

Validasi Metode Analisis LC-MS/MS Pada Penetapan Kadar Isoniazid Dalam Serum Tikus

Validation of Analytical Method LC MS/MS for Determination Isoniazid in Rats Serum

Andi Suhendi^{1,2*}, Abdul Rohman³, Djoko Wahyono⁴, Arief Nurrochmad⁴, Tasya F Manggo²

¹Doctoral Student, Faculty of Pharmacy, University of Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, Indonesia

³Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁴Pharmacology and Clinical Pharmacy Department, Faculty of Pharmacy, University of Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author : abdulkimfar@gmail.com

Received: 1 Desember 2023; Accepted: 26 Desember 2023; Published: 30 Desember 2023

Abstrak

Penetapan kadar isoniazid untuk therapeutic drug monitoring harus menghasilkan nilai yang valid, sehingga validasi metode analisis dengan LC-MS/MS perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan parameter-parameter validasi metode yaitu akurasi, presisi, linieritas, LOQ dan LOD. Preparasi sampel dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan asetonitril dan metanol (2:1). Sistem kromatografi dikembangkan dengan kolom C18 (ACQUITY UPLC® HSS T3 1,8 µm, 2,1 × 100 mm), fase gerak adalah asetonitril 70% dengan 0,1% asam format (A), air dengan 0,1% asam format (B), serta metanol (C) dengan laju alir 0,3 mL/menit, dengan gradient, deteksi dioperasikan pada mode ESI+ dengan multiple reaction monitoring (MRM) pada transisi 138 m/z → 121 m/z. Hasil penelitian diperoleh bahwa metode akurat dengan % recovery 96% - 113% dan RSD 2,4 ± 0,9%. Nilai presisi diperoleh dengan rerata RSD 3,7 ± 2,4% untuk intra hari dan 4,1 ± 2,3% untuk antar hari. Linieritas menunjukkan hasil yang baik dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9956 pada uji dengan 5 konsentrasi berbeda. Nilai LOQ dan LOD didapatkan dari persamaan regresi linier berturut-turut sebesar 0,1987 µg/mL dan 0,0656 µg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode analisis LC-M/MS valid untuk penetapan kadar isoniazid dalam serum tikus.

Kata Kunci: Validasi, LCMS/MS, isoniazid, Multiple Reaction Monitoring (MRM), serum tikus

Abstract

Determination of isoniazid concentration for therapeutic drug monitoring must produce valid values, so validation of the analytical method of LC-MS/MS needs to be carried out. This research aims to obtain valid method of LCMS/MS in order to determination isoniazid in rats serum. Sample preparation was carried out using the liquid-liquid extraction method using acetonitrile and methanol (2:1). The chromatography system was developed with a C18 column (ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 µm, 2.1 × 100 mm), the mobile phase was 70% acetonitrile with 0.1% formic acid (A), water with 0.1% formic acid (B), as well as methanol (C) with a flow rate of 0.3 mL/min, with gradient elution, detection in ESI+ mode with multiple reaction monitoring (MRM) at the transition 138 m/z → 121 m/z. The research results showed that the method was accurate with a % recovery of 96 - 113% and an RSD of 2.4 ± 0.9%. The precision value was obtained with an average RSD of 3.7 ± 2.4% for intra-day and 4.1 ± 2.3% for inter-day. Linearity showed good results with a correlation coefficient of 0.9956 in tests with 5 different concentrations. The LOQ and LOD values obtained from the linear regression equation were 0.1987 µg/mL and 0.0656 µg/mL respectively. The results showed that the LC-M/MS method was valid for determining isoniazid levels in rat serum.

