

Хроматографическое и хромато-масс-спектрометрическое определение противотуберкулезных препаратов основного ряда в плазме крови

Е.А. Бессонова*, Л.А. Карцова, С.А. Соловьёва

*Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация,
198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., 26*

*Адрес для переписки: Бессонова Елена Андреевна, E-mail: bessonova.elena.a@gmail.com

Поступила в редакцию 8 апреля 2016 г., после исправления – 13 мая 2016 г.

В работе выявлены возможности одновременного определения четырех противотуберкулезных препаратов (ПТП) (*этамбутол, пиразинамид, изониазид, рифампицин*) методами обращённо-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) и ион-парной хроматографии. Предложен вариант одновременного определения этих ПТП в плазме крови человека методом ОФ ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием с электроспрей ионизацией. Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации путём мониторинга множественных реакций (MRM). Оптимизированы условия фрагментации для каждого лекарственного вещества. Найдены условия подготовки плазмы крови к ВЭЖХ/МС анализу, включающие осаждение белков плазмы крови ацетонитрилом. Значения степеней извлечения ПТП составили 85-90 %. Проведена оценка влияния матрицы пробы на разделение и ионизацию ПТП методом пост-экстракционной добавки. Показано, что разбавление экстракта плазмы крови в 10 раз достаточно для требуемого снижения матричного эффекта. Изучена стабильность ПТП в процессе анализа (автосамплер 1 и 12 ч.) и в условиях хранения (3 цикла заморозка-разморозка). Предложен способ увеличения стабильности рифампицина с добавлением в качестве антиоксиданта аскорбиновой кислоты (1 мг/мл). Пределы обнаружения с УФ детектированием составили от 2 до 20 мкг/мл, с МС детектированием в SIM-режиме от 2 до 15 нг/мл и в MRM-режиме от 0.5 до 10 нг/мл. В оптимизированных условиях показана возможность обнаружения и количественного определения всех четырех ПТП в плазме крови больного туберкулезом с проводимой лекарственной терапией.

Ключевые слова: противотуберкулезные препараты, ОФ ВЭЖХ, масс-спектрометрическое детектирование, матричный эффект, стабильность рифампицина.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2016, vol. 20, no. 2, pp. 161-167

DOI: 10.15826/analitika.2016.20.2.007

Chromatographic and liquid chromatography-tandem-mass spectrometry determination of first-line anti-tuberculosis drugs in human plasma

E.A. Bessonova, L.A. Kartsova, S.A. Soloveva

Saint-Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

*Corresponding author: Elena A. Bessonova, E-mail: bessonova.elena.a@gmail.com

Submitted 08 April 2016, received in revised form 13 May 2016

In the current study the possibility of the simultaneous determination of anti-tuberculosis (**anti-TB**) drugs (isoniazid, pyrazinamide, ethambutol and rifampicin) using the reversed-phase HPLC (RP-HPLC) and ion-pair chromatography was investigated. A selective and highly sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of four anti-TB drugs (isoniazid, pyrazinamide, ethambutol and rifampicin) in the human plasma was developed. The detection was carried out using the multiple reaction-monitoring (MRM) modes with positive polarity. The fragmentation conditions for each drug were optimized, and the conditions for the blood plasma preparation for HPLC/MS analysis, including the protein precipitation with ACN with a ratio of 3:1 (by volume), were chosen. The matrix effects on the separation and ionization of anti-TB drugs were estimated by the post-extraction additives method. It was shown that the 10-fold dilution

of plasma extracts was sufficient to decrease the influence of the sample matrix. The stability of anti-TB drugs during the analysis (in autosampler at 1 and 12 hours) and at storage conditions (3 cycles of freeze-thaw) was studied. The method for increasing the stability of rifampicin using ascorbic acid (1 mg/ml) as antioxidant was provided. The LOD with UV detection were 2 – 20 µg/ml, in SIM-mode – 2 – 15 ng/ml and in MRM-mode – 0.5 – 10 ng/ml respectively. The possibility of the determination of four anti-TB drugs in real plasma samples of patients with tuberculosis undergoing drug therapy in optimized conditions HPLC/MC was shown.

Key words: anti-tuberculosis drugs, RP HPLC, LC/MS/MS, matrix effect.

