

Razvoj i validacija GCMS metode za određivanje rokuronija u plazmi

Smirčić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:799865>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Anamarija Smirčić

**RAZVOJ I VALIDACIJA GCMS METODE
ZA ODREĐIVANJE ROKURONIJA U
PLAZMI**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Anamarija Smirčić

**RAZVOJ I VALIDACIJA GCMS METODE
ZA ODREĐIVANJE ROKURONIJA U
PLAZMI**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Željko Jovanović, dr. med.

Rad ima 42 lista, 12 tablica i 4 slike.

Zahvale:

Posebna zahvala dr. sc. Igoru Dubroviću iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ-a na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Hvala dr.sc Vesni Horvat za ohrabrujuće savjete prilikom početka rada.

Svaki put negdje započinje i završava. Ovo je kraj jednog, ali i početak drugog puta.

Hvala svima koji su bili dio njega i učinili ga lakšim i zanimljivijim. Bez vas on ne bi bio isti!

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Miorelaksatori | 1 |
| 1.1.1. Rokuronij | 2 |
| 1.2. Primjena GCMS metode za detekciju rokuronija | 3 |
| 1.3. Validacija | 4 |
| 1.4. Kromatografija | 6 |
| 1.4.1. Plinska kromatografija (GC)..... | 7 |
| 1.5. Masena spektrometrija (MS)..... | 10 |
| 1.6. Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GCMS)..... | 10 |
| 2. CILJEVI | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1. Ustroj studije | 13 |
| 3.2. Materijali | 13 |
| 3.2.1. Kemikalije..... | 13 |
| 3.2.2. Priprema radnih otopina..... | 13 |
| 3.2.3. Uzorkovanje i priprema uzorka | 13 |
| 3.3. Metode..... | 14 |
| 3.3.1. Priprema mobilne faze | 14 |
| 3.3.2. Priprema uzorka | 14 |
| 3.3.3. Postavke plinske kromatografije..... | 14 |
| 3.3.4. Postavke masenog sprektometra | 15 |
| 3.3.5. Statistička obrada rezultata | 15 |
| 3.3.6. Validacija metode | 15 |
| 4. REZULTATI | 16 |
| 4.1. LINEARNOST..... | 16 |
| 4.2. GRANICA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE..... | 21 |
| 4.3. PRECIZNOST..... | 23 |
| 4.4. TOČNOST | 27 |
| 4.5. PONOVLJIVOST PRIPREME UZORKA | 30 |
| 4.6. SELEKTIVNOST | 31 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| 4.7. SAŽETAK REZULTATA | 31 |
| 5. RASPRAVA..... | 34 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 37 |
| 7. SAŽETAK..... | 38 |
| 8. SUMMARY | 39 |
| 9. LITERATURA | 39 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 39 |

1 UVOD

1.1 Miorelaksatori

Mišićni relaksatori su lijekovi posebnog značaja za izvođenje anestezije, a djeluju tako da blokiraju prijenos živčanih impulsa na neuromuskulturnoj spojnici te uzrokuju mišićnu paralizu (1, 2). Najčešće se koriste prilikom intubacije traheje, a zamjenjuju prije korišteni eter koji je davao dobru mišićnu relaksaciju (1). Prvo su to bili relaksatori dugog djelovanja kao što je D-tubokurarin, a kasnije je i on zamijenjen metokurinom, pankuronijem te vekuronijem i rokuronijem koji su relaksatori kraćeg djelovanja (1). Neuromuskulturna spojnica je mjesto djelovanja mišićnih relaksatora, a sastoji se od: aksona, motoričke ploče mišića i prostora između njih, sinaptičke pukotine (1, 2). U živčanim okončinama aksona nalaze se mjehurići, a svaki od njih sadrži 10 000 molekula acetilkolina (1, 2). Unutar područja motoričke ploče nalaze se udubljenja nazvana sinaptički nabori (1). Po površini motoričke ploče smješteni su nikotinski receptori čija je koncentracija veća na izbočenom dijelu svake sinaptičke pukotine (1). Molekule enzima acetilkolinesteraze vise poput niti s površine motoričke ploče, ulazeći u sinaptičku pukotinu i nabore (1). Nikotinski receptori su veliki glikoproteini sastavljeni od pet podjedinica složenih u prsten te formiraju ionski kanal, a također su smješteni u blizini sinaptičke pukotine i nabora kao i molekule acetilkolinesteraze (1). Neuromuskulturna transmisija započinje na živcu (1). Aktivni potencijal, oko -90 mV, dostiže živčanu okončinu, ulazak kalcija u stanicu uzrokuje spajanje mjehurića sa staničnom membranom i pražnjenje mjehurića u sinaptičku pukotinu (1, 2, 3). Molekule acetilkolina vežu se za jednu ili više podjedinica nikotinskog receptora, mijenjaju njegovu konformaciju, pri čemu se kanal otvara i omogućuje ulaz natrija te depolarizaciju motoričke ploče (1, 2, 3). Acetilkinolin nije čvrsto vezan te se nevezani metabolizira enzimom acetilkolinesterazom koja se nalazi u sinaptičkoj pukotini (1, 2). Ovi razgradni produkti vraćaju se u živčanu okončinu gdje se upotrebljavaju za ponovnu sintezu acetilkolina (1, 2). Neuromuskulturna blokada nastaje kada se prijenos impulsa između živca i mišića prekine na jednom ili više mjesta (1, 2). Sukcinnikolin ulazi u sinaptičku pukotinu i depolarizira neuromuskulturnu spojnicu te zbog toga spada u depolarizirajućerelaksatore (1, 2). S druge strane, nedepolarizirajućerelaksatori, vežu se na isto mjesto gdje i acetilkolin, ali ne depolariziraju

motoričku ploču (1, 2). Oni interferiraju s neuromuskularnim prijenosom na tri načina: sprječavaju normalno vezanje acetilkolina na motoričku ploču, fizičkom blokadom dovode do blokade kanala i sprječavaju kretanje acetilkolina s mjesta sinteze na mjesto oslobađanja blokirajući natrijeve kanale (1). Nedepolarizirajućirelaksatori kompetitivnom inhibicijom s acetilkolinom djeluju na prijenos živčanih impulsa (1, 2). Kako se omjer koncentracije nedepolarizirajućihrelaksatora i acetilkolina smanjuje, koncentracijaacetilkolina će rasti i neuromuskulatoreni prijenos će biti normalan (1, 2). Različiti mišići različito reagiraju na mišićne relaksatore pa je tako ošit otporniji na njihovo djelovanje, a ineterkostalni ili abdominalni mišići su osjetljiviji (1). Interakcije s drugim lijekovima pojačavaju ili snižavaju intenzitet djelovanja, ali i brzinu djelovanja mišićnih relaksatora. Lijekovi kao što su inhalacijski anestetici pojačavaju intenzitet mišićne relaksacije, a aminoglikozidi pojačavaju njihov učinak (1). Nadalje, različita stanja također utječu na primjenu mišićnih relaksatora, pa tako stanje hipotermije produžuje njihov učinak zbog smanjenog izlučivanja bubrezima (1). Da bismo produžili djelovanje kratko djelujućeg mišićnog relaksatora koristimo male doze dugodjelujućeg mišićnog relaksatora, a takav postupak naziva se prekurarizacija (1). Nakon primjene mišićnih relaksatora mogu se primijeniti antagonisti kako bi se ubrzao oporavak od relaksatora (1). Antagonisti mišićnih relaksatora djeluju tako da povećavaju koncentraciju acetilkolina na završnoj ploči inhibicijom kolinesteraze (1, 3). U antagoniste spadaju neostigmin, edrofonij i piridostigmin (1). Njihovo korištenje preporučuje se tek onda kada je već došlo do spontane pojave mišićne aktivnosti (1, 3).

1.1.1 Rokuronij

Rokuronij spada u nedepolarizirajuće, kompetitivne mišićne relaksatore (1). Oni s kompetitivnijom inhibicijom acetilkolina djeluju na neuromuskulatornu spojnicu (1). Prema kemijskoj strukturi relaksatori se dijele na prirodne alkaloidne i njihove derivate, amoniosteroide i benzilizokinolone (1, 2, 3). Druga podjela temelji se na dužini djelovanja pa se tako dijele na kratko, srednje i dugo djelujuće (1, 2, 3). Rokuronij spada u srednje dugo djelujuće amoniosteroide (1, 2, 3). Početak njegovog djelovanja je oko 60 do 90 sekundi nakon primjene, a klinički učinak mu traje od 30 do 60 minuta, što ovisi o metabolizmu jetre, dok se 95% -tni oporavak očekuje nakon 45 do 90 minuta (1, 2, 3). Rokuronij se zbog svog brzog djelovanja uglavnom koristi kod intubacije traheje pri dozi od 0,6 do 1 mg/kg (1, 2, 8). Nakon njegove primjene ukupna doza lijeka

iz plazme pomiče se prema perifernim tkivima različite prokrvljenosti (1, 8). On ne prolazi dobro staničnu membranu zbog svoje polarnosti pa je zato volumen distribucije u stanju ravnoteže približno jednak volumenu ekstracelularne tekućine (1, 8). Izlučivanje lijeka odvija se dvostrukim putem preko jetre i bubrega pa je stoga učinak lijeka kraći, poluvrijeme eliminacije za zdravu osobu iznosi 71 minutu, a za osobu s kroničnim bubrežnim zatajenjem 97 minuta (1, 3, 8). Svi nedepolarizirajući mišićni relaksatori potencijalno bi mogli blokirati sve autonomne receptore, ali bi im za takvo djelovanje trebale velike doze koje su izvan terapijskih opsega (1). Kardiovaskularni pokazatelji autonomne blokade jesu hipotenzija, tahikardija i aritmije (1). Na sigurnost primjene utječe pojavnost kardiovaskularnih nuspojava i dostatnost oporavka normalne mišićne funkcije (1, 2, 3, 8). Rokuronij se primjenjuje u dječjoj populaciji zbog svojeg srednje dugog djelovanja, minimalne rezidualne paralize i bržeg početka djelovanja nego li u odraslih (2, 4, 8). Kod pretilih osoba također se primjenjuje rokuronij, ali je tada njegovo djelovanje produženo (1, 8). Doziranje kod pretilih osoba bi trebalo biti uvećano za 20% nego li kod osoba normalne tjelesne težine (1, 5, 8). Kako mišićni relaksatori imaju interakciju s drugim lijekovima, tako je i njihovo djelovanje promijenjeno i kod nekih bolesti. Bubrežno zatajenje mijenja učinak svih nedepolarizirajućih mišićnih relaksatora, pa tako i rokuronija (1, 8). Učinak djelovanja se produljuje zbog smanjene bubrežne funkcije, a samim time i sporije eliminacije lijeka (1, 3, 8). Miastenija gravis je autoimuna bolest koja ubrzava djelovanje nedepolarizirajućih relaksatora zbog smanjenog broja postsinaptičkih receptora (1, 3, 8).

