krvi nakon 16 sati poprima dodatno još niže vrijednosti, no one se

Tablica 8. Vrijednosti koncentracija lijeka u venskom i arterijskom uzorku izraženih u $\mu\text{mol/l}$

	Vena /Arterija 8 h	Vena /Arterija 16 h	Vena/Arterija 24 h	Vena/Arterija 32 h	Vena/Arterija 40 h
Pacijent 1	0,1522 0,0466	14,1242 11,1352	9,7844 6,9621	1,2391 0,1049	0,1833 0,1038
Pacijent 2	1,1665 0,5806	8,6637 7,4417	10,351 8,935	0,5863 0,5816	5,8740 3,5214
Pacijent 3	6,6689 4,6245	1,3250 1,1092	10,3510 8,7341	6,3185 5,2141	12,3514 10,9732
Pacijent 4	12,2883 11,0966	9,9473 0,6278	6,5103 5,1352	1,2584 1,0315	0,5312 0,1325
Pacijent 5	10,0400 9,3299	12,1200 11,1000	8,3457 6,9214	1,3457 1,1097	8,3571 7,9180

Tablica 9. Razlike u koncentraciji lijeka u venskoj i arterijskoj krvi po mjerenjima

	Medijan (interkvartilni raspon) koncentracije lijeka	Hodger – Lehmann razlika medijana	95 % raspon pouzdanosti	p*
Mjerenje nakon 8 sati				
Venska krv	6,669 (0,913 – 10,602)	-0,71	-9,99 do 9,18	0,69
Arterijska krv	4,624 (0,447 – 9,772)			
Mjerenje nakon 16 sati				
Venska krv	9,947 (6,829 – 12,621)	-1,02	-8,84 do 8,30	0,55
Arterijska krv	9,628 (5,859 – 11,109)			
Mjerenje nakon 24 sata				
Venska krv	9,784 (7,887 – 10,351)	-1,42	-4,65 do 0,59	0,17
Arterijska krv	6,962 (6,475 – 8,784)			
Mjerenje nakon 32 sata				
Venska krv	1,258 (1,076 – 2,589)	-0,31	-5,29 do 3,96	0,22
Arterijska krv	1,031 (0,462 – 2,136)			
Mjerenje nakon 40 sati				
Venska krv	0,587 (0,444 – 9,356)	-0,39	-8,83 do 10,9	0,69
Arterijska krv	3,521 (0,125 – 8,682)			

*Mann Whitney U test

ne razlikuju značajno u odnosu na ostala mjerenja (Friedmanov test $P = 0,49$). Iako su u prva tri mjerenja nešto veće razlike u koncentraciji lijeka između arterijske i venske krvi po mjerenjima, te razlike, iako prisutne, nisu značajne (tablica 9).

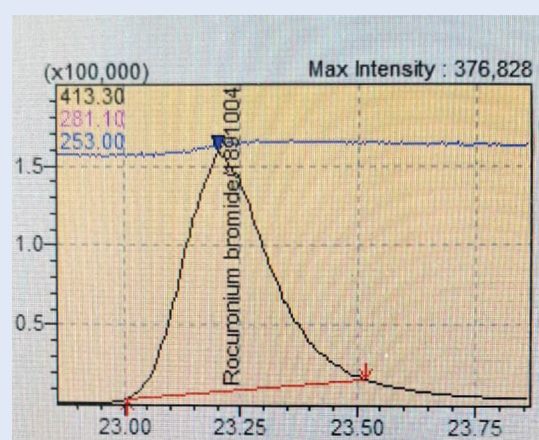
RASPRAVA

U ovom radu razvijena je i validirana nova GC-MS metoda za određivanje rokuronijeva bromida u uzorku plazme te je provedena validacija metode kroz parametre validacije prema ICH-ovim (engl.

Kod pacijenata s ECMO potporom, na učinjenim uzorcima u svim mjerenjima, vrijednosti rokuronijeva bromida bile su više u venskom nego u arterijskom uzorku, ali zbog malog broja uzoraka i velike varijabilnosti u koncentraciji nije postignuta značajna razlika te je potrebno nastaviti istraživanje na većem uzorku stratificiranih pacijenata.