ВВЕДЕНИЕ

Рекомендованные Всемирной Организацией Здравоохранения стандартизированные схемы лечения туберкулёза включают прием одновременно нескольких противотуберкулезных препаратов (ПТП): рифампицин, изониазид, пиразинамид, этамбутол [1]. Эффективность лекарственной терапии существенно зависит от концентрации ПТП в крови, т.к. это влияет на их распределение в органе-мишени, пораженном туберкулёзом, и максимальный терапевтический результат. Передозировка ПТП может приводить к нежелательным побочным процессам.

Предложено несколько вариантов хроматографического определения отдельных лекарственных препаратов в биологических матрицах (плазма крови, моча, слюна) [2-6], многие из которых требуют проведения дериватизации, усложняющей анализ. В последние годы появились сообщения об использовании для этой цели хромато-масс-спектрометрии с электроспреем [7, 8] или химической ионизацией при атмосферном давлении [9, 10]. Для получения дополнительной информации о метаболитах ПТП используют также тандемную-масс-спектрометрию [7-10].

Целью данного исследования явилась разработка вариантов одновременного хроматографического определения четырёх ПТП (рифампицина, изониазида, пиразинамида, этамбутола) в плазме крови.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Ацетонитрил (для ВЭЖХ, «Acros organics»), муравьиная кислота («х.ч.», «Неохим»), октилсульфонат натрия («Sigma»), метанол (для ВЭЖХ, «Acrosorganics»), аскорбиновая кислота («Sigma»), ацетат аммония («Реахим»), субстанции рифампицина, изониазида, пиразинамида, этамбутола («Люпин Лтд», Индия).

Исходные растворы аналитов (1-4 мг/мл) получали растворением точных навесок субстанций ПТП в метаноле. Рабочие растворы готовили путем последовательного разбавления исходных растворов деионизированной водой. Хранили растворы при –20 °С. При хранении рифампицина в раствор добавляли аскорбиновую кислоту (1 мг/мл).

Оборудование. Жидкостный хроматограф («Shumadzu» LC-20, Япония) с диодно-матричным детектором (SPD-M20A); жидкостный хроматограф с тройным квадрупольным масс-анализатором с электроспреем ионизацией («Shumadzu» LC-

MS 8030, Япония); колонка Luna C18(2) 150×2 мм, 5 мкм («Phenomenex»); центрифуга Thermo Scientific SL16 («Термо», США) с системой охлаждения.

Условия хроматографического анализа.

ОФ ВЭЖХ элюент: 20 mM раствор ацетата аммония (раствор А) – CH₃CN (раствор Б). Ион-парная ВЭЖХ элюент: 5 mM водный раствор октилсульфоната натрия с добавкой 0.1% HCOOH (по объему) (раствор А) – CH₃CN (раствор Б). Программа градиентного режима приведена в табл. 1. Скорость потока подвижной фазы 0.3 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл.

Параметры электроспреем ионизации: положительная полярность, напряжение на капилляре –4500 В, скорость потока и температура осушающего газа 15 л/мин и 250 °С, соответственно. Хроматограммы выбранных ионов в SIM-режиме записывали по значению *m/z* 823.3 для рифампицина; *m/z* = 205.0 для этамбутола; *m/z* = 124.1 для пиразинамида; *m/z* = 138.2 для изониазида.

Пробоподготовка. Процедура пробоподготовки плазмы крови включала осаждение белков и последующий ВЭЖХ анализ надосадочной жидкости. Использовали следующую схему: к 100 мкл плазмы крови прибавляли 300 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 2 минут и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С, после чего переносили надосадочную жидкость в вials для хроматографического анализа.

Определение степеней экстракции аналитов из реального образца проводили методом стандартной добавки. Оценку степени извлечения (*RE*) осуществляли по формуле

$$RE = \frac{S_1}{S_2} \cdot 100\%, \quad (1)$$

Таблица 1

Программа градиентного элюирования ПТП

Table 1

The program of gradient elution

Время, мин	Соотношение растворов в подвижной фазе, % об.	
	Раствор А	Раствор В
0	97	3
3	97	3
11	30	70
13	30	70
15	10	90
16	10	90
17	97	3

где S_1 – площадь пика аналита, добавленного в плазму крови до экстракции, S_2 – площадь пика аналита, добавленного в плазму крови после экстракции.