Keywords: validation, LCMS/MS, isoniazid, Multiple Reaction Monitoring (MRM), rats serum

PENDAHULUAN

Isoniazid atau dikenal juga sebagai INH merupakan salah satu first line drug therapy antituberkulosis yang paling efektif untuk mengatasi penyakit tuberkulosis (WHO, 2023). Namun, terdapat beberapa kasus telah dilaporkan mengenai pasien yang mengalami kegagalan terapi, kekambuhan, dan resistensi obat selama menjalani terapi (Chegou et al., 2011; Lei et al., 2019). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pasipanodya et al., (2013), keberhasilan dalam terapi tuberkulosis dengan INH dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah konsentrasi obat dalam darah. Beberapa penelitian lainnya juga melaporkan bahwa konsentrasi INH dalam darah yang rendah tidak hanya menyebabkan kegagalan terapi dan kekambuhan, tetapi juga menyebabkan resistensi terhadap obat (Heysell et al., 2010; Prahll et al., 2014). Berdasarkan hal tersebut, pemantauan kadar obat diperlukan untuk menjamin tercapainya tujuan terapi dan meminimalkan terjadinya kegagalan pengobatan dengan cara mengoptimalkan konsentrasi INH (Alsultan and Peloquin, 2014; Babalik et al., 2011).

Penetapan kadar INH penting untuk menentukan bioavailabilitasnya, dengan nilai kadar puncak (C_{max}) INH berada pada rentang 3–6 µg/mL sehingga dalam penentuannya diperlukan metode yang sensitif. Penggunaan INH dalam terapi tuberkulosis umumnya tersedia dalam bentuk fixed dose combination sehingga metode yang selektif sangat dibutuhkan (Alsultan and Peloquin, 2014; Pratima and Gadikar, 2018; Vyas et al., 2022; Xing et al., 2021; Zheng et al., 2020). Metode lain yang sering digunakan adalah HPLC-UV (Jiang et al., 2022; Liu et al., 2013; Pouplin et al., 2016), namun metode ini tidak memiliki sensitivitas, selektivitas dan waktu yang cepat seperti LCMS .

Analisis dengan LC-MS/MS memberikan keuntungan karena cakupan senyawa yang dianalisis begitu luas mencakup senyawa thermolabile dan senyawa dengan polaritas tinggi (Harmita et al., 2019).

Validasi metode analisis penting untuk memastikan bahwa metode yang digunakan sudah valid serta kesalahan yang kemungkinan terjadi dalam proses pengujian masih dalam batas toleransi (Bhagat and Saudagar, 2019; Vyas et al., 2022). Validasi metode analisis memiliki beberapa parameter seperti presisi, akurasi, linieritas, batas identifikasi dan batas kuantifikasi. Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa penetapan kadar obat dalam serum dan untuk studi farmakokinetik diperlukan metode yang tervalidasi. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk menetapkan validitas metode analisis LC-MS/MS untuk penetapan kadar INH dalam serum tikus dengan perolehan parameter-parameter validasi metode analisis.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah LC-MS/MS (Waters Xevo TQD) kolom C18 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm) (ACQUITY UPLC® HSS T3).

Bahan yang digunakan yaitu isoniazid (LKT Labs, USA), metanol (LCMS grade, Tedia, USA), asetonitril (LCMS grade, Tedia, USA), Ultra pure water (PT. Kromtekindo), asam format (Pro analytical, Merck) dan serum blank tikus (Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi UMS).

Fase gerak

Fase Gerak; fase gerak A: asetonitril + asam format 0,%; fase gerak B: air + asam format 0,1%, dan fase gerak C: metanol. Sistem gradient dengan variasi komposisi diatur pada 0-0,5; 0,5-1; 1-1,5; 3-4; dan 5-7 menit dengan laju alir 0,3 mL/menit (**Tabel 1**).

Setting MS (Mass Spectrometry)

Electrospray ionisation (ESI), ESI+(positif), *capillary cone* 35 V, *collision energy* 18 V dan *dessolvation temperature* 600°C. Detektor

massa dilakukan dengan reaksi ganda (MRM) pada transisi 138 m/z → 121 m/z

Tabel 1. Komposisi fase gerak (A), (B), dan (C) dengan sistem gradien

Waktu (menit)	Laju alir (mL/menit)	Fase gerak A (%)	Fase gerak B (%)	Fase gerak C (%)
0,50	0,300	2,0	95,0	3,0
1,00	0,300	30,0	25,0	45,0
1,50	0,300	27,0	17,0	56,0
3,00	0,300	32,0	3,0	65,0
4,00	0,300	1,0	97,0	2,0
5,00	0,300	2,0	97,0	1,0
7,00	0,300	2,0	97,0	1,0

