



## Pengembangan dan Validasi Metode Bioanalisis Trimetoprim dalam Sampel Plasma dan Urin Manusia Simulasi Menggunakan KCKT-PDA

### *Bioanalytical Method Development and Validation of Trimethoprim in Spiked Human Plasma and Urine Samples by using HPLC-PDA*

Dion Notario<sup>1</sup>\*, Jessica Amelia<sup>1</sup>, Genoveva Della<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta, Indonesia

\*E-mail: dion.notario@atmajaya.ac.id

#### Kata kunci:

Trimetoprim;  
KCKT-PDA; Urin;  
Plasma; Validasi  
metode bioanalisis

#### Keywords:

Trimethoprim;  
HPLC-PDA;  
Urine; Plasma;  
Bioanalytical  
method validation

#### Received:

03-08-2022

#### Revised:

22-11-2022

#### Accepted:

09-01-2023

Jurnal Kefarmasian  
Indonesia,  
2023;13(1):41-49

#### DOI:

<https://doi.org/10.22435/jki.v13i1.6189>

### Abstrak

Untuk memantau kadar trimetoprim (TMP) pada manusia, diperlukan metode analisis yang tervalidasi, sederhana, dan hemat biaya untuk diterapkan secara rutin. Akan tetapi, sebagian besar metode yang digunakan untuk menetapkan kadar TMP dalam urin dan plasma menggunakan instrumentasi kompleks. Oleh karena itu, di dalam penelitian ini dikembangkan metode analisis berbasis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang lebih sederhana. Pemisahan dilakukan menggunakan kolom GIST® C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) pada suhu 35°C yang dialiri dengan fase gerak berupa larutan asam asetat pH 2,5 : asetonitril (87:13, v/v) pada kecepatan 1,4 ml/menit. Deteksi dilakukan dengan Photodiode Array Detector (PDA) pada panjang gelombang 254 nm dan 243 nm untuk mengukur TMP dalam sampel urin dan plasma masing-masing. Penyiapan urin dan plasma secara berurutan dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan etil asetat dan presipitasi protein menggunakan asetonitril. Metode ini terbukti selektif, linier ( $R=0,997$ ), akurat dengan %kesalahan  $\leq 10,29\%$  di tingkat LLOQ dan di atas LLOQ nilai %kesalahan  $\leq 10,45\%$ , presisi dengan %RSD  $\leq 11,79\%$  di tingkat LLOQ dan %RSD  $\leq 10,82\%$  di atas LLOQ. Selain itu, metode ini cukup sensitif untuk studi farmakokinetika dalam urin dan pemantauan kadar TMP dalam darah dengan LLOQ 5 mg/L baik dalam urin maupun plasma. Stabilitas trimetoprim dalam larutan, urin, dan plasma dilakukan untuk memastikan masa simpan. Metode yang dikembangkan terbukti sah dan dapat diaplikasikan dalam studi farmakokinetika dan pemantauan kadar obat trimetoprim dalam urin dan plasma.

### Abstract

To monitor trimethoprim levels (TMP) in humans, a validated, simple, and cost-efficient analytical method is needed to be applied regularly. However, most of the methods used to establish TMP levels in urine and plasma use complex instrumentation. Therefore, in this study, a simpler High-Performance Liquid Chromatography-based (HPLC) method was developed. The separation was carried out using a GIST® C18 column (150 × 4.6 mm, 5 µm) at a temperature of 35°C which was fed by a mobile phase in the form of an acetic acid solution pH 2.5: acetonitrile (87:13, v/v) at a speed of 1.4 ml/min. Detection was performed with Photodiode Array Detector (PDA) at wavelengths of 254 nm and 243 nm to quantify TMP in urine and plasma samples respectively. The preparation of urine and plasma sequentially was carried out by the liquid-liquid extraction (ECC) method using ethyl acetate and the protein precipitation using acetonitrile. This method proved to be selective, linear ( $R=0.997$ ), accurate with %error  $\leq 10.29\%$  at LLOQ level and above LLOQ value %error  $\leq 10.45\%$ , precision with %RSD  $\leq 11.79\%$  at LLOQ level and %RSD  $\leq 10.82\%$  above LLOQ. In addition, this method is quite sensitive for pharmacokinetic studies in the urine and monitoring of TMP levels in the blood with LLOQ 5 mg/L in both urine and plasma. The stability of trimethoprim in solution, urine, and plasma was conducted to ensure storage time. The developed method is proven to be valid and can be applied in pharmacokinetic studies and monitoring of trimethoprim drug levels in urine and plasma.