Пределы обнаружения (ПО) рассчитывали по отношению сигнал/шум = 3 : 1. Пределы количественного обнаружения рассчитывали по отношению сигнал/шум = 10 : 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методом обращённо-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием при 254 и 334 нм (селективное поглощение рифампицина) оптимизированы условия разделения ПТП.

Поскольку аналиты сильно различаются по полярности (рис. 1), их совместное определение в условиях изократического элюирования за приемлемое время затруднительно. Предложен режим градиентного элюирования (табл. 1).

Варьировали pH (2.2; 5.6; 7) и природу подвижной фазы. В кислой среде при pH = 2.2 (0.1 % HCOOH) изониазид (pK_a = 3.5; 10.8) заряжен положительно и слабо удерживается на неполярном сорбенте. Лучшие результаты по селективно-

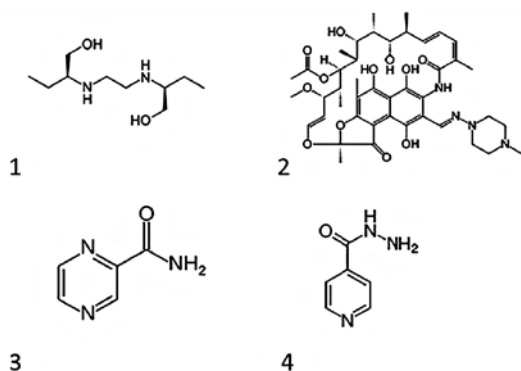


Рис. 1. Структурные формулы этамбутола (а), рифампицина (б), пиразинамида (в), изониазида (г)

Fig. 1. Chemical structures of ethambutol (1), rifampicin (2), pyrazinamide (3), isoniazid (4)

сти разделения и воспроизводимости параметров удерживания получены для pH = 5.6 (20 мМ ацетат аммония) (рис. 2).

Для увеличения параметров удерживания гидрофильных аналитов, что принципиально при анализе реальных объектов, предложен режим ион-парной хроматографии. В подвижную фазу в кислой среде (0.1 % HCOOH/CH₃CN, pH = 2.2) добавляли октилсульфонат натрия в концентрации меньше ККМ (1-5 мМ). Ион-парный реагент, находясь в динамическом равновесии с другими компонентами системы, изменил механизм сорбции и повлиял на селективность разделения ПТП (рис. 3).

Спектрофотометрическое детектирование позволило обнаружить лишь изониазид, пиразинамид и рифампицин, ПО составляют от 2 до 20

мкг/мл. Этамбутол, не содержащий хромофорных групп, в этих условиях не определяется.

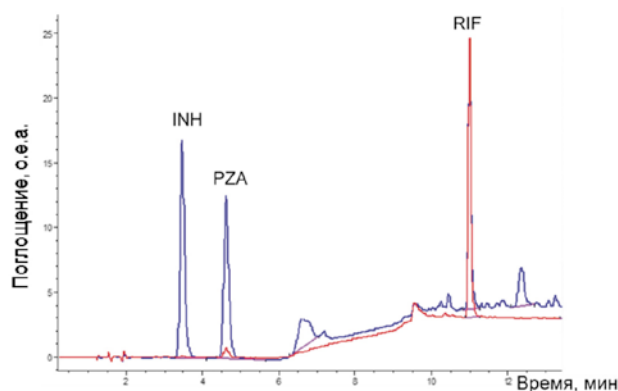


Рис. 2. Хроматограмма водных растворов стандартов пиразинамида (PZA), изониазида (INH), рифампицина (RIF) при детектировании на 254 (синий) и 334 (красный) нм. Условия: жидкостный хроматограф «Shumadzu» LC-20 с диодно-матричным детектором (SPD-M20A), колонка Luna C18 (2) (150×2 мм, 5 мкм), подвижная фаза: А – 20 мМ раствор ацетата аммония, Б – CH₃CN, градиентный режим, скорость п.ф. – 0.3 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл

Fig. 2. Chromatogram of aqueous solutions of standards of pyrazinamide (PZA), isoniazid (INH), rifampicin (RIF) with UV detection at 254 nm (blue) and 334 nm (red). Conditions: liquid chromatograph LC-20 with diode array detector (SPD-M20A, «Shumadzu»), column Luna C18 (2) (150×2 mm, 5 μm), mobile phase: A – 20 mM ammonium acetate, B – CH₃CN, gradient elution, flow rate – 0.3 ml/min, injection volume – 20 μl