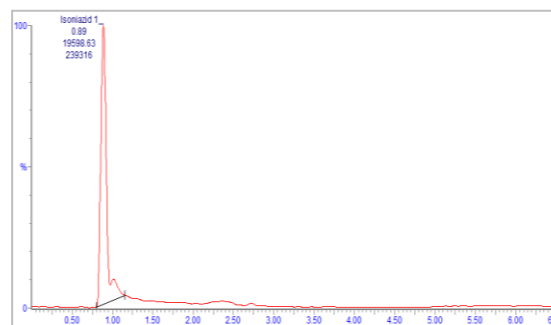
Pembuatan kurva baku

Kurva baku dibuat menjadi lima tingkat dengan variasi konsentrasi berbeda yaitu 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 dan 1 µg/mL. Preparasi dilakukan dengan diambil serum blank sejumlah 100 µL, larutan standar INH 100 µL (dibuat pada masing-masing konsentrasi), ditambahkan fase geraknya sampai volume 1000 µL. Campuran dihomogenisasi dengan vortek selama 20 detik. Campuran didiamkan di dalam freezer selama ± 5 menit, untuk optimalisasi pengendapan, dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dan disaring dengan ukuran 0,2 µm, dan ditampung pada vial.

Akurasi dan presisi

Pengukuran akurasi dilakukan dengan uji pada 5 titik konsentrasi yaitu 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 dan 1,0 µg/mL. Setiap titik dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Larutan dibuat dengan cara seperti pada prosedur kurva baku. Penentuan akurasi pada tiap konsentrasi dilihat dalam nilai persen perolehan kembali (% recovery) dengan nilai keberterimaan berada dalam ± 15% dari nilai nominal konsentrasi (EMA, 2022; FDA, 2018).

Nilai presisi didapatkan dari uji dengan 3 variasi konsentrasi yaitu pada 0,05; 0,3; dan 1



Gambar 1. Kromatogram isoniazid dalam serum, C18 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm; HSS T3), air:methanol:asetonitril secara gradien, ESI+, MRM pada transisi 138 m/z → 121 m/z

µg/mL, yang direplikasi 3 kali dan dikerjakan pada 3 hari yang berbeda. Presisi dinyatakan dalam relative standard deviation (RSD) dari sejumlah sampel yang diuji. Nilai keberterimaan presisi yaitu RSD ≤ 15% (EMA, 2022; FDA, 2018).

LOQ (limit of quantification)

Batas kuantifikasi atau LOQ merupakan nilai konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat diidentifikasi pada kondisi operasional metode yang digunakan. Penentuan batas kuantifikasi dilakukan secara statistik dengan rumus :

$$LOQ = 10\sigma/S \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

σ : standar deviasi respon; S : kemiringan, atau nilai slope (b) pada persamaan linieritas.

LOD (limit of detection)

Batas deteksi merupakan konsentrasi terendah analit yang masih dapat terdeteksi, namun tidak harus terkuantifikasi (Harmita et al., 2019). Batas deteksi analit dihitung menggunakan rumus:

$$LOD = 3,3\sigma/S \dots\dots\dots(2).$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fase gerak asetonitril, metanol dan air sangat kompatibel untuk kolom C18 karena bersifat lebih polar daripada fase diam (Harmita et al., 2019). Pemisahan dengan sistem kromatografi tersebut menghasilkan

waktu retensi INH terdeteksi di 0,89 menit dengan puncak yang tajam (**Gambar 1**). Asam format ditambahkan untuk mengoptimalkan proses ionisasi. Asam format