International Committee for Harmonisation) smjernicama^{1, 2, 14}. Validacija je provedena kroz parametre linearnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, preciznosti, točnosti i selektivnosti. Uvodni dio istraživanja obuhvaćao je razvoj metode kroz pripremu uzorka i postavljanja parametara na GC-MS-u. Dosadašnji radovi koji uključuju istraživanje rokuronijeva bromida te njegovu kliničku primjenu, temelje se na sličnim postavkama¹⁷⁻²². Određivanje rokuronijeva bromida u plazmi pacijenata određuje se i drugim analitičkim metodama, kao što su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*; HPLC) te TOF (engl. *time of flight*) kao analitička tehnika, odnosno detektor koji u tandemu s plinskom ili tekućinskom kromatografijom služi za otkrivanje novih spojeva i metabolita^{1, 2, 20-23}. Iako su i druge metode vrlo učinkovite, GC-MS metoda je osjetljivija i njome je moguće analizirati količine manje od 10^{-12} grama¹⁷⁻¹⁹. Klinički dio istraživanja pokazao je praktičnu vrijednost ove metode mjerenjem razine rokuronijeva bromida u plazmi pacijenata liječenih u Jedinici intenzivnog liječenja KBC-a Rijeka koji su zbog liječenja komplikacija osnovne bolesti priključeni na ECMO potporu. Uspoređujući

ovo istraživanje sa do sada objavljenim tematski sličnim istraživanjima, postoje sličnosti u pripremi uzorka, postavljanju metode, ali i razlike u dijelovima opreme¹⁶⁻¹⁹. U ovom je radu stacionarnu fazu činila kolona RTX 5MS (30 m* 0,25 mm, film 0,25 μm), a u jednom od usporednih radova kapilarna kolona DB – 5 (15 m, 30, 25 mm, 0, 25 mm). Vrsta kolone, kao i njezina duljina bitne su za razdvajanje analita u uzorku pa tako ne možemo ni očekivati iste rezultate jer RT nije isti. Tako je RT u ovom radu 23,25 minuta, dok je u drugim radovima 14,8; 15,7 i 16,8 minuta, što govori u prilog važnosti vrste kolone¹⁷⁻²³. Vrijednost m/z je ista u većini radova, što govori u prilog selektivnosti metode i upućuje na GC-MS metodu kao metodu izbora u praksi, bilo laboratorijski ili klinički, za precizno određivanje koncentracija različitih supstancija¹⁷⁻²³. Selektivnost metode dokazana je u plazmama u koje su dodavane različite koncentracije rokuronijeva bromida te se na m/z 413 u 23,25 minuta na kromatogramu pojavio pik (slika 4). Granica kvantifikacije u svim radovima nije ista i najniža granica kvantifikacije je 26 ng/ml, dok je to u ovom radu 1676 ng/ml^{1, 2, 9}. Najniža koncentracija analita koja može biti detektirana jest 553 ng/ml, što govori u prilog osjetljivosti metode^{1, 2, 17-23}. Linearnost se postiže u svim radovima sličnih tema, ali u drugim radnim područjima^{1, 2, 17-23}. Sve to upućuje na činjenicu – ako su priprema uzorka i postavke GC-MS-a drugačije, ne dobivamo iste vrijednosti validacijskog postupka, pa tako ni analize realnih uzoraka plazme.



Slika 4. Prikaz kromatografa s GC-MS uređaja na kojem je prikazana mjera selektivnost, RT (23,25 min)