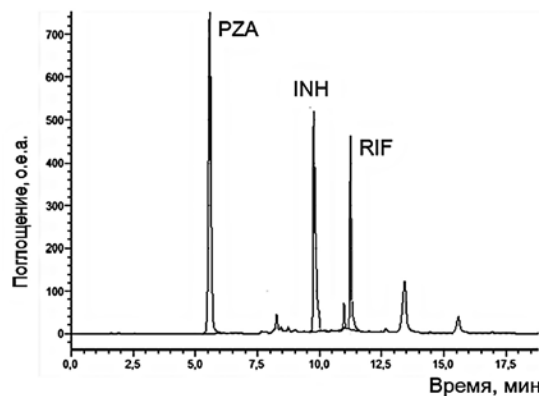


Рис. 3. Хроматограмма водных растворов пиразинамида (PZA), изониазида (INH), рифампицина (RIF) методом обращено-фазовой ион-парной ВЭЖХ. Условия: жидкостный хроматограф «Shumadzu» LC-20 с диодно-матричным детектором (SPD-M20A); колонка Luna C18 (2) (150×2 мм, 5 мкм); подвижная фаза: А – 5 мМ водный раствор октилсульфоната натрия с добавкой 0.1% HCOOH (по объему), Б – CH₃CN, градиентный режим. (Остальные условия см. на рис. 2)

Fig. 3. Chromatogram of aqueous solution of pyrazinamide (PZA), isoniazid (INH), rifampicin (RIF) by reversed-phase ion-pair HPLC. Conditions: liquid chromatograph LC-20 with diode array detector (SPD-M20A, «Shumadzu»), column Luna C18 (2) (150×2 mm, 5 μm), mobile phase: A – 5 mM sodium octyl sulfonate with 0.1% (v/v) HCOOH, B – CH₃CN, gradient elution. (Other conditions at Fig. 2)

Таблица 2

Параметры фрагментации рифампицина, изониазида, пиразинамида, этамбутола

Table 2

Fragmentation parameters of rifampicin, isoniazid, pirazinamid, ethambutol

Параметр	Этамбутол	Рифампицин	Изониазид	Пиразинамид
MRM – переход (<i>m/z</i>)	205.0 → 116.2	823.30 → 791.6	138.2 → 121.1	124.1 → 81.1
Энергия соударения (<i>CE</i> , эВ)	15	30	20	20

Данная задача была решена с применением высокочувствительного масс-спектрометрического детектирования. Найдены условия определения ПТП методом ОФ ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с электроспрей ионизацией. Изучено влияние состава подвижной фазы (0.1% HCOOH, 20 mM аммонийно-ацетатный буфер (pH = 5.6)) на интенсивность ионизации лекарственных препаратов в условиях электрораспыления. Установлено, что интенсивность сигнала аналитов увеличивается с использованием 0.1% HCOOH. Хроматограммы выбранных ионов записывали по значению *m/z*, соответствующим ионам [M + H]⁺.

Оптимизированы условия фрагментации определяемых соединений при использовании MRM-режима (табл. 2).

Пробоподготовка плазмы крови предполагает осаждение белков плазмы крови, что, в отличие от экстракции, значительно упрощает процедуру пробоподготовки, с последующим ВЭЖХ анализом надосадочной жидкости. При разработке процедуры извлечения ПТП из плазмы крови варьировали условия осаждения белков: ацетонитрил/плазма = 2 : 1 и ацетонитрил/плазма = 3 : 1 (по объему), время и скорость центрифугирования. Оценку проводили по значениям степеней извлечения. Лучшие результаты получены с использованием в качестве осадителя ацетонитрила в соотношении 3 : 1 (по объему). Значения степеней извлечения составили 85-90 %.

При введении в колонку супернатанта с добавкой определяемых соединений наблюдается значительное подавление ионизации изониазида и пиразинамида в масс-спектрометре. Такие эффекты вызваны главным образом изменениями свойств капель раствора, обусловленными совместным элюированием аналитов с нелетучими или малолетучими соединениями пробы. Они и вызывают изменения в характере формирования и испарения капель при электроспрей ионизации [11].