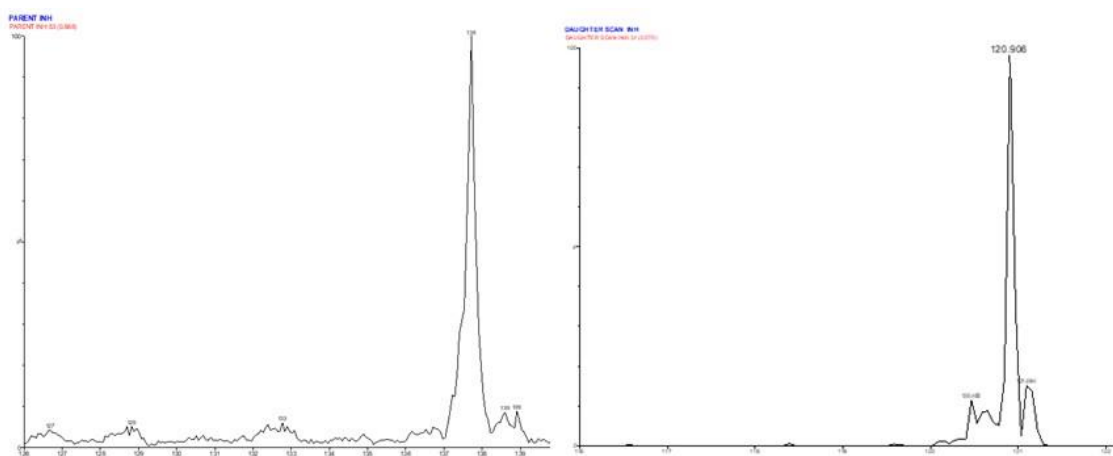
tuning didapatkan mode ESI pada ESI + (positif), *capillary cone* 35 V, *collision energy* 18 V dan *dessolvation temperature* 600°C. Berdasarkan struktur INH, terdapat gugus

Tabel 2. Nilai perhitungan uji akurasi isoniazid (n=3)

Kadar teoritik terukur (µg/mL)	Rerata Kadar terukur (µg/mL) ± SD	Perolehan kembali (%) ± SD	RSD (%)
0,05	0,057 ± 0,001	113,0 ± 1,0	0,9
0,1	0,092 ± 0,002	96,3 ± 3,2	3,3
0,3	0,273 ± 0,016	99,7 ± 2,5	2,5
0,5	0,557 ± 0,027	99,7 ± 2,5	2,5
1,0	1,038 ± 0,131	99,7 ± 2,5	2,5

umum digunakan sebagai tambahan pada fase gerak karena menyediakan proton dengan menghasilkan ion $[M+H]^+$ dalam mode ionisasi positif (Kafeenah et al., 2019).

fungsional amino yang mengandung atom N sehingga mudah menerima ion H^+ (Luyen et al., 2018). Hasil proses tuning (**Gambar 2**) didapatkan parent ion yaitu 138 m/z dan



Gambar 2. Hasil tuning parent ion (kiri) dan daughter ion (kanan) ESI+(positif), capillary cone 35 V, collision energy 18 V dan dessolvation temperature 600°C

Tipe ionisasi dan kondisi MS yang memberikan respon sensitif dilakukan dengan nama tuning. Hasilnya didapatkan bahwa ionisasi yang memberikan sensitivitas yang tinggi yaitu ESI positif. Hal ini sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya, dimana mode ESI yang digunakan adalah ESI+ (Kumar et al., 2023; Luyen et al., 2018; Xing et al., 2021). Selain itu, kondisi yang penting saat tuning adalah penentuan *capillary cone* dan *dessolvation temperature* untuk mendapatkan parent ion serta *collision energy* untuk mendapatkan *daughter ion*. Hasil

daughter ion 121 m/z.

Sistem deteksi dilakukan dengan *multiple reaction monitoring* (MRM) karena dapat bekerja dengan memantau secara bersamaan beberapa ion prekursor atau dikenal juga dengan *parent ion*, dengan pemindaian nilai rasio m/z yang cepat dan sesuai dengan obat, metabolitnya ataupun standar internal yang terdapat dalam sampel penelitian (Banerjee and Mazumdar, 2012). Pada penelitian ini, sistem MS beroperasi dengan *triple quadrupole analyzer*, dimana *quadrupole* pertama (Q1) digunakan untuk memilih parent