1.2 Primjena GCMS metode za detekciju rokuronija

Monitoring neuromuskulatornog bloka trebao bi biti dio rutinske kliničke prakse tijekom operacije (1). On omogućuje primjenu dodatnih doza mišićnih relaksatora ako su potrebne, daje uvid u budući oporavak mišićne funkcije te povećava sigurnost pacijenta (1). Danas se intenzitet blokade neuromuskulatorne spojnice ocjenjuje stimulacijom odabranog živca i procjenom odgovora inerviranog mišića na taj podražaj (1). Kako bi se povećala sigurnost pacijenata, postigao maksimalni učinak mišićnih relaksatora te odredila precizna doza tijekom operativnih zahvata, potrebno je odrediti analitičku metodu kojom bi se mogla odrediti točna koncentracija lijeka u plazmi pacijenta (9). Plinska kromatografija s masenomspektrometrijom (GCMS) je brza, osjetljiva i selektivna analitička metoda koja se nameće kao metoda izbora za određivanje

navedenog lijeka (9). U današnje vrijeme se koristi za određivanje različitih analita humanih uzoraka u područjima toksikologije i farmakologije (12, 13). Potrebno je razviti postupak pripreme uzorka za određivanje rokuronija u uzorcima plazme, kao i samu metodu, kako bi njegova primjena u budućnosti bila sigurnija (9).

1.3 Validacija

Validacija je postupak kojim dokazujemo da metoda služi svrsi koju smo joj namijenili (10,11). Kako bismo potvrdili validnost metode provodimo eksperimente čije podatke prikupljamo i prikazujemo kao dokaze validnosti (10,11). Analitičke metode trebaju se validirati kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka (11). Svakoj se metodi pristupa individualno, procjenjuje se što se treba napraviti za dokaz svrhovitosti metode (11). Validacija se provodi na četiri najčešće vrste analitičkih postupaka (10). Identifikacijski testovi validiraju se usporedbom referentnog standarda s izmjerenim vrijednostima uzorka (10). Uz validaciju identifikacijskih testova, validiraju se i kvantitativni testovi za dokaz nečistoća u uzorcima, testovi za kontrolu nečistoće uzorka i kvantitativni testovi za ispitivanje lijekova (10). Svaki od validiranih testova ima različite parametre validacije (10). Postoji 8 parametara koje nam osiguravaju dokaz validnosti metode, a to su: specifičnost/selektivnost, linearnost, područje, preciznost, točnost, granica kvantifikacije, granica detekcije, postojanost (10,11). Prije početka validacije potrebno je provjeriti postupak izvođenja analitičke metode (10). Svaki postupak mora biti detaljno opisan kako bi se mogao ponoviti i u drugom laboratoriju (10). Specifičnost/selektivnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti (nečistoće, raspadni produkti, itd.) u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja (10,11). Specifična je ona metoda u kojoj se može odrediti samo jedan specifičan analit bez obzira na ostale komponente uzorka (11). Selektivnost metode je mogućnost metode da određuje više komponenata istodobno, ali da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj (11). Ukoliko validacija metode detektira nedostatak specifičnosti analitičkog postupka tada se taj nedostatak nadoknađuje drugim analitičkim postupcima (10). Linearnost je određena mogućnost metode da unutar određenog mjernog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku (10, 11). Za ispitivanje linearnosti analitičke metode preporuča se najmanje 5 koncentracijskih razina ispitivanog analita (10). Procjenjuje se matematički, jednadžbom pravca ($y = ax + b$) i

koeficijentom korelacije te grafičkim prikazom ovisnosti signala o koncentracijanalita (11). Raspon analitičkog postupka je interval između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost (10). Zaključci o rasponu metode proizlaze iz linearnosti analitičke metode (10). Sužavanjem raspona postižu se bolja točnost i preciznost, a kod uzoraka sa širokim rasponom koncentracija treba se definirati maksimalno područje metode (11). Preciznost analitičkog postupka predstavlja slaganje između niza mjerenja (najčešće tri ponavljanja) dobivenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima (10). Uzorci trebaju biti homogeni, autentični, a ako nije moguće prikupiti takve uzorke, mogu se ispitati pomoću laboratorijski pripremljenih uzoraka (10). Preciznost možemo prikazati kroz tri razine: ponovljivost, međupreciznost i preciznost pod uvjetima obnovljivosti (10, 11). Ponovljivost predstavlja preciznost u istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala, najčešće se tako prikazuje preciznost unutar jednog testa (10). Međupreciznost izražava varijacije unutar istog laboratorija, što uključuje duže vremensko razdoblje i promjenu nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, reagensi, i dr.) (10,11). Preciznost pod uvjetima obnovljivosti predstavlja preciznost među laboratorijima, a ovaj parametar se provodi kod standardizacije metodologije (10). Preciznost analitičke metode prikazuje se standardnom devijacijom, varijacijom i koeficijentom varijacije ponovljenih mjerenja (10). Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (11). Numerički pokazatelj točnosti je sustavno odstupanje metode (eng. *bias*) (11). Ispitivanje točnosti se provodi na više načina: usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima referentne metode, analizom uzoraka poznate koncentracije te dodavanjem poznate koncentracije referentnog materijala u uzorak (11). Rezultati se mogu prikazati grafički kao odnos očekivane i izmjerene vrijednosti (11). Granica detekcije (GD) analitičkog postupka je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati (10). Granica kvantifikacije (GK) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću (10). GD i GK određuju se razrjeđivanjem osnovne otopine (11). Postoji nekoliko pristupa za određivanje GD i GK, ovisno o tome da li je metoda instrumentalna ili ne instrumentalna (10,11). Jedan od pristupa je vizualna procjena koja se može primijeniti i kod instrumentalnih i kod neinstrumentalnih metoda (10,11). Koristi se samo za određivanje GD pomoću uzoraka s poznatom koncentracijom analita i postavljanjem minimalne razine na kojoj se analit može pouzdano detektirati (10,11). Omjer signal

– šum može se primijeniti samo za analitičke metode s baznom linijom (11). Određivanje omjera signal – šum provodi se usporedbom izmjerenih signala iz uzoraka s poznatim niskim koncentracijama analita s onima bez analita u uzorku i uspostavljanjem minimalne koncentracije na kojoj se analit može pouzdano detektirati (10). Omjer 3 : 1 postavlja se za GD, a omjer 10 : 1 za GK (11). Statistički se GD i GK prikazuju na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbama: $GD = 3,3 \sigma / a$ i $GK = 10 \sigma / a$, pri čemu je a nagib, a σ standardna devijacija kalibracijskog pravca (11). Za određivanje GK-a koristi se i relativna standardna devijacija (RSD), tj. pet do šest puta se izmjeri više uzoraka poznate koncentracije analita u uzorku oko moguće GK, izračuna se RSD za svaku koncentraciju te se grafički prikaže odnos RSD - a prema koncentraciji analita u uzorku i iz grafa se odredi GK (11). Postojanost analitičke metode je mjera otpornosti metode na male, namjerne promjene u parametrima metode (10, 11). Važan je dio razvoja metode jer pomaže otkriti optimalne parametre metode te je to mjera pouzdanosti metode (10,11). Pri provedbi validacije analitičkih metoda nije potrebno za svaku metodu odrediti sve parametre (11). Njihov odabir ovisi o namjeni metode, opremi koja se koristi, analitičkim postupcima i uzorcima

1.4 Kromatografija

Kromatografija je separacijska metoda kojom se smjesa tvari razdvaja na skupine ili pojedinačne komponente (12). Nakon razdvajanja smjesa može se obaviti kvantifikacija razdvojenih tvari nekom od fizikalno-kemijskih metoda (12). Glavna podjela kromatografije se vrši prema tehnici izvođenja procesa i to na: tankoslojnu, tekućinsku i plinsku kromatografiju (12). Bez obzira na tehniku izvođenja, kromatografska separacija odvija se stvaranjem ravnoteže između mobilne, pokretne faze i stacionarne, nepokretne faze tj. njihovih sila (12, 13). Stacionarna faza može biti kruta, tekuća (vezana na čvrstom nosaču) ili gel (13). Mobilna faza može biti tekuća ili plinovita (13). Kromatografska kolona je cijev koja sadrži stacionarnu fazu i kroz nju prolazi mobilna faza (13). Jedna od sila zadržava tvar u stacionarnoj fazi, a druga na nju djeluje iz mobilne faze (12). Tvar se veže na stacionarnu fazu, ali zbog djelovanja određenih sila iz mobilne faze prelazi u nju, da bi se ponovno vezala za stacionarnu fazu te se taj proces odvija mnogo puta kroz vrijeme izvođenja kromatografskog procesa uz stalno održavanje ravnoteže između tih dviju faza (12). Taj prostor uspostavljanja ravnoteže između dvije faze naziva se teoretski tavan (12). U tankoslojnoj kromatografiji, o međudjelovanju dviju faza govori nam faktor zadržavanja, dok u tekućinskoj i plinskoj kromatografiji isto međudjelovanje nazivamo vremenom zadržavanja, tj.