Проведена оценка влияния матрицы пробы на разделение методом пост-экстракционной добавки [12]: сравнение откликов определяемого соединения, добавленного в матрицу после ее пробоподготовки, и в чистом растворителе (2) для образцов 6 различных доноров на трех уровнях концентрации (нижнем, среднем и верхнем уровнях концентрации (75 % от верхней границы линейного диапа-

зона)) (табл. 3). Показано, что разбавление матрицы пробы в три раза является приемлемым условием анализа для больших концентраций (4-8 мкг/мл). Однако для концентраций ~0.1 мкг/мл матричный эффект составляет ~50 %, а коэффициент вариации – 20-30 %. Проведена дополнительная оценка матричного эффекта при разбавлении пробы в 10 раз для образцов с низкой концентрацией лекарственных препаратов (0.1 мкг/мл) и показано, что снижается матричный эффект (ME 80-90 %) и значения CV не превышают 8.3 %:

$$ME = \frac{S_1}{S_2} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где *ME* – матричный эффект, *S*₁ – площадь пика аналита в плазме крови после её пробоподготовки, *S*₂ – площадь пика аналита в чистом растворителе.

Изучена стабильность водных растворов лекарственных препаратов после процессов замораживания – размораживания (3 цикла) в автосамплере при 4 °C через 1 и 12 часов (табл. 4). Обнаружено, что рифампицин разрушается уже на 50 % после первой разморозки и крайне нестабилен при ком-

Таблица 3

Значения матричного эффекта (*ME*) и коэффициентов вариации (*CV*) при разбавлении образцов плазмы крови в 3 и 10 раз для четырех противотуберкулезных препаратов

Table 3

Matrix effects (*ME*) and coefficients of variation (*CV*) for plasma samples with dilution in 3 and 10 times for four anti-tuberculosis drugs

Соединение	Концентрация, мкг/мл	Разбавление в 3 раза	
		<i>ME</i> , %	<i>CV</i> , %
Пиразинамид	0.1	53.3	15.9
	4	78.4	14.3
	8	83.9	7.9
Рифампицин	0.1	60.2	31.5
	4	76.1	12.1
	8	74.5	7.2
Этамбутол	0.1	68.2	21.5
	4	79.8	10.5
	8	69.8	9.7
Изониазид	0.1	37.5	20.8
	4	61.3	11.6
	8	64.9	8.2

Таблица 4

Выявление стабильности водных растворов противотуберкулезных препаратов в процессе анализа (в автосамплере 1 ч и 12 ч) и при хранении (3 цикла замораживания-размораживания (F-D)), %

Table 4

Stability of aqueous solutions of anti-tuberculosis (anti-TB) drugs during the analysis (in autosampler for 1 hour and 12 hours) and under storage (3 – Frost-Defrost cycle (F-D)), %

Условия хранения	Рифампицин	Изониазид	Пиразинамид	Этамбутол
1 цикл (F – D)	56.0	90.6	98.3	98.0
2 цикл (F – D)	27.8	87.3	98.0	97.7
3 цикл (F – D)	6.5	84.2	97.6	97.4
Автосамплер, 1 ч	67.9	96.3	99.3	99.5
Автосамплер, 12 ч	5	82.0	88.9	93.6
Автосамплер, с доб. аскорбиновой кислоты, 1 ч	89.7	99.9	99.3	98.7
Автосамплер, с добавкой аскорбиновой кислоты, 12 ч	65.6	87.3	95.6	97.6

Примечание: F-D – Frost-Defrost (цикл замораживания-размораживания).

натной температуре. Известно, что в кислой среде рифампицин превращается в 3-формилрифампицин, а при хранении окисляется до хинона (рис. 4) [13]. Продукты деструкции и окисления рифампицина наблюдались на хроматограмме в виде дополнительных аналитических сигналов (рис. 5). Показано, что добавление в состав пробы в качестве антиоксиданта аскорбиновой кислоты (1 мг/мл) значительно увеличивает стабильность рифампицина (табл. 2).

Определены метрологические характеристики разработанного хромато-масс-спектрометрического варианта определения ПТП в плазме крови (табл. 5).