## PENDAHULUAN

Trimetoprim (TMP) adalah antibiotik yang lazim digunakan dalam pengobatan beberapa penyakit infeksi baik sebagai monoterapi maupun kombinasi dengan sulfametoksazol (SMZ) yang dikenal dengan kotrimoksazol (KTZ). Meskipun KTZ memiliki efikasi yang baik, namun penggunaannya dalam jangka panjang tidak disarankan mengingat potensi peningkatan efek samping SMZ yaitu kristaluria sehingga TMP dalam bentuk tunggal lebih direkomendasikan karena dianggap lebih aman.<sup>1,2,3</sup> TMP dalam bentuk tunggal sebagai antibiotik profilaksis terbukti efektif dalam mencegah kekambuhan pada infeksi saluran kemih pada pasien lansia<sup>4</sup> dan otitis media akut pada anak-anak.<sup>5</sup> Selain itu, TMP direkomendasikan untuk mengobati infeksi saluran kemih pada pria dewasa.<sup>6</sup>

Meskipun dianggap relatif lebih aman daripada KTZ, namun TMP memiliki beberapa efek samping yang tidak dikehendaki antara lain hiperkalemia hingga gagal ginjal.<sup>7,8,9</sup> Pemantauan serum kreatinin dan elektrolit dalam serum harus dipertimbangkan terutama pada pasien yang mengalami gagal ginjal<sup>10</sup> sedangkan pemantauan kadar TMP dalam darah diperlukan pada pasien dengan penyakit kritis untuk mencapai target konsentrasi yang efektif dan non-toksik.<sup>11</sup> Oleh karena itu, diperlukan suatu metode analisis yang tervalidasi untuk melakukan pemantauan kadar TMP.

Beberapa metode analisis yang telah dikembangkan untuk mengkuantifikasi TMP dalam sampel biologis antara lain metode berbasis KCKT dengan detektor spektroskopi massa (LC-MS atau LC-MS/MS)<sup>12,13</sup>, KCKT dengan detektor fluoresens<sup>14</sup> dan elektroforesis kapiler dengan detektor UV.<sup>15</sup> Metode-metode analisis yang telah dikembangkan sebelumnya relatif rumit dan memerlukan biaya tinggi ditinjau dari instrumentasi yang digunakan seperti LC-MS, LC-MS/MS, KCKT-Fluoresens, dan elektroforesis kapiler. Oleh karena itu, di dalam penelitian ini digunakan KCKT-PDA yang lebih

seederhana dengan tujuan untuk memperoleh metode analisis TMP dalam urin dan plasma yang efisien namun tetap memenuhi persyaratan validasi metode bioanalisis.

## METODE

### Alat dan bahan

Sistem kromatografi yang digunakan dalam penelitian ini adalah KCKT model LC-20AD Shimadzu yang dilengkapi dengan pompa (LC-20AD), autosampler (SIL-20A), oven (CTO-20AC), dan detektor PDA (SPD-M20A 230V). Pemisahan dilakukan dalam kolom Shim-pack GIST<sup>®</sup> C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) pada suhu kolom 35°C yang dialiri fase gerak berupa air murni yang diatur pada pH 2,5 ± 0,1 dengan asam asetat glasial dan NaOH 0,1 M: asetonitril (87:13 v/v) dengan laju alir 1,4 mL/menit. Analit dideteksi dengan detektor PDA pada panjang gelombang 254 nm dan 243 nm untuk sampel urin dan plasma secara berurutan. Pengukuran pH dilakukan dengan pH meter digital (Mettler Toledo Seven Compact). Pengambilan volume larutan secara tepat dilakukan dengan mikropipet ukuran 10- 100 μL, dan 100 – 1000 μL (i-pipete). Untuk membuat sistem penangas air, maka gelas beker ukuran 500 mL dipanaskan di atas hotplate (IKA C-Mag HS 7). Selain itu digunakan alat-alat gelas yang lazim pada laboratorium.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa standar TMP (Sigma Aldrich, 99,8%) dan SMZ (Sigma Aldrich, 99%); metanol derajat HPLC (Sigma Aldrich); *ultrapure water* atau air murni yang diperoleh dari pemurnian air tanah menggunakan Purelab Flex 3 (ELGA LabWater UK); asam asetat glasial (Merck); asetonitril derajat HPLC (Sigma Aldrich); pellet natrium hidroksida (Merck); asam sulfat pekat (Merck); dan etil asetat derajat analisis (Merck); *penyaring* membran *cellulose nitrate* 0,45 μm (GE Healthcare Life Sciences) dan membran Chromafil Xtra PTFE-*syringe* 0,45 μm (Macherey-Nagel).

### Prosedur kerja

### **Pembuatan larutan asam asetat pH 2,5**

Fase air dibuat dengan mengencerkan asam asetat glasial menggunakan *ultrapure water* hingga diperoleh konsentrasi asam asetat dalam air adalah 1%. Selanjutnya, dilakukan pengukuran dan pengaturan pH hingga  $2,5 \pm 0,1$  dengan bantuan NaOH 0,1 M. Larutan ini disaring dengan membran *cellulose nitrate* 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **Pembuatan larutan stok**

Sejumlah serbuk baku pembanding ditimbang dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh larutan TMP dengan konsentrasi 1000 mg/L.

### **Preparasi standar kalibrasi dan sampel *quality control***

#### ***Urin***

Larutan standar kalibrasi TMP dibuat dengan mengencerkan larutan stok masing-masing 50, 100, 150, 300, 450, dan 600  $\mu\text{L}$  dengan urin bebas obat hingga tepat 10 mL untuk menghasilkan sampel simulasi dengan konsentrasi TMP dalam urin sebesar 5, 10, 15, 30, 45, dan 60 mg/L. Sampel *quality control* (QC) dibuat dengan prinsip kerja yang sama dengan larutan kalibrasi dengan konsentrasi TMP dalam urin 5, 16, 24, dan 46 mg/L.