vremenom između započinjanja procesa razdvajanja i izlaska tvari s kolone (12). Vrijeme zadržavanja pojedine tvari ovisi o njenim svojstvima, ali i o temperaturi odvijanja procesa (12). Tako porastom temperature sile u stacionarnoj fazi slabe i skraćuju vrijeme zadržavanja (12). Također, brzina protoka mobilne faze utječe na brzinu razdvajanja tvari na stacionarnoj fazi (12). U tijeku procesa možemo mijenjati sastav mobilne faze, ali se i sa promjenom mobilne faze mijenjaju i uvjeti kromatografskog procesa, tj. ravnoteža između te dvije faze (12). Prije kromatografske analize potrebno je izolirati spojeve od interesa kako bi se povećala osjetljivost i spriječila kontaminacija kolone kromatografa (13). Uzorci se pripremaju različitim tehnikama, a to su: percipitacija proteina (PPE), ekstrakcija tekuće – tekuće (LLE, preuzeto od *engl. liquid – liquid extraction*), ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, preuzeto od *engl. solid phase extraction*), hidroliza, derivatizacija (13). Kromatografija je djelotvorna tehnika razdvajanja smjesa tvari i primjena joj je potencijalno izrazito široka, ali u rutini je rijetko metoda izbora zbog svoje dugotrajnosti izvođenja (12). Kromatografske metode primjenjujemo onda kada je jasna njihova prednost nad ostalim metodama, npr. u toksikološkoj kemiji i farmakokinetici (12).

1.4.1 Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija (GC, preuzeto od *engl. Gass Chromatography*) je tehnika razdvajanja supstanci u uzorcima koju su 1952. godine uveli Martin i Suger, a danas je to jedna od najpopularnijih metoda u laboratorijima (12). Sastoji se od mobilne faze koja je inertni plin i stacionarne faze koja može biti tekuća ili kruta (12). Plinsko adsorpcijska kromatografija (GSC, preuzeto od *engl. Gass Solid Chromatography*) kao stacionarnu fazu ima čvrstu tvar velike specifične površine, dok plinsko tekućinska kromatografija (GLC, preuzeto od *engl. Gass Liquid Chromatography*) za stacionarnu fazu ima tekuću tvar na čvrstom nosaču (12, 13). Metodom plinske kromatografije mogu se ispitivati spojevi koji se mogu prevesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C (12, 14). Upareni uzorak injektira se na početak kolone te nošen plinom nosiocem prolazi kroz kolonu gdje se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava pojedinih sastojaka uzorka oni razdvajaju i u različitom vremenu dolaze do detektora (13). Razdvajanje se odvija na temelju hlapljivosti i interakcije uzorka sa stacionarnom fazom (13). To je jednostavna i brza metoda za identifikaciju i kvantifikaciju uzoraka (12). Plinski kromatograf je kompleksan uređaj i sastoji se od 5 osnovnih dijelova: rezervoara za plin nositelj, injektora, kolone s pećnicom, detektora i pisača/računala (12, 13). Uz ove osnovne dijelove mogući su i drugi dodatni

dijelovi kao što su: sakupljači frakcija, generator vodika, automat za nanošenje uzoraka(12). Plin nositelj može biti određen tipom detektora, ali i vrstom uzorka (3). On mora biti inertan plin i to najčešće dušik, helij, vodik ili argon (12, 13). Za uspjeh kromatografije važno je definirati protok plina koji mora biti konstantan (25 – 150 mL/ min) te je bitno da plin nositelj ima vrlo veliku čistoću (99,9 %), a to se može postići pročištačima i filterima za uklanjanje nečistoća (12, 13). Injektor je dio koji omogućuje unošenje uzorka u kromatograf, a može biti automatski i ručni (12, 13). Prevodi lako hlapljive komponente uzorka u plinovito stanje na temperaturi 30 – 50 °C većoj od vrelišta najmanje hlapljive komponente (13). Vrsta injektora ovisi o karakteristikama uzorka, količini i karakteristikama analita, o vrsti kolone i stacionarne faze u koloni (13). Vrste injektora su: injektor bez septuma, s hlađenjem, kod kojih je omogućeno da plin nosač obilazi septum, na ventiliranje, kapilarnih kolona, za automatsko nanošenje i za kontrolu temperature injektora (12). Najčešće korišteni su injektor kapilarnih kolona, injektor s hlađenjem i automatski injektor (13). Injektor kapilarnih kolona ima dvije tehnike, rad s razdijeljenim uzorkom između kolone i septuma te nerazdijeljenim uzorkom (13). Tehnika s razdijeljenim uzorkom koristi se za koncentriranje uzorke kako bi se skratilo vrijeme injektiranja, a tehnika s ne razdijeljenim uzorkom koristi se kod lako hlapljivih spojeva te niskih koncentracija analita (13). Injektori s hlađenjem septuma koriste se za temperiranje septuma kako bi se održala optimalna temperatura i da se uzorak ne bi kondenzirao (12). Injektor za automatsko nanošenje uzoraka koristi se za ubacivanje velikog broja uzoraka i svi uzorci se unose pod istim uvjetima (12, 13). Kolona je najbitniji dio kromatografskog sustava (12). Služi za razdvajanje dviju ili više komponenata u smjesi uzorka (12). Razlikujemo dvije vrste kolona: punjene i kapilarne (12, 13). Punjene kolone su duge cijevi dužine od 1,5 do 10 metara, promjera od 2 do 8 milimetara te mogu biti od čelika, bakra, aluminijske, stakla i plastike (12, 13). Sastoje se od stacionarne faze koja se otopi u organskom otapalu te doda odgovarajućem krutom nosaču (12). Otapalo se do kraja upari u rotavaporu te takvom stacionarnom fazom se napuni kolona i stabilizira zagrijavanjem na 10 – 20 °C nižoj temperaturi od maksimalne temperature propisane za tu stacionarnu fazu (12). Idealni nosači stacionarne faze imaju veliku površinu (1 – 20 m²/g), zrnatu strukturu, minimalna svojstva upijanja uzorka te mehaničku čvrstoću (12). Većina nosača napravljena je od silikagela (12). Stacionarna faza mora također imati određena svojstva kako bi kromatografija bila što uspješnija. Idealna svojstva stacionarne faze su: nehlapljivost, toplinska stabilnost i kemijska inertnost prema otapalu i uzorku koji se na njoj razdvaja (12). Nadalje, izbor stacionarne faze ovisi o sastavu uzorka, odnosno (12). Kapilarne

kolone duge su 5 – 150 metara, unutrašnjeg promjera 0,1 do 0,75 milimetara te su manje djelotvorne (12, 13). Izrađene su od istih materijala kao i punjene, ali nisu punjene nosačem sa stacionarnom fazom nego se stacionarna faza nalazi na unutarnjoj stijenci kolone u obliku filma (12). Najviše se koriste kolone od taljenog kvarca jer su vrlo elastične te ne reagiraju s komponentama iz smjese (12). Pećnica služi za optimalno temperiranje kolone (13). Temperatura kolone ovisi o vrelištu uzorka (13). Bolje razdvajanje se postiže na nižim temperaturama, ali je vrijeme eluiranja duže (13). Kompleksni uzorci, koji sadrže analite različitih vrelišta zahtijevaju temperaturne programe (13). Najčešće se primjenjuju tri temperaturna programa: izotermni, prirodni i linearni (12). Izotermni program je pogodan za jednostavne uzorke gdje se pojedine komponente ne razlikuju previše u polarnosti te su početna i konačna temperatura iste (12). Prirodno programiranje također se koristi za razdvajanje jednostavnih uzoraka, ali će se promjena temperature prikazati kao nelinearni porast temperature u jedinici vremena ($^{\circ}\text{C} / \text{min}$) (12). Linearno programiranje može biti jednostupanjsko ili višestupanjsko (12). Jednostupanjsko se opisuje kao linearni porast temperature kolone između dvije izotermne faze, početne i konačne, dok se višestupanjsko odvija između tri ili više izotermnih faza (12). Ovakva vrsta programiranja koristi se kod složenih smjesa uzoraka (12). Detektori nakon razdvajanja uzorka na komponente mjere promjene u stanju plina nosača koji izlazi iz kolone (12). Dobar detektor mora biti selektivan, osjetljiv, jednostavan za korištenje, neosjetljiv na male promjene temperature i protoka, mora imati linearno radno područje i malu varijaciju kod niskih koncentracija (12, 13). Osjetljivost detektora mjeri se odnosom visine pika i visine bazne linije te se te dvije mjere stavljaju u omjer (13). Minimalna količina tvari koja je može detektirati daje signal barem dva puta jači nego što je signal bazne linije (12). Količina analita razmjerna je signalu koji mjerimo u linearnom radnom području (13). Većini detektora uz plin nosilac potreban je još neki drugi plin za potrebe izgaranja, čišćenja ili kao reagens (13). Postoje univerzalni detektori koji reagiraju na većinu analita i selektivni detektori koji reagiraju samo na neke funkcijske grupe, atome ili strukturne konfiguracije (13). Postoje: plameno ionizacijski (FID, preuzeto od *engl. Flame Ionization Detector*), detektor toplinske vodljivosti (TCD, preuzeto od *engl. Thermal Conductivity Detector*), detektor hvatanja elektrona (ECD, preuzeto od *engl. Electron Capture Detector*), dušik – fosfor detektor (NPD, preuzeto od *engl. Nitrogen Phosphorous Detector*) te maseni spektrometar (MS, preuzeto od *engl. Mass Spectrometry*) (12, 13). Kod FID-a se na kraju kolone vodik pomiješa s plinom nosačem i prolazi u komoru za sagorijevanje gdje se miješa sa zrakom i gori u električnom

polju napona 170 – 200 V(12). Uz ovu elektrodu postoji i kolektorska elektroda te između njih nastaje ionska struja što uzrokuje promjene vodljivosti vodikovog plamena (12). Promjena vodljivosti vodikovog plamena proporcionalna je koncentraciji komponente koja se mjeri (12). Ova vrsta detektora ima visoku osjetljivost i linearnost (13). TCD je univerzalni detektor te detektira sve spojeve koji imaju toplinsku vodljivost različitu od plina nosioca (13). ECD, kao i FID, pripada ionizacijskim detektorima, a mjeri smanjenje struje između elektroda (12). Ovaj detektor je osjetljiv za halogene spojeve i dušičnu skupinu spojeva (12). NPD je detektor za spojeve dušika i fosfora (13). Terminalni ioni nastali grijanjem soli alkalijskim metalima (rubidijev ili cezijev bromid) reagiraju s dušikom iz tvari koja se određuje te je signal detektora razmjern koncentraciji dušika u molekuli (13). Kod kvantifikacije koncentracija komponenata u uzorku određuje se visina pika i površina ispod pika (12).