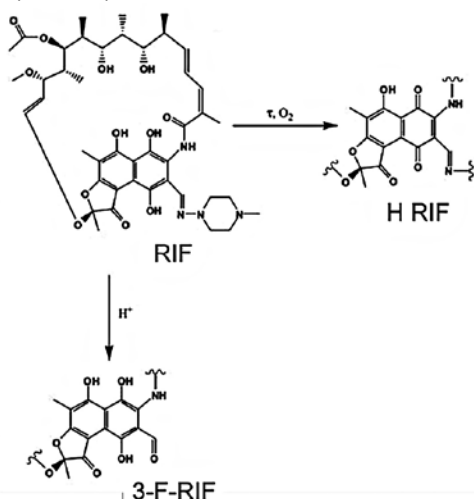


Рис. 4. Структурные формулы рифампицина (RIF), 3-формилрифампицина (3-F-RIF), хинона рифампицина (H RIF) [13]

Fig. 4. Chemical structures of rifampicin (RIF), 3-formylrifampicin (3-F-RIF), rifampicin quinone (H RIF)

Проведен хромато-масс-спектрометрический

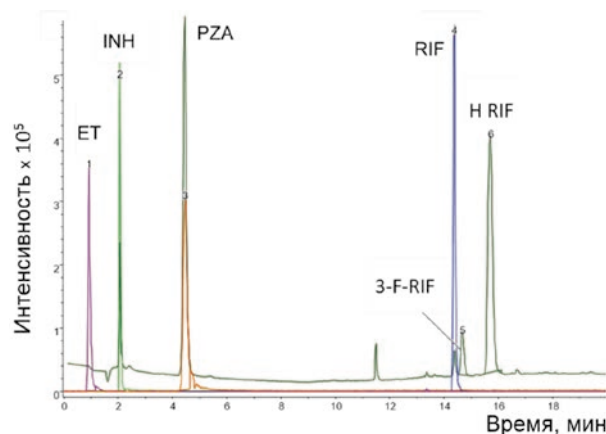


Рис. 5. Хроматограмма водного раствора стандартов этамбутола (ET), пиразинамида (PZA), изониазида (INH), рифампицина (RIF) и продуктов деструкции рифампицина: 3-формилрифампицин (3-F-RIF), хинон рифампицина (H RIF) при МС детектировании. Условия: жидкостной хромато-масс-спектрометр LC-MS 8030 с тройным квадрупольным масс-анализатором с электроспреей ионизацией и диодно-матричным детектором (SPD-M20A, «Shumadzu»); колонка Luna C18 (2) (150×2 мм, 5 мкм); подвижная фаза: А – 0.1% раствор (по объёму) HCOOH, Б – CH₃CN, градиентный режим. (Остальные условия см. на рис. 2)

Fig. 5. Chromatogram of an aqueous solution of standards of ethambutol (ET), pyrazinamide (PZA), isoniazid (INH), rifampicin (RIF) and degradation products of RIF: 3-formyl rifampicin (3-F-RIF), rifampicin quinone (H RIF) with MS detection. Conditions: LCMS-8030 triple quadrupole liquid chromatograph mass spectrometer with electrospray ionization and diode array detector (SPD-M20A, «Shumadzu»); column Luna C18 (2) (150×2 mm, 5 μm), mobile phase: A – 0.1% (v/v) HCOOH, B – CH₃CN, gradient elution. (Other conditions at Fig. 2)

Таблица 5

Метрологические характеристики разработанного хромато-масс-спектрометрического варианта определения четырех ПТП в плазме крови

Table 5

The metrological characteristics of developed liquid chromatography-mass-spectrometry method for the determination of antituberculosis drugs in plasma

Параметр	Этамбутол	Рифампицин	Изониазид	Пиразинамид
Предел обнаружения, нг/мл	0.5	10	2	5
Предел количественного обнаружения, нг/мл	2	20	10	15
Линейный диапазон концентраций, мкг/мл	0.002-10	0.01-10		
Воспроизводимость площадей пиков RSD, %	3.6	4.7	3.9	4.4
Концентрация ПТП в реальном образце, нг/мл	400 ± 10	40 ± 3	700 ± 15	40.0 ± 1.5