Tabel 4. Nilai perhitungan uji presisi antar hari isoniazid

Kadar teoritik (µg/mL)	Hari-1		Hari-2	
	Rerata Kadar terukur (µg/mL)	RSD (%)	Rerata Kadar terukur (µg/mL)	RSD (%)
0,05	0,051 ± 0,003	5,53	0,052 ± 0,002	2,61
0,10	0,087 ± 0,004	4,30	0,095 ± 0,002	2,83
0,30	0,302 ± 0,026	8,53	0,304 ± 0,007	2,16
0,50	0,518 ± 0,017	3,21	0,480 ± 0,016	3,37
1,00	0,991 ± 0,069	6,94	1,009 ± 0,015	1,53
		5,7 ± 2,1		2,5 ± 0,7

ion, yang akan dipecah dalam sel tumbukan pada *quadrupole* kedua (Q2) atau *cell collision* sehingga menghasilkan ion produk atau daughter ion. *Quadrupole* ketiga (Q3) untuk dianalisis massa (Pitt, 2009). Beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan mode ionisasi positif juga menunjukkan hasil deteksi *parent ion* INH pada 138 m/z dan daughter ion pada 121 m/z (Daher et al., 2015; Hee et al., 2015; Luyen et al., 2018). **Gambar 3**, menggambarkan pola fragmentasi senyawa INH yaitu, ion produk INH yang teramati pada 121 m/z karena hilangnya NH₃ netral dan 79 m/z akibat hilangnya CONH₂ (Felipe et al., 2017).

Hasil preparasi sampel

Ekstraksi analit dalam sampel bisa dilakukan dengan bantuan SPE (*Solid Phase Extraction*) ataupun ekstraksi cair-cair (Hansen et al., 2020). Preparasi dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik maka protein dalam sampel serum akan mengalami denaturasi. Secara umum proses denaturasi bisa terjadi karena adanya perubahan pH, temperatur, dan penambahan senyawa organik, umumnya etanol, metanol dan asetonitril (Harmita et al., 2019). Pelarut organik yang digunakan pada penelitian ini yaitu metanol dan asetonitril. Kelebihan asetonitril yaitu menghasilkan presentasi pengendapan tertinggi dengan rasio volume terhadap plasma terendah. Namun, asetonitril dapat menghasilkan supernatant yang keruh atau agak gelap dan recovery yang kurang baik, sehingga dikombinasikan dengan

metanol, dimana metanol dapat menghasilkan supernatant yang lebih jernih, dan hasil recovery yang baik (Harmita et al., 2019; Kay et al., 2008).

Uji Linieritas

Linieritas menunjukkan bahwa hasil pengukuran data bahan uji berbanding lurus dengan respon metode. Linieritas (**Tabel 2**) dinyatakan dengan kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Hasil didapatkan persamaan garis $y = 47424x - 1049,8$ dengan koefisien korelasi adalah $r^2 = 0,9956$ (**Gambar 4**). Hasil ini telah memenuhi persyaratan untuk nilai linearitas yaitu $\geq 0,98$.

Tabel 3. Nilai perhitungan presisi intra hari isoniazid (n=3)

Kadar teoritik (µg/mL)	Rerata Kadar terukur (µg/mL)	RSD (%)
0,05	0,057 ± 0,010	1,83
0,10	0,092 ± 0,002	1,69
0,30	0,273 ± 0,016	5,96
0,50	0,540 ± 0,035	6,53
1,00	0,990 ± 0,025	2,47
	Rerata RSD ± SD	3,7 ± 2,4

Uji Akurasi

Akurasi atau ketepatan adalah kedekatan antara nilai yang terukur dengan nilai sebenarnya, yang dinyatakan dalam % recovery. Nilai keberterimaan akurasi berada dalam rentang 85% - 115% atau $\pm 15\%$ dari nilai nominal (EMA, 2022; FDA, 2018). Hasil perhitungan % recovery (**Tabel 2**) diperoleh pada rentang 96-113% dan RSD 2,4%. Hasil

ini telah menunjukkan bahwa uji akurasi telah memenuhi persyaratan yang ditentukan.

Presisi intra dan antar hari

Presisi menyatakan nilai kedekatan antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari seri sampel yang dianalisis. Nilai yang disyaratkan untuk presisi yaitu $< 15\%$ (EMA, 2022; FDA, 2018). Hasil uji didapatkan %RSD presisi intra dan inter-hari berturut-turut sebesar 3,7% dan 4,1% (**Tabel 3 dan 4**).