1.5 Masena spektrometrija (MS)

MS - om se mjere molekulske mase uzorka (13). Sastoji se od tri dijela: ionizatora, masene analize i detekcije (13). Ionizator ionizira plinovite molekule i fragmente nastale cijepanjem udarom elektrona (engl. *electronimpact*, EI) ili kemijskim putem (engl. *chemicalionisation*, CI) (13). Masena analiza razdvaja ionske čestice prema masi i naboju (13). Postoji više vrsta masenih analiza, a najvažnije su tipovi snopva (engl. *beamtype*) (kvadripol, magnetski sektor i TOF) i ionska zamka (engl. *ion trap, orbitrap*) (13). Detekcijom se detektiraju razdvojeni ioni i pohranjuje se signal (13). Detektor je fotomultiplikator ili elektron multiplikator, ovisi o vrsti analizatora(13). Maseni spektrometar je univerzalni detektor (13).

1.6 Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GCMS)

Integrirani sustav plinske kromatografije kao metode razdvajanja uzorka na komponente te masene spektrometrije kao metode detekcije komponenti uzorka, s razvojem je započeo u 50-im godinama prošloga stoljeća (14). Služi za male, hlapljive molekule (13). Metoda GCMS-a (preuzeto od engl. *Gass Chromatography – Mass Spectrometry*) se koristi u sveobuhvatnom toksikološkom probiru, identifikaciji lijekova, sredstava ovisnosti i njihovih metabolita (13). Također, ovaj integrirani sustav se koristi kao potvrdna metoda drugih vrsta kromatografije (12).

Ovom metodom moguće je analizirati količine manje od 10^{-12} grama (12). GCMS se danas koristi za kvantifikaciju i identifikaciju organskim spojevima i gotovo svim mogućim uzorcima (14).

2 CILJEVI

Ciljevi ovog diplomskog rada jesu:

- Ispitati primjerenost GCMS metode za određivanje rokuronija u plazmi
- Ispitati specifičnost/selektivnost, osjetljivost, linearnost, radno područje, točnost, preciznost

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao presječno istraživanje (15). Razvoj analitičke metode i validacija metode provedeni su kroz pripremu standarda, *stock* otopine, pripremu uzorka te primjenu postavki plinske kromatografije i masene spektrometrije kao metode detekcije analita u uzorku.

3.2 Materijali

Tema ovog rada je razvoj i validacija GCMS metode stoga su materijali kemikalije koje se koriste za pripremu metode i uzorak plazme bez lijeka.

3.2.1. Kemikalije

Kemikalije koje su korištene u radu: 1. i.v. otopina rokuronij bromida (Esmeron, 10 mg/mL, otopina za injekciju/infuziju - lijek, N.V. Organon, Nizozemska), 2. etanol, 3. eiklormetan, 4. natrijev dihidrogen fosfat, 5. kalijev jodid, 6. voda, 7. aceton.

3.2.2. Priprema radnih otopina

Stock otopinu činila je intravenska otopina rokuronij bromida (10 mg/mL). Radna standardna otopina sastojala se od prethodno navedene *stock* otopine razrijeđene s etanolom i vodom u omjeru 20 : 1. Izuzevši vodu iz otopine pH treba biti oko 5,5 zbog stabilnosti rokuronija tijekom rada.

3.2.3. Uzorkovanje i priprema uzorka

Uzorak za izradu studije bila je radna standardna otopina s različitim koncentracijama rokuronija te plazme bez lijeka. Plazma je dobivena tako da se uzorak pune krvi izvadi 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 1M natrijeva dihidrogen fosfata i to u omjeru 200 μ L na 1 mL plazme te pohraniti na temperaturi od 20 °C.

3.3 Metode

Metoda koja se koristila za određivanje rokuronija i čija je validacija provedena je plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GCMS) kao metodom kvantifikacije lijeka.

3.3.1. Priprema mobilne faze

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.

3.3.2. Priprema uzorka

Uzorak koji je prethodno zaleđen (opisano uzimanje u materijalima) otapa se na sobnoj temperaturi. 1 mL plazme zakiseli se s 0,2 mL 1M natrijeva dihidrogen fosfata i 1,5 mL kalijeva jodida te 7 mL diklormetana kako bi se provela ekstrakcija uzorka. Slijedi 30 minuta ekstrakcije na mješalici te nakon toga se uzorak centrifugira na 3000 g kroz 15 minuta. Gornju fazu u kojoj se nalazi diklormetan prebaci se u staklenu tubu. U tom sloju se nalazi ekstrahirani rokuronij koji se ukoncentrira u rotavaporu kako bi otapalo isparilo i uzorak koncentrirao. Tako ukoncentrirani uzorak otapa se u 50 µL acetona te 2 µL tako dobivenog uzorka injektira u uređaj GCMS-a putem injektora.

3.3.3. Postavke plinske kromatografije

Uređaj na kojem se radi analiza je GCMS 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 kroz 5 minuta te za svaku minutu duže raste 6 kPa do vršne granice od 69 kPa. Pećnica koja grije kolonu kako bi se uzorak mogao razdvojiti na fragmente, a temperatura pećnice na početku iznosi 120 °C kroz 5 minuta, zatim se pećnica kroz svaku minutu 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.

3.3.4. Postavke masenog spektrometra

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 je postavljen u rasponu od m/z 40 – 600 Daltona.

3.3.5. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu podataka korišten je program Microsoft Office Excel. Osnovni parametri obradili su se metodom deskriptivne statistike te prikazali tablično i grafički. Jednadžba kalibracijskog pravca je $y = ax + b$ te se odredi Pearsonov koeficijent korelacije (k) kao mjera stupnja povezanosti dvije različite veličine. Kada je $k \geq 0,95$ tada je signal mjerne metode proporcionalno ovisan o koncentraciji analita u uzorku. Preciznost, ponovljivost se prikazala kao aritmetička sredina ponovljenih mjerenja te se iz iste izračunala RSD (%). Statistički granica detekcije i kvantifikacije odredila se na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbama: $GD = 3,3 \sigma/a$ i za $GK = 10 \sigma/a$, pri čemu je a nagib, a σ standardna devijacija signala uzorka koji mjerimo GCMS-om.

3.3.6. Validacija metode

Validacija je provedena prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji, ispitala se kroz parametre linearnosti, osjetljivosti ponovljivosti, točnosti, granica detekcije i granica kvantifikacije, selektivnosti.

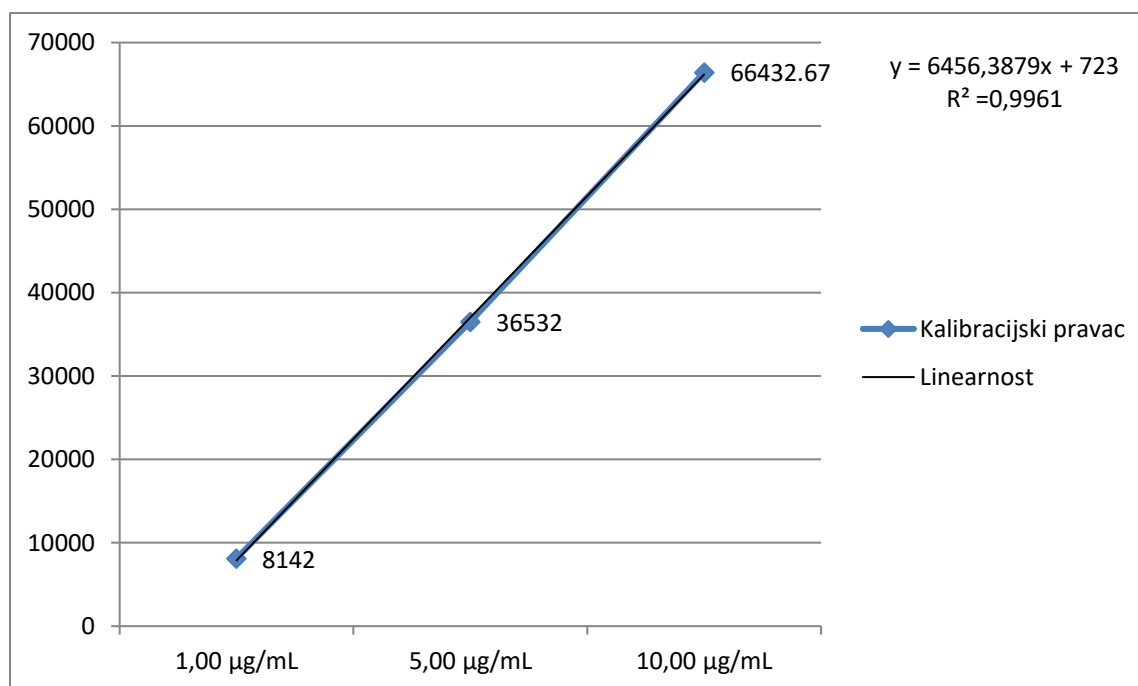
4. REZULTATI

4.1. Linearnost

Otopine za kalibracijski pravac su pripremane iz intravenske otopine rokuronij bromida (10 mg/mL) i različitih volumena etanola kako bi se dobilo šest kalibracijskih točaka te se svaku ponovilo tri puta, a rezultati su prikazani u Tablici 1. Grafički prikazi kalibracijskih pravaca prikazani su na Slici 1., 2. i 3. Na osi apscise (x) prikazane u vrijednosti koncentracija rokuronij bromida u $\mu\text{g/mL}$, dok su na osi ordinate (y) prikazane površine pika kromatografa. Određena je jednadžba kalibracijskog pravaca i koeficijent korelacije (k).