Ukoliko laboratorij uvodi GC-MS metodu za određivanje rokuronijeva bromida u uzorku plazme, trebala bi se obavezno provesti validacija kako bi rezultati analize bili pouzdani, ali i kako bi se kroz neko buduće vrijeme mogla provesti standardizacija postupka^{1, 2, 17, 22}. Dodatno ističemo da se u našem radu pokazalo da je metodu najprihvatljivije koristiti u koncentracijama od 1 do 50 µg/ml jer se koncentracije mjerene u tom području pravilnije distribuiraju na prikazima kromatografa tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela. Koncentracije u višim područjima imale su nepravilniju distribuciju pa se cijeli rad temeljio na razvoju i validaciji metode pri nižim koncentracijama rokuronijeva bromida. Ovim radom smo, dakle, razvili kompletnu metodu, od sakupljanja uzorka, njegovog čuvanja, pripreme te postavki GC-MS analizatora. Cijeli je postupak ponovljen i na realnim uzorcima plazmi nacjepljujući ih različitim koncentracijama rokuronijeva bromida te je tako potvrđena validacija metode kroz različite parametre. To znači da se ova GC-MS metoda može koristiti u kliničkoj primjeni i osigurati veću pouzdanost i sigurnost korištenja mišićnih relaksatora u medicinskim postupcima. Bitno je da se uzorci pacijenata zakisele s otopinom natrijeva dihidrogenfosfata na pH 5,5 te zalede kako se rokuronijev bromid prisutan u plazmi ne bi razgradio^{1, 2}. Prema drugim istraživanjima rokuronijev bromid može se, osim u plazmi, odrediti i u urinu jer se najčešće eliminira nepromijenjen²³. GC-MS je osjetljiva i visoko selektivna metoda za određivanje rokuronijeva bromida u uzorku plazme te se uspješno može koristiti u daljnjim pretkliničkim i kliničkim istraživanjima, ali i u kliničkoj primjeni. Postoji mali broj istraživanja koja povezuju rokuronijev bromid i GC-MS kao metodu izbora i stoga bi ovaj rad, iako je ograničavajući faktor što se radi o seriji samo pet slučajno odabranih pacijenata, mogao pridonijeti razvoju i uvođenju prakse određivanja rokuronijeva bromida u uzorcima plazme pacijenata, što je i potvrđeno u realnim bolničkim uvjetima, gdje je mjerena koncentracija rokuronijeva bromida kod pacijenata u jedinici intenzivnog liječenja na ECMO potpori. Mjerenjem koncentracije lijeka u venskom i arterijskom uzorku, tj. ispred i iza pumpe oksigenatora, cilj je bio vidjeti postoji li razlika u dobivenim vrijednostima i zaostaju li molekule lijeka na

membrani oksigenatora, što je vrlo bitno za farmakokinetiku, biodostupnost i farmakodinamiku lijeka. Kako je opisano u metodama, razlike u koncentraciji lijeka po mjerenjima testirane su Friedmanovim testom (*Post hoc Conover*), a razlike između arterijske i venske krvi Mann Whitney U testom. Vrijednosti koncentracija lijeka u venskoj krvi pokazale su nešto višu koncentraciju (pogotovo u uzorcima od 16 i 24 sata) i ne razlikuje se značajno u odnosu na ostala mjerenja ($p = 0,27$). Koncentracija lijeka u arterijskim uzorcima poprimila je nešto niže vrijednosti, ali se značajno ne razlikuje ($p = 0,49$). Iako je u nekim uzorcima razlika venskog i arterijskog uzorka bila veća, te razlike, iako prisutne, nisu značajne ($p = 0,17-0,69$). Važno je uzeti u obzir da ECMO sustav cirkulacije sam po sebi, uz cijevi, oksigenator i pumpu, povećava površinu koja lijekove može zadržati i adsorbirati^{23, 24}. To dovodi do smanjenja vrijednosti koncentracije u plazmi i do povećanja volumena distribucije. Učinak adsorpcije može se i smanjivati tijekom vremena zbog zasićenja veznog mjesta²³. Isto tako, cirkulacija unutar ECMO-a može poslužiti kao rezervoar i dovoditi lijek do pacijenta i nakon prestanka primjene lijeka^{1, 3, 23}. Na uklanjanje lijeka može utjecati i materijal za oksigenaciju, vrste cijevi, starost oksigenatora, kao i sastav otopine za premaz cijevi^{1, 2, 23}. Sve je to vrlo bitno zbog teškog stanja pacijenata na ECMO potpori²⁴⁻²⁶. Iako su kod svih naših pacijenata s ECMO potporom na učinjenim uzorcima i u svim mjerenjima vrijednosti rokuronijeva bromida bile više u venskom nego u arterijskom uzorku, zbog malog broja uzoraka i velike varijabilnosti u koncentraciji nije postignuta značajna razlika.

ZAKLJUČCI

GC-MS je zbog svoje selektivnosti i osjetljivosti primjerena, pouzdana i u praksi primjenjiva analitička metoda za određivanje rokuronijeva bromida u plazmi. Provođenjem validacije analitičke metode za određivanje rokuronijeva bromida u plazmi potvrđeno je da odabrani validacijski parametri (linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, preciznost, intermedijarna preciznost, ponovljivost, točnost, selektivnost) zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti. Određivanje koncentracije rokuronijeva bromida u plazmi važ-