Tabel 5. Data hasil uji batas kuantifikasi dan batas deteksi

Parameter	Nilai
Simpangan baku residual (SD)	942,625
Slope persamaan regresi (b)	47424
Limit kuantifikasi (LOQ)	0,1987 $\mu\text{g/mL}$
Limit deteksi (LOD)	0,0656 $\mu\text{g/mL}$

Hasil uji menunjukkan presisi yang baik karena telah memenuhi syarat keberterimaan % RSD dimana nilai yang diperoleh berada di bawah 15%.

LOQ dan LOD

Batas kuantifikasi merupakan nilai konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang dapat diidentifikasi pada kondisi operasional untuk mendapatkan nilai presisi dan akurasi yang baik. Batas deteksi merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi terendah analit yang dapat terdeteksi di dalam sampel, namun tidak harus terkuantifikasi. Hasil perolehan nilai batas kuantifikasi dan batas deteksi berturut-turut yaitu 0,1987 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,0656 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabel 5**).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode analisis LC-MS/MS untuk penetapan kadar isoniazid dalam serum tikus adalah valid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) atas beasiswa studi pada Program Doktor Ilmu farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

Daftar Pustaka (References)

- Alsultan, A., Peloquin, C.A., 2014. Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis: An Update. *Drugs* 74, 839–854. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0222-8>
- Babalik, A., Mannix, S., Francis, D., Menzies, D., 2011. Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Active Tuberculosis. *Can. Respir. J.* 18, 225–229. <https://doi.org/10.1155/2011/307150>
- Banerjee, S., Mazumdar, S., 2012. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Bhagat, R., Saudagar, R.B., 2019. A Review on Analytical method Development and Validation. *J. Drug Deliv. Ther.* 9, 1064–1067. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i3-s.2957>
- Chegou, N.N., Hoek, K.G.P., Kriel, M., Warren, R.M., Victor, T.C., Walzl, G., 2011. Tuberculosis assays: past, present and future. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 457–469. <https://doi.org/10.1586/eri.11.23>
- Daher, A., Pitta, L., Santos, T., Barreira, D., Pinto, D., 2015. Using a single tablet daily to treat latent tuberculosis infection in Brazil: Bioequivalence of two different isoniazid formulations (300 mg and 100 mg) demonstrated by a sensitive and rapid high-

- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry . Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 543–550. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140458>
- EMA, 2022. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis.
- FDA, 2018. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.
- Felipe, G., Regina, H., Salgado, N., Leandro, J., 2017. Isoniazid : A Review of Characteristics , Properties and Analytical Methods. Crit. Rev. Anal. Chem. 47, 298–308. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1281098>
- Hansen, F., Øiestad, E.L., Pedersen-Bjergaard, S., 2020. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 189, 113446. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113446>
- Harmita, K., Harahap, Y., Supandi, 2019. Liquid Chromatography-Thandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). ISFI Penerbit, Jakarta.
- Hee, K.H., Seo, J.J., Lee, L.S., 2015. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of first line tuberculosis drugs and metabolites in human plasma and its application in c. J. Pharm. Biomed. Anal. 102, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.019>
- Heysell, S.K., Moore, J.L., Keller, S.J., Houpt, E.R., 2010. Therapeutic Drug Monitoring for Slow Response to Tuberculosis Treatment in a State Control Program, Virginia, USA. Emerg. Infect. Dis. 16, 1546–1553. <https://doi.org/10.3201/eid1610.100374>
- Jiang, Z., Huang, L., Zhang, L., Yu, Q., Lin, Y., Fei, H., Shen, H., Huang, H., 2022. A Simple and Sensitive UPLC–UV Method for Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide, and Rifampicin in Human Plasma and Its Application in Therapeutic Drug Monitoring. Front. Mol. Biosci. 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.873311>
- Kafeenah, H.I.S., Osman, R., Bakar, N.K.A., 2019. Effect of Mobile Phase pH on the Electrospray Ionization Efficiency and Qualitative Analysis of Pharmaceuticals in ESI + LC-MS/MS. J. Chromatogr. Sci. 57, 847–854. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz061>
- Kay, R., Barton, C., Ratcliffe, L., Matharoo-Ball, B., Brown, P., Roberts, J., Teale, P., Creaser, C., 2008. Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM 22, 3255–3260. <https://doi.org/10.1002/rcm.3729>
- Kumar, L.M.S., Azeemuddin, M.M., Routhu, K.C., Priya, K., Babu, U.V., Pai, S.R., 2023. A validated LC-MS/MS method for simultaneous quantification of antitubercular drugs in rat plasma and its application for a pharmacokinetic interaction study with Immusante®. J. Appl. Pharm. Sci. 13, 151–158. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.118956>
- Lei, Q., Wang, Hao, Zhao, Y., Dang, L., Zhu, C., Lv, X., Wang, Hui, Zhou, J., 2019. Determinants of serum concentration of first-line anti-tuberculosis drugs from China. Medicine (Baltimore) 98, e17523. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017523>
- Liu, P., Fu, Z., Jiang, J., Yuan, L., Lin, Z., 2013. Determination of isoniazid concentration in rabbit vertebrae by isotope tracing technique in conjunction with HPLC. Biomed. Chromatogr. 27, 1150–1156. <https://doi.org/10.1002/bmc.2920>
- Luyen, L.T., Hung, T.M., Huyen, L.T., Tuan, L.A., Huong, D.T.L., Duc, H.V., Tung, B.T., 2018. Simultaneous Determination of Pyrazinamide, Rifampicin, Ethambutol, Isoniazid