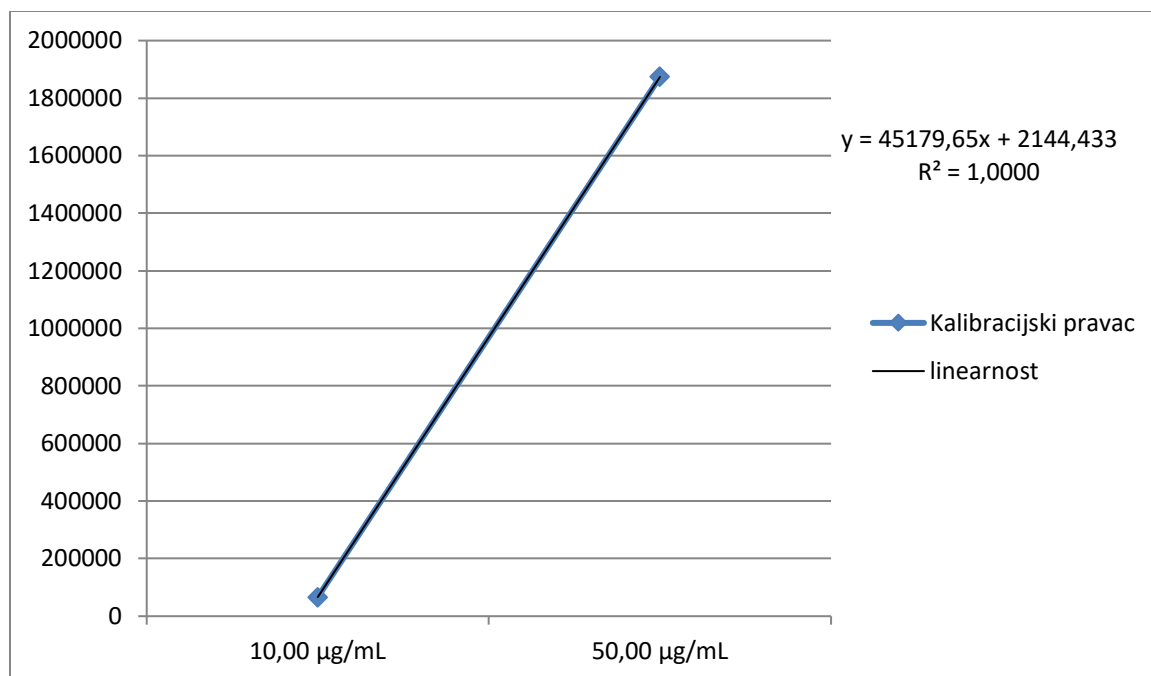
Tablica 1. Rezultati ispitivanja linearnosti

| | | | |
|---|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Dodane koncentracije rokuronij bromida | 1 [µg/mL] | 5 [µg/mL] | 10 [µg/mL] |
| Izmjerene koncentracije rokuronij 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, k | 0,9961 | | |
| Jednadžba pravca | $A = 6456,3879 \cdot c + 723$ | | |
| Dodane koncentracije rokuronij bromida | 10 [µg/mL] | 50 [µg/mL] | |
| Izmjerene koncentracije rokuronij bromida (10 µg / mL, 50 µg / mL) | 9,2108 | 51,9413 | |
| | 9,0420 | 51,3630 | |
| | 8,9100 | 51,9649 | |
| Koeficijent korelacije, k | 1,0000 | | |
| Jednadžba pravca | $A = 45179,65 \cdot c + 2144,433$ | | |
| Dodane koncentracije rokuronij bromida | 50 [µg/mL] | 100 [µg/mL] | 200 [µg/mL] |
| Izmjerene koncentracije rokuronij 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, k | 0,9971 | | |
| Jednadžba pravca | $A = 170418,70 \cdot c + 7479959,34$ | | |



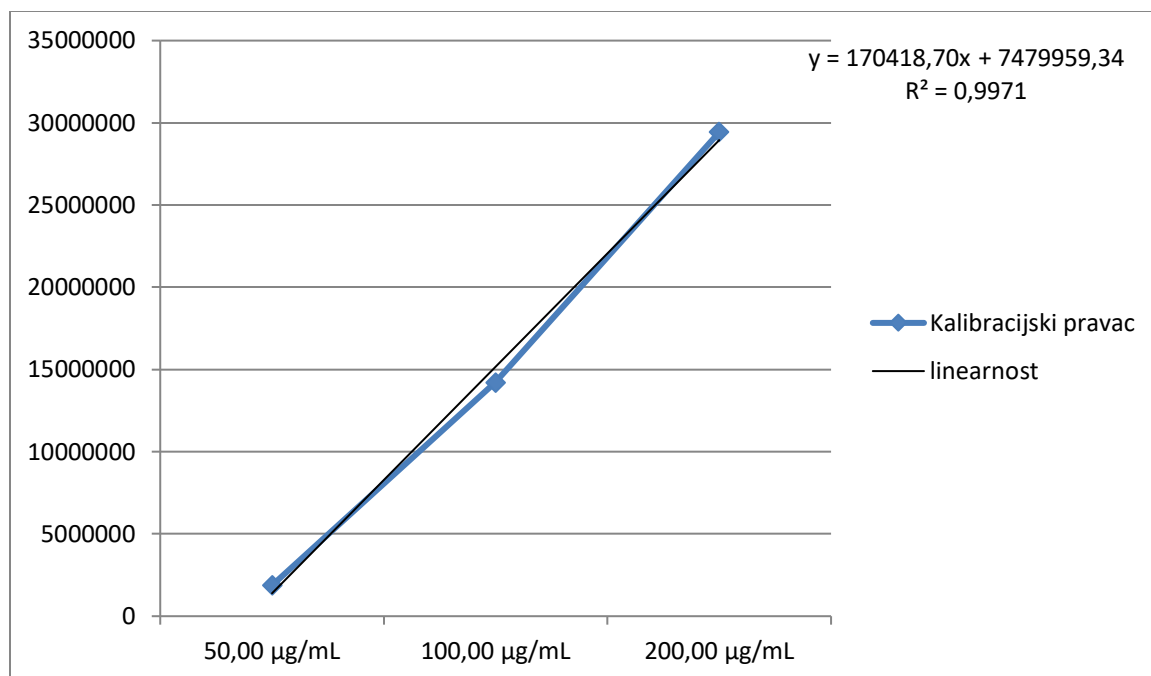
Slika 1. Grafički prikaz kalibracijske krivulje rocuronij bromida koncentracija 1 µg/mL, 5 µg/mL i 10 µg/mL.

Na osi apscisa (x) su prikazane koncentracije rocuronij bromida, a na osi ordinate (y) površine ispod pika kromatografa.



Slika 2. Grafički prikaz kalibracijske krivulje rocuronij bromida koncentracija 10 $\mu\text{g/mL}$ i 50 $\mu\text{g/mL}$.

Na osi apscisa (x) su prikazane koncentracije rocuronij bromida, a na osi ordinate (y) površine ispod pika kromatografa.



Slika 3. Grafički prikaz kalibracijske krivulje rokuronij bromida koncentracija 50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL.

Na osi apscisa (x) su prikazane koncentracije rokuronij bromida, a na osi ordinate (y) površine ispod pika kromatografa.

4.2. Granica detekcije i kvantifikacije

Granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) određene su prema formulama:

$$GD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{S}$$

$$GK = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

Gdje je σ standardna devijacija odsječaka na y osi, a S srednja vrijednost nagiba kalibracijskih pravaca nacrtanih tako da sadrže samo po jednu točku za svaku koncentracijsku razinu i da ne prolaze kroz ishodište. Rezultati GD i GK prikazani su u Tablici 2.