no je za pacijente i pravilno doziranje lijeka tijekom medicinskih zahvata, a koristi se i kao indikator eliminacije lijeka iz organizma jer može detektirati i vrlo niske vrijednosti kada istraživani analit pokazuje visok stupanj eliminacije. Kod pacijenata s ECMO potporom na učinjenim uzorcima i u svim mjerenjima vrijednosti rocuronijeva bromida bile su više u venskom nego u arterijskom uzorku, ali zbog malog broja uzoraka i velike varijabilnosti u koncentraciji nije postignuta značajna razlika, te je za konačan zaključak o utjecaju ECMO uređaja na koncentraciju rocuronijeva bromida u plazmi potrebno nastaviti istraživanje na većem uzorku stratificiranih pacijenata.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju kako ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Smirčić A. Razvoj i validacija GC-MS metode za određivanje rocuronijeva bromida u plazmi. Osijek: Medicinski fakultet, 2020. Diplomski rad.
- Lovrinov T. Utjecaj uređaja izvantjelesne membranske oksigenacije (ECMO) na promjenu koncentracije lijeka rocuronijeva bromida bromid. Osijek: Medicinski fakultet, 2020. Diplomski rad.
- Jurić M, Carev M, Karanović N, Lojpur M. Anestezija i intenzivna medicina za studente. Split: Medicinski fakultet, 2015;37.
- Šakić-Zdravčević K, Gulam D, Ivić D, Kratofil B, Kvolik S, Maldini B et al. Klinička anesteziologija, reanimatologija i intenzivno liječenje. Osijek: Medicinski fakultet, 2008;516.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. 5. Izdanje. Zagreb: Tehnička knjiga, 2006;765.
- Wight WJ, Wright PM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapacuronium bromide. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:1059-76.
- Varrique RM, Lauretti GR, Matsumoto JA, Lanchote VL, de Moraes NV. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium in young adult and elderly patients undergoing elective surgery. *J Pharm Pharmacol* 2016; 68:1351-1358.
- Khuenl-Brady KS, Sparr H. Clinical pharmacokinetics of rocuronium bromide. *Clin Pharmacokinet* 1996;31:174-83.
- Klotz U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab Rev* 2009;41:67-76.
- Kruijt Spanjer MR, Bakker NA, Absalom AR. Pharmacology in the elderly and newer anaesthesia drugs. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2011;25:355-65.
- Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb: Medicinska naklada, 1997;388.
- Babić A. Validacija analitičkih metoda. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2009. Diplomski rad.
- Čorić J. Kontrola kvaliteta rada u laboratorijskoj medicini. Sarajevo: Fakultet zdravstvenih studija, 2014.
- International Committee for Harmonisation (ICH) [Internet]. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(r1). [Citirano: 06.10.2020.] Dostupno na: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- Makdasi G, Wang IW. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J Thorac Dis* 2015;7:166-76.
- Fisher DM, Wright PM. Are plasma concentration values necessary for pharmacodynamic modeling of muscle relaxants?. *Anesthesiology* 1997;86:567-75.
- Gao L, Ramzan I, Baker B. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for rocuronium with potential for quantifying its metabolite, 17-desacetylrocuronium, in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;757:207-14.
- Hites RA. Development of Gas Chromatographic Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2016;88:6955-61.
- Cheng V, Abdul-Aziz MH, Roberts JA, Shekar K. Optimising drug dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J Thorac Dis* 2018;10:629-641.
- Wang L, Zhou MT, Chen CY, Yin W, Wen DX, Cheung CW et al. Increased renal clearance of rocuronium compensates for chronic loss of bile excretion, via upregulation of Oatp2. *Sci Rep* 2017;7:404-38.
- Wegener O, Harms G, Volmer DA, Hayen H. Structural characterization of a degradation product of rocuronium using nano-electrospray-high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2015;7:773-9.
- Gao L, Ramzan I, Baker B. Rocuronium infusion requirements and plasma concentrations at constant levels of neuromuscular paralysis during three phases of liver transplantation. *J Clin Anesth* 2003;15:257-66.
- Proost JH, Eriksson LI, Mirakhor RK, Roest G, Wierda JM. Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans. *Br J Anaesth* 2000;85:717-23.
- Lequier L, Horton SB, McMullan DM, Bartlett RH. Extracorporeal membrane oxygenation circuitry. *Pediatr Crit Care Med* 2013;14:7-12.
- Keebler ME, Haddad EV, Choi CW, McGrane S, Zalawadiya S, Schlendorf KH et al. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation in cardiogenic shock. *JACC Heart Fail* 2018;6:503-516.
- Murphy DA, Hockings LE, Andrews RK, Aubron C, Gardner EE, Pellegrino VA et al. Extracorporeal membrane oxygenation-hemostatic complications. *Transfus Med Rev* 2015;29:90-101.