- and Acetyl Isoniazid in Human Plasma by LC-MS/MS Method. *J. Appl. Pharm. Sci.* 8, 061–073. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8910>
- Pasipanodya, J.G., McIlleron, H., Burger, A., Wash, P.A., Smith, P., Gumbo, T., 2013. Serum Drug Concentrations Predictive of Pulmonary Tuberculosis Outcomes. *J. Infect. Dis.* 208, 1464–1473. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit352>
- Pitt, J.J., 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* 30, 19–34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19224008>
- Pouplin, T., Bang, N.D., Toi, P.V., Phuong, P.N., Dung, N.H., Duong, T.N., Caws, M., Thwaites, G.E., Tarning, J., Day, J.N., 2016. Naïve-pooled pharmacokinetic analysis of pyrazinamide, isoniazid and rifampicin in plasma and cerebrospinal fluid of Vietnamese children with tuberculous meningitis. *BMC Infect. Dis.* 16, 144. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1470-x>
- Prahl, J.B., Johansen, I.S., Cohen, A.S., Frimodt-Møller, N., Andersen, Å.B., 2014. Clinical significance of 2 h plasma concentrations of first-line anti-tuberculosis drugs: a prospective observational study. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2841–2847. <https://doi.org/10.1093/jac/dku210>
- Pratima, N.A., Gadikar, R., 2018. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. *Arch. Org. Inorg. Chem. Sci.* 1, 001–009. <http://dx.doi.org/10.32474/AOICS.2018.01.000103>
- Vyas, A.K.J., Mishra, S.B., Patel, A.B., Patel, N.K., Shah, S.R., Sheth, D.B., 2022. A Brief Review on Liquid Chromatography- Mass Spectrometry/LCMS and its Application. *Asian J. Pharm. Anal.* 12, 203–210. <https://doi.org/10.52711/2231-5675.2022.00034>
- WHO, World Health Organization., 2023. Global Tuberculosis Report 2023. WHO.
- Xing, Y., Yin, L., Le, X., Chen, J., Zhang, Lin, Li, Y., Lu, H., Zhang, Lijun, 2021. Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and one metabolite of isoniazid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in patients with human immunodeficiency virus-tuberculosis coinfection. *Heliyon* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07532>
- Zheng, Y., Xu, N., Hu, X., Zhang, Q., Liu, Y., Zhao, Q., 2020. Development and Application of a LC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Four First-Line Antituberculosis Drugs in Human Serum. *J. Anal. Methods Chem.* 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/8838219>