GK je potvrđena kroz šest ponovljenih mjerenja standardne otopine koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$ te su rezultati prikazani u Tablici 3. Uz potvrdu GK standardnom otopinom (Tablica 4.). GK je potvrđena i nacijepljenim uzorkom plazme koncentracijom od 5 $\mu\text{g/mL}$ kroz šest ponovljenih mjerenja

Tablica 2. Granice detekcije i kvantifikacije

| Tvar | Granica detekcije, GD, $[\mu\text{g/mL}]$ | Granica kvantifikacije, GK, $[\mu\text{g/mL}]$ | Potvrđena granica kvantifikacije $[\mu\text{g/mL}]$ |
|-------------------------|---|--|---|
| Rokuronij bromid | 0,553 | 1,676 | 5,00 |

Tablica 3. Potvrda granice kvantifikacije (GK) kroz šest ponovljenih mjerenja standardne otopine koncentracije 5,00 µg/mL

| BROJ ANALIZE | Izmjerene koncentracije standardne otopine od 5,00 [µg/mL] | ISKORIŠTENJE [%] |
|---------------------|---|-------------------------|
| 1 | 4,533 | 90,654 |
| 2 | 4,654 | 93,084 |
| 3 | 4,860 | 97,19 |
| 4 | 4,772 | 95,43 |
| 5 | 4,837 | 96,744 |
| 6 | 4,744 | 94,872 |
| X | 4,733 | 94,66 |
| SD | 0,1223 | 2,45 |
| RSD (%) | 2,6 | 2,58 |

*X – aritmetička sredina

*SD – standardno odstupanje

*RSD – relativno standardno odstupanje

Tablica 4. Potvrda granice kvantifikacije na naciepljenom uzorku plazme koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$

| BROJ ANALIZE | Izmjerene koncentracije naciepljenog uzorka plazme od 5,00 [$\mu\text{g/mL}$] |
|---------------------|---|
| 1 | 4,849 |
| 2 | 4,770 |
| 3 | 4,847 |
| 4 | 5,229 |
| 5 | 5,328 |
| 6 | 5,075 |
| X | 5,016 |
| SD | 0,2294 |
| RSD (%) | 4,6 |

*X – aritmetička sredina

*SD – standardno odstupanje

*RSD – relativno standardno odstupanje

4.3.Preciznost

Preciznost je izraz slaganja među nizom mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima.

Intermedijarna preciznost izračunata je iz podataka dobivenih u dva eksperimenta od različitih analitičara u kojima su po tri, odnosno šest puta ponovljena mjerenja radnog standarda koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$. Također, intermedijarnu preciznost provedena je i na naciepljenim uzorcima plazme koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$, a rezultati ispitivanja preciznosti prikazani su u Tablici 5., 6. i 7.

Tablica 5. 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 rokuronij 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 6.: Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti za rokuronij bromiddobiveni u dva eksperimenta ponovljenim mjerenjem (tri i šest puta) radnog standarda iste koncentracije.

| Rokuronij bromid | | | | | | | |
|-------------------------|---|---|--------------------|------------|-----------------------|-----------------|-----|
| Eksperiment | Dodana konc. radnog standarda, [µg/mL] | Izmjerene konc. rokuronij bromida, [µg/mL] | *X, [µg/mL] | *SD | *s_p | *RSD,[%] | |
| 1 | 5,00 | 4,5327 | 4,682 | 0,1652 | 0,1453 | 3,5 | |
| | 5,00 | 4,6542 | | | | | |
| | 5,00 | 4,8595 | | | | | |
| 2 | 5,00 | 4,5327 | 4,733 | 0,1233 | | 0,1453 | 2,6 |
| | 5,00 | 4,6542 | | | | | |
| | 5,00 | 4,8595 | | | | | |
| | 5,00 | 4,7715 | | | | | |
| | 5,00 | 4,8372 | | | | | |
| | 5,00 | 4,7436 | | | | | |

***X RSD, % 3,05**

*X – Aritmetička sredina

*SD – standardno odstupanje

*s_p – skupno (pooled) standardno odstupanje

*RSD - Relativno standardno odstupanje

* X RSD– Aritmetička sredina relativnog standardnog odstupanja

Tablica 7. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti za rokuronij bromid dobiveni ponovljenim mjerenjem (šest puta) nacijepljenog uzorka plazme iste koncentracije od strane dva različita analitičara (A i B).

| Rokuronij bromid | | | | | | |
|-------------------------|--|---|--------------------|------------|------------------|------------------|
| Analitičar | Dodana konc. rokuronij bromida, [µg/mL] | Izmjerena konc. rokuronij bromida, [µg/mL] | *X, [µg/mL] | *SD | *sp | *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

4.4.Točnost

Točnost metode provedena je ponovljenim mjerenjem (tri mjerenja) standardne otopine koncentracija 1,00; 5,00; 10,00; 50,00; 100,00 $\mu\text{g/mL}$. Uz različite koncentracije standardne otopine, točnost se ispitala i ponovljenim mjerenjem (šest mjerenja) standardne otopine koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$.

Rezultati ispitivanja točnosti prikazani su u Tablici 8. i 9.

Tablica 8. Rezultati ispitivanja točnosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (tri mjerenja) standardne otopine rokuronij bromida koncentracija 1,00; 5,00; 10,00; 50,00; 100,00 µg/mL.

| Dodana koncentracija rokuronij bromida [µg/mL] | Iskorištenje (točnost) izmjerenih koncentracija rokuronij bromida [%] |
|---|--|
| 1,00 | 117,6 |
| 1,00 | 120,0 |
| 1,00 | 108,2 |
| 5,00 | 90,7 |
| 5,00 | 93,1 |
| 5,00 | 97,2 |
| 10,00 | 92,1 |
| 10,00 | 90,4 |
| 10,00 | 89,1 |
| 50,00 | 103,9 |
| 50,00 | 102,7 |
| 50,00 | 103,9 |
| 100,00 | 91,0 |
| 100,00 | 90,3 |
| 100,00 | 92,6 |
| *X točnosti (iskorištenja) | 98,9 |
| *SD | 10,1 |
| *RSD, [%] | 10,3 |

*X – aritmetička sredina

*SD – standardno odstupanje

*RSD – relativno standardno odstupanje

Tablica 9. Rezultati ispitivanja točnosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (šest mjerenja) standardne otopine koncentracije 5,00 µg/mL.

| Broj dodavanja rokuronij bromida koncentracije od 5,00 [µg/ mL] | Izmjerena koncentracija rokuronij bromida [µg / mL] | Iskorištenje rokuronij 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

4.5. Ponovljivost pripreme uzorka

Ponovljivost pripreme uzorka izvodi se tako da dva ili više analitičara (A i B) provode cijeli postupak jednako te se usporede dobiveni rezultati koji su prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Ponovljivost pripreme i iskorištenje uzorka koncentracije 5,00 µg/mL od strane dva 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 | | | |
| *pooledSD | 0,095 | | | |
| *RSD | 2,29 | 0,96 | | |
| *X RSD | 1,62 | | | |

*X– aritmetička sredina

*SD – standardno odstupanje

*X SD – aritmetička sredina standardnog odstupanja

*pooled SD – skupno standardno odstupanje

*RSD – relativno standardno odstupanje

*X RSD – aritmetička sredina relativnog standardnog odstupanja

4.6. Selektivnost

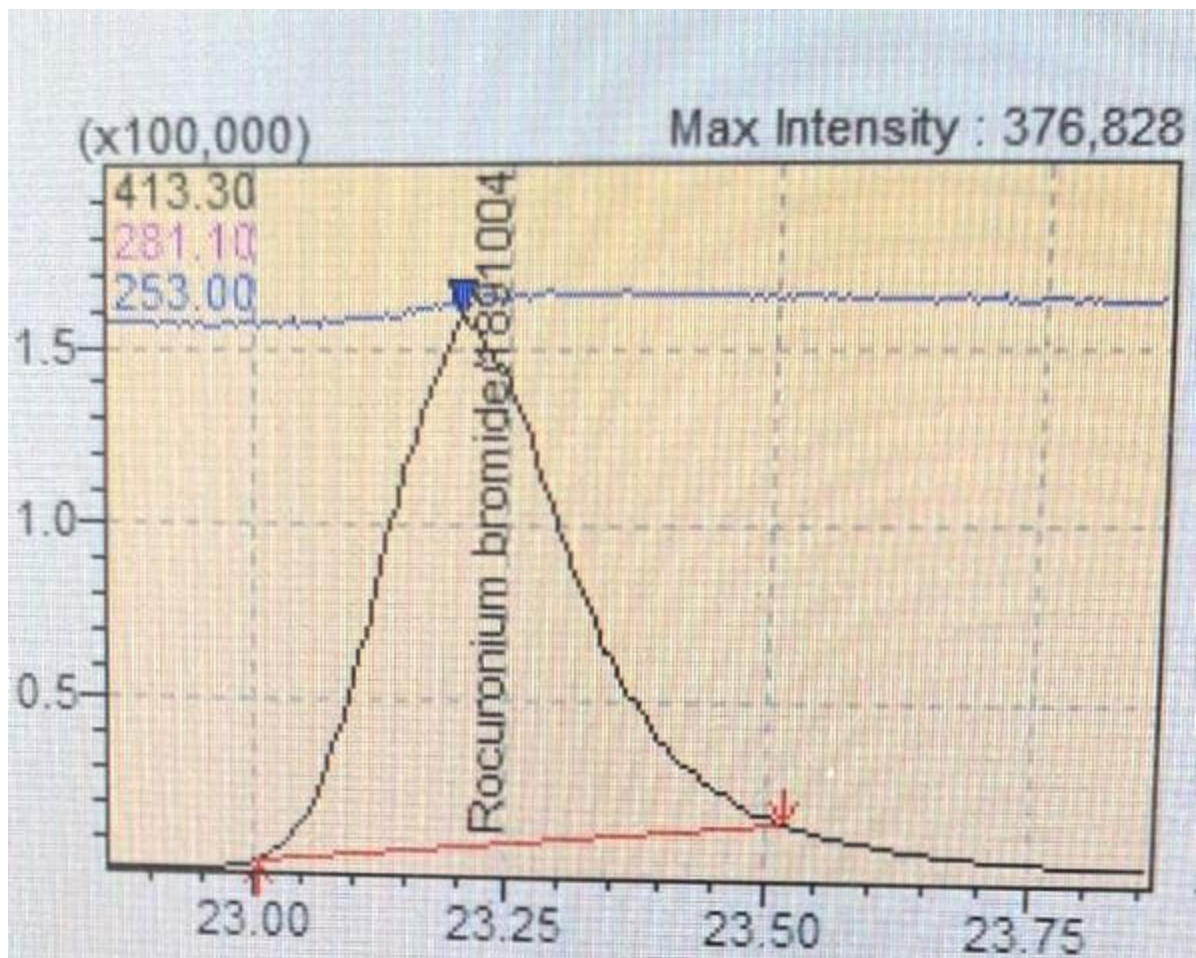
Selektivnost se izražava preko retencijskih vremena pojedinih sastojaka u otopini za kromatografiranje. Kod selektivne metode može se odrediti više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj. Ova metoda je selektivna te je to prikazano u Tablici 11. i na Slici 4.