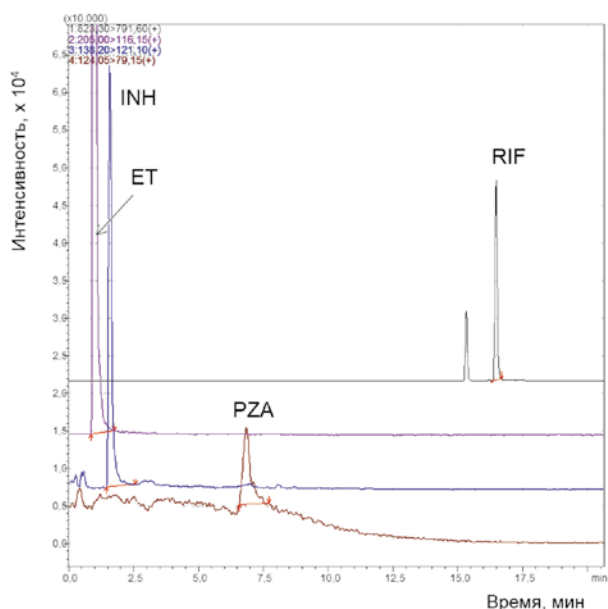


Рис. 6. Хроматограммы экстракта плазмы крови больного туберкулезом в условиях ОФ ВЭЖХ с МС детектированием в MRM-режиме. Условия: жидкостной хромато-масс-спектрометр LC-MS 8030 с тройным квадрупольным масс-анализатором с электроспреей ионизацией («Shumadzu»); колонка Luna C18(2) (150×2 мм, 5 мкм); подвижная фаза: А – 0.1% раствор (по объёму) HCOOH, В – CH₃CN. Градиентный режим элюирования. (Остальные условия см. на рис. 2). Пики: этамбутол (ET), изониазид (INH), пиразинамид (PZA), рифампицин (RIF)

Fig. 6. Chromatograms of the plasma extract from TB patient in reversed-phase HPLC with MS detection in MRM-mode. Conditions: LCMS-8030 triple quadrupole liquid chromatograph mass spectrometer with electrospray ionization («Shumadzu»); column Luna C18(2) (150×2 mm, 5 μm), mobile phase: A – 0.1% (v/v) HCOOH, B – CH₃CN, gradient elution (Other conditions at Fig. 2). Peaks: ethambutol (ET), isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA), rifampicin (RIF)

анализ экстракта плазмы крови больного¹ впервые выявленным туберкулезом в оптимизированных условиях (рис. 6). Забор крови осуществлялся спустя два часа после приема всех четырех препаратов. Концентрации лекарственных препаратов приведены в табл. 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизированы условия одновременно определения противотуберкулезных препаратов методом ОФ ВЭЖХ хромато-масс-спектрометрическим методом. Проведен сравнительный анализ SIM и MRM режимов масс-спектрометрического детектирования при определении анализируемых веществ. Подобран регламент пробоподготовки плазмы крови к хроматографическому анализу. Проведена оценка матричного эффекта и показано, что разбавление образца плазмы крови в три раза достаточно для удаления влияния матрицы пробы. Изучена стабильность лекарственных препаратов при различных условиях хранения. Обнаружено, что рифампицин разрушается уже на 50 % после первой разморозке и нестабилен при комнатной температуре. Показано, что добавление в состав пробы 1 мг/мл консерванта (аскорбиновой кислоты) значительно увеличивает стабильность рифампицина. Проведен анализ реального образца плазмы крови больного туберкулезом в оптимизированных условиях и показана возможность одновременного определения всех четырех лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шилова М.В. Взгляд на эпидемическую ситуацию с туберкулезом в Российской Федерации (в современном
1. Пробоподготовка образцов плазмы крови проводилась в НИИ фтизиопульмонологии (СПб).

ных социально-экономических условиях) // Российский Электронный Журнал Лучевой Диагностики. [Электронный ресурс]: <http://www.rejr.ru/volume/13/Shilova.pdf> (дата обращения 5.04.2016).

2. Srivastava A., Waterhouse D., Ward S.A. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. V. 70. P. 523-528.

3. Therapeutic isoniazid monitoring using a simple high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection / L. Moussa [et al.] // *J. Chromatogr. B.* 2002. V. 766. P. 181-187.

4. Determination of ethambutol in human plasma and urine by high – performance liquid chromatography with fluorescence detection / M. Breda [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 729. P. 301-307.

5. Jiang Z., Wang H., Locke D.C. Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection // *Anal. Chem.* A. 2002. V. 456. P. 189-192.