Tablica 11. Mjere selektivnosti, retencijsko vrijeme (RT, *engl. Retention time*) i spektar masa (m/z) rokuronij bromida

| <i>Analit</i> | *RT (min) | *m /z |
|-------------------------|------------------|--------------|
| Rokuronij bromid | 23,25 | 413 |

*RT – retencijsko vrijeme

*m/z – spektar masa, omjer mase i naboja



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

4.7.Sažetak rezultata

Sažetak rezultata validacijskih parametara, iz kojeg proizlazi zaključak da je metoda primjenjiva u praksi, prikazan je u Tablici 12.

Tablica 12. Sažeti prikaz rezultata validacijskog postupka

| Parametar validacije | Kriterij prihvatljivosti | Rezultat | Zadovoljava kriterije (DA/NE) |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| Granica detekcije (GD) | | | |
| GD | Informacija | 0,553 µg/mL | - |
| Granica kvantifikacije (GK) | | | |
| GK | Informacija | 5 µg/mL | - |
| Preciznost | | | |
| PONOVLJIVOST | RSD ≤ 10 % | RSD = 2,083 % | DA |
| INTERMEDIJARNA PRECIZNOST | RSD ≤ 10 % | RSD = 3,05 % | DA |
| Točnost (iskorištenje) | | | |
| TOČNOST | 90 – 110 % | 98,9 % | DA |
| Linearnost | | | |
| KOEFICIJENT KORELACIJE | $r \geq 0,995$ | 0,9961 | DA |
| SELEKTIVNOST | Informacija (RT) | 23,25 min | - |
| SELEKTIVNOST | Informacija (m/z) | 413 | - |

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju razvijena je metoda za određivanje rokuronija u uzorku plazme te je provedena validacija GCMS metode kroz parametre validacije prema ICH-ovim (engl. *International Committee for Harmonisation*) smjernicama. Validacija je provedena kroz parametre linearnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, preciznosti, točnosti i selektivnosti. Prvi dio istraživanja obuhvaća razvoj metode kroz pripremu uzorka i postavljanja parametara na GCMS-u (opisano u odlomku materijali i metode). Dosadašnji radovi koji uključuju istraživanje rokuronija te njegovu kliničku primjenu temelje se na sličnim postavkama. Određivanje rokuronija u plazmi pacijenta, GCMS metodom, određuje se i drugim analitičkim metodama kao što su tekućinskakromatografija visoke učinkovitosti (HPLC, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) te TOF (engl. *train of four*) (16, 17, 18). Iako su i druge metode vrlo učinkovite, GCMS metoda je osjetljivija te je njome moguće analizirati količine manje od 10^{-12} grama (14). Drugi dio istraživanja obuhvatio je sam postupak validacije GCMS-a za određivanje rokuronija u plazmi kroz pripremanje standardne otopine različitih koncentracija te potvrdu metode nacijepljenim uzorcima plazme.

Linearnost mjerenja ispituje se u području koncentracija od 1 $\mu\text{g/mL}$ do 200 $\mu\text{g/mL}$. Pripravilo se osamnaest otopina standarda (po tri otopine koncentracije 1; 5; 10; 50; 100 i 200 $\mu\text{g/mL}$) (Tablica 1.). Utvrđeno je da je radno područje od 1 do 50 $\mu\text{g/mL}$ najprihvatljivije za određivanje lijeka u uzorku. Koeficijent korelacije je $k = 0,9961$ te time zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti ($k \geq 0,995$).

Granice detekcije i kvantifikacije određene su prema formulama navedenim u prikazu rezultata. GD je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću preciznost i istinitost. Rezultati dobivenih vrijednosti GD-a i GK-a (Tablica 2.) potvrđeni su kroz dva postupka. Prvo kroz šest ponovljenih mjerenja standardne otopine koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$., te nacijepljenim uzorkom plazme koncentracije 5,00 $\mu\text{g/mL}$ simulirajući stvarne uvjete.

Preciznost je potvrđena na temelju podataka dobivenih ponovljenim mjerenjem po tri puta, šest različitih koncentracija radnih standardnih otopina. Intermedijarnu preciznost izračunava se iz podataka dobivenih u dva eksperimenta od različitih analitičara u kojima su po tri, odnosno šest puta ponovljena mjerenja radnog standarda koncentracije 5 $\mu\text{g/mL}$. Također intermedijarna preciznost u ovom radu je dodatno provedena ponovljenim mjerenjem (šest puta) nacijepljenog uzorka iste koncentracije od strane dva različita analitičara. Ponovljivost iznosi 2,05% što

zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD \leq 10\%$) te također intermedijarna preciznost radnog standarda koncentracije $5,00 \mu\text{g/mL}$ zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD \leq 10\%$), a ona iznosi $3,05\%$. Isto tako, nacijepljivanjem uzorka plazme koncentracijom od $5,00 \mu\text{g/mL}$ od strane dva analitičara (A i B) dobivenaje zadovoljavajuća preciznost prema postavljenim kriterijima prihvatljivosti ($RSD \leq 10\%$) te još jednom dokazano da je metoda ponovljiva, tj. precizna.

Točnost (iskorištenje) se izračunava na temelju podataka dobivenih ponovljenim mjerenjem po tri puta, tri različite koncentracije radnih standardnih otopina. Provedeno je i ispitivanje točnosti metode kroz ponovljena mjerenja (šest mjerenja) standardne otopine koncentracije $5,0 \mu\text{g/mL}$. Točnost, odnosno iskorištenje kod određivanja rokuronija iznosi $98,9\%$, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (točnost $\pm 10\%$, tj. iskorištenje $90 - 110\%$).

Ponovljivost pripreme uzorka provela se kroz pripremu uzorka od strane dva analitičara (A i B). Izračunom srednje vrijednosti RSD-a (relativno standardno odstupanje), koji iznosi $1,62\%$, utvrđeno je da ponovljivost pripreme uzorka zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$. Točnost pripreme uzorka zadovoljavajuća je kod oba analitičara. Kriterij prihvatljivosti je od 90 do 110% te sukladno tome iskorištenje A iznosi $100,32\%$, a B $107,17\%$.

Selektivnost se izražava preko retencijskih vremena (RT) i spektra masa (m/z) pojedinih sastojaka u otopini za kromatografiranje. Svaka analitička metoda mora biti selektivna da bi nam omogućila točno i specifično, selektivno određivanje pojedinog analita u uzorku.

Uspoređujući ovo istraživanje sa do sada tematski sličnim istraživanjima postoji sličnosti u pripremi uzorka, postavljanju metode, ali i razlike u dijelovima opreme (9, 18). U ovom radu je stacionarnu fazu činila kolona RTX 5MS ($30 \text{ m} * 0,25 \text{ mm}$, film $0,25 \mu\text{m}$), a u jednom od usporednih radova kapilarna kolona DB - 5 ($15 \text{ m}, 30, 25 \text{ mm}, 0, 25 \text{ mm}$) (9). Vrsta kolone, kao i njena duljina bitne su za razdvajanje analita u uzorku pa tako ne možemo ni očekivati iste rezultate jer retencijsko vrijeme (RT) nije isto. Tako je RT u ovomradu $23,25$ minuta, dok je u drugim radovima $14,8$; $15,7$ i $16,8$ minuta što govori u prilog važnosti vrste kolone(9,18). Spektar masa (m/z) je isti u većini radova, što govori u prilog selektivnosti metode i postavlja GCMS metodu kao metodu izbora u farmakologiji za određivanje različitih supstanci (9,18). Selektivnost metode dokazana je u plazmama u koje su dodavane različite koncentracije rokuronij bromida te se na m/z 413 u $23,25$ minuti na kromatogramu pojavio pik (Slika 4.). Granica kvantifikacije u svim radovima nije ista pa je tako najniža granica kvantifikacije 26 ng/mL dok je to u ovom radu 1676

ng/ mL (9). Najniža koncentracija analita koja može biti detektirana je 553 ng/mL, što govori u prilog osjetljivosti metode, ali u drugim radovima je još i niža (9, 18). Linearnost se postiže u svim radovima sličnih tema, ali u drugim radnim područjima (9,18). Sve to upućuje da ako su priprema uzorka i postavke GCMS-a drugačije, ne dobivamo iste vrijednosti validacijskog postupka, a tako ni analize realnih uzoraka plazme. Ukoliko laboratorij uvodi GCMS metodu za određivanje rokuronij bromida u uzorku plazme trebala bi se provesti validacija kako bi rezultati analize bili pouzdani, ali i kako bi se kroz neko buduće vrijeme mogla provesti standardizacija postupka (19). Ovim radom smo razvili cijelu metodu, od sakupljanja uzorka, njegovog čuvanja, pripreme te postavki GCMS analizatora. Cijeli postupak je ponovljen i na realnim uzorcima plazmi nacijepujući ih različitim koncentracijama rokuronij bromida te tako potvrđena validaciju metode kroz različite parametre. GCMS metoda bi se mogla koristiti u kliničkoj primjeni te osigurati veću pouzdanost korištenja mišićnih relaksatora u medicinskim postupcima. Bitno je da se uzorci budućih pacijenata zakisele s otopinom natrijeva dihidrogen fosfata na pH 5,5 te zalede kako se rokuronij prisutan u plazmi ne bi razgradio (9). Prema drugim istraživanjima rokuronij se može, osim u plazmi, odrediti i u urinu jer se najčešće eliminira nepromijenjen (20). GCMS je osjetljiva i visoko selektivna metoda za određivanje rokuronija u uzorku plazme te se uspješno može koristiti u daljnjim farmakološkim istraživanjima, ali i u kliničkoj primjeni. Postoji mali broj istraživanja koja povezuju rokuronij i GCMS kao metodu izbora i stoga bi ovaj rad mogao doprinijeti razvoju i uvođenju prakse određivanja rokuronija u uzorcima plazmi pacijenata.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- GCMS je primjerena analitička metoda za određivanja rokuronija u plazmi zbog svoje selektivnosti i osjetljivosti.
- Provođenjem validacije analitičke metode za određivanje rokuronija u plazmi potvrđeno je da odabrani validacijski parametri (linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, preciznost, intermedijarna preciznost, točnost, selektivnost) zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti.
- Određivanje rokuronija u plazmi važno je za određivanje njegove koncentracije u plazmi pacijenata te pravilno doziranje lijeka tijekom medicinskih zahvata, a koristi se i kao indikator eliminacije lijeka iz organizma.
- Analitička metoda, GCMS, za određivanje rokuronija u plazmi primjenjiva je u farmakološkim istraživanjima, ali ima i kliničku primjenu.

7. SAŽETAK

Uvod: Određivanje rokuronija u plazmi važna je dijagnostička pretraga koja omogućuje pravilno doziranje rokuronija, mišićnog relaksatora, u medicinskim postupcima. Zbog farmakokinetičkih i farmakodinamskih osobina rokuronija, bitno je razviti i validirati metodu koja će biti primjenjiva u kliničkoj praksi. GCMS je vrlo osjetljiva i selektivna analitička metoda te je potencijalna metoda za standardno određivanje rokuronija u plazmi.

Ciljevi istraživanja: Ciljevi ovog rada bili su: ispitati primjerenost GCMS metode za određivanje rokuronija u plazmi, ispitati specifičnost/selektivnost, osjetljivost, linearnost, radno područje, točnost, preciznost.

Materijali i metode: Materijali korišteni u ovom radu jesu standardne otopine različitih omjera, plazme bez lijeka te i.v. otopina rokuronij bromida (Esmeron, 10 mg/mL, otopina za injekciju/infuziju - lijek, N.V. Organon, Nizozemska), etanol, diklormetan, natrijev dihidrogen fosfat, kalijev jodid, voda, aceton. Kao metoda korištena je plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GCMS).

Rezultati: Rezultati dobiveni validacijskim postupkom jesu: GD 0,553 µg/mL, GK (potvrđena) 5 µg/mL, preciznost RSD = 2,083 % (RSD ≤ 10 %), intermedijarna preciznost RSD = 3,05 % (RSD ≤ 10 %), točnost 98,9 % (90 – 110 %), Koeficijent korelacije $k = 0,9961$ ($r \geq 0,995$), selektivnost metode – RT = 23,25 min, m/z = 413. Rezultati validacijskog postupka potvrđeni su i rezultatima koji su dobiveni analizom uzoraka plazme naciijepljenih različitim koncentracijama rokuronija.

Zaključak: Provođenjem validacije metode GCMS-a potvrđeno je kako se svi provedeni validacijski parametri nalaze u kriteriju prihvatljivosti, iz čega proizlazi zaključak kako je metoda primjenjiva za određivanje rokuronija u plazmi.

- Ključne riječi: miorelaksatori, rokuronij, rokuronij bromid, validacija, GCMS

8. SUMMARY

Development and validation of GCMS method for determining rocuronium in plasma

Introduction: The determination of rocuronium in plasma is an important diagnostic test that enables proper dosing of rocuronium, a muscle relaxant, in medical procedures. Due to the purpose of rocuronium, it is important to develop and validate a method that will be applicable in clinical practice. GCMS is a very sensitive and selective analytical method that is a potential method for the determination of rocuronium in plasma.

Research goals: The objectives of this paper are: to examine the suitability of the GCMS method for the determination of rocuronium in plasma, to examine the specificity/selectivity, sensitivity, linearity, working range, accuracy, precision.

Materials and methods: The material used in this paper are standard solutions of different ratios, drug-free plasmas and rocuronium bromide intravenous solution (Esmeron, 10 mg/mL, solution for injection/intravenous therapy - drug, N.V. Organon, the Netherlands), ethanol, dichloromethane, sodium dihydrogenphosphate, potassium iodide, water, acetone. Gas chromatography with mass spectrometry (GCMS) was used as the method.

Results: The results obtained by the validation procedure are: GD 0,553 µg/mL, GK (confirmed) 5 µg/mL, precision RSD = 2,083% ($RSD \leq 10\%$), intermediate precision RSD = 3,05% ($RSD \leq 10\%$), accuracy 98,9% (90 – 110%), correlation factor $k = 0,9961$ ($r \geq 0,995$), method selectivity – RT = 23,25 min, m/z = 413. The results of the validation procedure have also been confirmed by the results obtained by the analysis of plasma samples inoculated with different concentrations of rocuronium.

Conclusion: The validation of the GCMS method has confirmed that all the performed validation parameters are within the acceptance criterion, which leads to the conclusion that the method is applicable for the determination of rocuronium in plasma.

Keywords: muscle relaxants, rocuronium, rocuronium bromide, validation, GCMS

9. LITERATURA

1. Šakić Zdravčević K i suradnici, Klinička anesteziologija, reanimatologija i intenzivno liječenje, 1. izd. Osijek: Medicinski fakultet; 2008.

2. Fisher DM. Musclerelaxans. U: Longnecker DE, Murphy FL, ur. Dripps/ Eckenhoff/ Vandam: Introduction to Anesthesia, Saunders Co, SAD 1997. Str 110 – 123.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, Farmakologija, 5 izd. Zagreb: Tehnička knjiga; 2006.
4. Varrique RM, Lauretti GR, Matsumoto JA, Lanchote VL, Moraes NV, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium in young adult and elderly patients undergoing electives urgery, J Pharm Pharmacol. 2016; 68: 1351-58
5. McLachlan AJ etal., Variability in response to medicines in older people: phenotypic and genotypic factors, Clin Pharmacol Ther. 2009; 85: 431–33.
6. Klotz U, Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly, Drug Metab Rev. 2009; 41: 67–76.
7. Kruijt Spanjer MR etal., Pharmacology in the elderly and neweran aesthesi drugs, Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2011; 25: 355–65.
8. Sandker GW etal., Characterizationof transport inisolated human hepatocytes. A study with the bile acid taurocholic acid, the uncharged ouabain and the organiccations vecuronium and rocuronium, BiochemPharmacol. 1994; 47: 2193–200.
9. Gao L, Ramzan I, Baker B, Gas chromatographic–massspectrometric assay for rocuronium with potential for quantifying its metabolite, 17-desacetylrocuronium, in human plasma, J Chromatogr. 2001; 757: 207-14.
10. International Committee for Harmonisation (ICH), Validationofanalyticalprocedures: textandmethodology q2(r1), CurrentStep 4 versionParentGuidelinedated 27 October 1994 (ComplementaryGuideline on Methodologydated 6 November 1996 incorporatedinNovember 2005). Dostupno na adresi: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> Datum pristupa: 4.3.2020.
11. Lazarić K, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, Svijet po mjeri 1, 2012.; 61-4
12. Štraus B, Stavljenić Rukavina A, Plavšić F i suradnici, Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju, Zagreb: Medicinska naklada; 1997.
13. Duraković Z. i sur., Klinička toksikologija, Zagreb: Grafos; 2000.
14. A. Hites R, Development of Gas Chromatographic Mass Spectrometry, Anal Chem. 2016; 88: 6955-61
15. Ivana Kolčić, Ariana Vorko Jović, Epidemiologija: Medicinska naklada; 2012.

16. Long Wang, Mai - TaoZhou, Cai - Yang Chen, Wen Yin, Da - XiangWen, Chi - Wai Cheung, Li - Qun Yang, Wei - FengYu, Increased Renal Clearance of Rocuronium Compensates for Chronic Loss of Bile Excretion, via up regulation of Oatp, Nature, scientific reports, 2017.
17. Olaf Wegener Guido, Harms, Dietrich A. Volmer, HeikoHayen, Structural characterization of a degradation product of rocuronium using nano electrospray - high resolution mass spectrometry, Drug testing and analysis, 2015.
18. Gao L, Ramzan I, Baker B, RequirementsandPlasmaConcentrations at Constant Levels of Neuromuscular Paralysis During Three Phases of Liver Transplantation, Journal of Clinical Anesthesia 2003; 15: 257 - 266.
19. Jozo Ćorić, Kontrola kvalitete rada u laboratorijskoj medicini: Fakultet zdravstvenih studija u Sarajevu; 2014.
20. J.H. Proost, L.I. Eriksson, R.K. Mirakhur, G. Poest, J.M.K.H. Wierda, Br. J. Anesthesia 2000; 85: 717

10. ŽIVOTOPIS

ANAMARIJA SMIRČIĆ

Adresa: Lošinjskih brodograditelja 18, Mali Lošinj

Mobitel: 00 385 91 6230 901

E-mail adresa:anamarijasmircic@gmail.com

OBRAZOVANJE

- Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku 2018.-2020.
- Preddiplomski stručni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci 2012.-2015.
- Opća gimnazija Mali Lošinj 2008.-2012.

RADNO ISKUSTVO

- KBC Rijeka, pripravnički staž, veljača 2016. – veljača 2017.
- Vodoopskrba i odvodnja Cres – Lošinj, sezonski rad (lipanj – listopad) 2017. – 2019.
- 2020. Dom zdravlja Primorsko-goranske županije, Ispostava Mali Lošinj

ČLANSTVO

- Rotaract klub Lošinj
- Tenis klub „Lošinj – Jadranka“