6. Guermouche S., Guermouche M.H. Solid-phase extraction and HPTLC determination of isoniazid and acetylisoniazid in serum. Comparison with HPLC // *J. Chromatogr. Sci.* 2004. V. 42. P. 250-253.

7. Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry / H. Kim [et al.] // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2015. V. 102. P. 9-16.

8. Determination of the rifamycin antibiotics rifabutin, rifampin, rifapentine and their major metabolites in human plasma via simultaneous extraction coupled with LC/MS/MS / L.C. Winchester [et al.] // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2015. V. 104. P. 55-61.

9. A rapid and robust liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of anti-tuberculosis drugs — ethambutol and pyrazinamide in human plasma / Z. Gong [et al.] // *J. Chromatogr. B.* 2009. V. 877. P. 1698-1704.

10. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of isoniazid and ethambutol in human plasma / X. Chen [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 19. P. 2591-2596.

11. Matuszewski B. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis // *J. Chromatogr. B.* 2006. V. 830. P. 293-300.

12. Ярошенко Д.В., Карцова Л.А. Матричный эффект и способы его устранения в биоаналитических методиках, использующих хромато-масс-спектрометрию // *Журн. аналит. химии.* 2014. Т. 69, № 4. С. 351-357.

13. Продукты деструкции и бактериостатическая эффективность рифампицина в водном растворе и в составе липосом / Г.В. Сорокоумова [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал.* 2008. Т. 42, № 8. С.35-38.

REFERENCES

1. Shilova M.V. [The epidemiological situation of tuberculosis in the Russian federation (in the current socioeconomic conditions)]. *Russian Electronic Journal of Radiology*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 34-41. Available at: <http://www.rejr.ru/volume/13/shilova.pdf> (Accessed 5 April 2016) (In Russian).

2. Srivastava A., Waterhouse D., Ward S.A. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, vol. 70, pp. 523-528. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.05.028

3. Moussa L.A., Khassouani C.E., Soulaymani R., Jana M., Cassanas G., Alric R., Hüe B. Therapeutic isoniazid monitoring using a simple high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 2002, vol. 766, pp. 181-187. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00434-0

4. Breda M., Marrari P., Pianezzola E., Benedetti M.S. Determination of ethambutol in human plasma and urine by high–performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 729, pp. 301-307. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01093-9

5. Jiang Z., Wang, H., Locke D.C. Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection. *Analytica Chimica Acta*, 2002, vol. 456, pp. 189-192. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00047-8

6. Guermouche S., Guermouche M.H. Solid-phase extraction and HPTLC determination of isoniazid and acetylisoniazid in serum. Comparison with HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 2004, vol. 42, pp. 250-253. DOI: 10.1093/chromsci/42.5.250

7. Kim H., Seo K., Kim H., Jeong E., Ghim J., Lee S.H., Lee Y.M., Kim D.H., Shin J. Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, vol. 102, pp. 9-16. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.08.026

8. Winchester L.C., Podany A.T., Baldwin J.S., Robbins B.L., Fletcher C.V. Determination of the rifamycin antibiotics rifabutin, rifampin, rifapentine and their major metabolites in human plasma via simultaneous extraction coupled with LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, vol. 104, pp. 55-61. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.011

9. Gong Z., Basir Y., Chu D., McCort-Tipton M. A rapid and robust liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of anti-tuberculosis drugs—ethambutol and pyrazinamide in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2009, vol. 877, pp. 1698-1704. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.04.023

10. Chen X., Song B., Jiang H., Yu K., Zhong D. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of isoniazid and ethambutol in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, vol. 19, pp. 2591-2596. DOI: 10.1002/rcm.2100

11. Matuszewski B. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*, 2006, vol. 830, pp. 293-300. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.11.009

12. Yaroshenko D.V., Kartsova L.A. Matrix effect and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 2014, vol. 69, no. 4, pp. 311-317. DOI: 10.1134/S1061934814040133

13. Sorokoumova G.M., Vostrikov V.V., Selishcheva A.A., Rogozhkina E.A., Kalashnikova T.Yu, Shvets V.I., Golyshevskaya V.I., Martynova L.P., Erokhin V.V. [Degradation products and bacteriostatic efficiency of rifampicin in an aqueous solution and in liposomes]. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal], 2008, vol. 42, no. 8, pp. 35-38 (in Russian).