#### ***Plasma***

Larutan intermediet standar TMP dibuat dengan menambahkan sejumlah larutan stok ke dalam labu takar 5 mL dan dilarutkan menggunakan metanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi larutan intermediet standar TMP 25, 55, 85, 115, 145, dan 175 mg/L. Masing-masing larutan intermediet sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke dalam 200  $\mu\text{L}$  plasma bebas obat, sehingga diperoleh konsentrasi TMP dalam plasma yakni 5, 11, 17, 23, 29, dan 35 mg/L. Sampel QC dibuat dengan prinsip kerja yang sama dengan sampel kalibrasi dengan konsentrasi TMP dalam plasma 5, 15, 18, dan 26 mg/L.

### **Preparasi sampel**

#### ***Urin***

Preparasi sampel urin dilakukan menggunakan teknik ekstraksi cair-cair dua tahap dengan etil asetat. Sebanyak 2,0 mL

sampel larutan standar kalibrasi, sampel QC, dan blanko masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi 15 mL. Pada tahap pertama, fase urin diasamkan dengan 1,0 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  30 mM lalu dipartisi dengan 2,0 mL etil asetat. Selanjutnya fase urin dibasakan dengan 2,0 mL NaOH 80 mM dan dipartisi kembali dengan etil asetat yang baru. Fase organik pada tahap kedua diambil dan diuapkan hingga kering di atas penangas air pada suhu  $80^\circ\text{C}$ . Residu direkonstitusi dengan 1,0 mL metanol dan disaring dengan penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$  sebelum dimasukkan ke dalam vial *autosampler* untuk dianalisis dengan KCKT.

#### ***Plasma***

Sebanyak 250  $\mu\text{L}$  sampel TMP dalam plasma dimasukkan dalam tabung microsentrifus dan dihomogenkan dengan vorteks selama 10 detik. Larutan ditambah dengan 750  $\mu\text{L}$  asetonitril dan dihomogenkan kembali selama 30 detik dengan vorteks. Campuran ini disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Supernatan diambil menggunakan *syringe*, disaring menggunakan penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$ , dan dimasukkan ke dalam vial *autosampler* untuk analisis dengan KCKT.

### **Validasi metode bioanalisis**

Validasi metode bioanalisis dilakukan berdasarkan panduan internasional Food and Drug Administration (FDA) dan European Medicine Agency (EMA). Metode dalam penelitian ini divalidasi dengan memeriksa selektivitas, linearitas, sensitivitas pada tingkat LLOQ dan limit of detection (LOD), akurasi dan presisi, serta stabilitas.

#### ***Selektivitas***

Penilaian selektivitas dilakukan dengan memeriksa kromatogram sampel QC pada konsentrasi terendah. Selektivitas memenuhi persyaratan bila tidak terbentuk puncak kromatogram yang tumpang tindih dan nilai resolusi antara dua puncak terdekat lebih dari dua. Apabila pada kromatogram sampel blanko muncul puncak dengan waktu retensi yang tumpang

tindih dengan analit maka selektivitas masih diterima apabila nilai AUC blanko urin <20% nilai AUC pada LLOQ.<sup>16,17</sup> Selain itu, dilakukan pemeriksaan dengan larutan standar SMZ dengan konsentrasi 10 mg/L untuk memastikan bahwa puncak TMP tidak terganggu dengan SMZ.

### Linearitas

Linearitas diukur menggunakan larutan standar kurva baku yang telah dipreparasi. Metode dinyatakan memenuhi linearitas apabila diperoleh nilai  $R \geq 0,99$  dan %-error maksimal  $\pm 15\%$  dari konsentrasi nominal, kecuali pada LLOQ maksimal  $\pm 20\%$  konsentrasi nominal.<sup>16,17,18</sup>

### Sensitivitas

LLOQ didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari kurva baku dengan lima replikasi yang memenuhi persyaratan akurasi dan presisi. Akurasi dinyatakan dalam persen kesalahan (%-error) dari konsentrasi nominal, sedangkan presisi dinyatakan dalam standar deviasi relatif (RSD). Nilai %-error dan RSD harus berada pada  $\pm 20\%$ . Penetapan LOD didasarkan pada metode visual. LOD ditetapkan sebagai konsentrasi terendah yang masih dapat menghasilkan puncak pada kromatografi dan hasil repetisi enam kali menghasilkan %RSD tidak lebih dari 17%.<sup>16,17</sup>

### Akurasi dan presisi

Pengujian akurasi dan presisi dilakukan dalam satu hari yang sama (*within-run*) dan tiga hari yang berbeda (*between-run*). Pengujian dilakukan menggunakan sampel QC dengan empat tingkatan konsentrasi. Persyaratan akurasi dan presisi yaitu nilai %-error dan %RSD harus berada pada  $\pm 15\%$ , kecuali pada LLOQ  $\pm 20\%$ .<sup>16,17</sup>

### Stabilitas

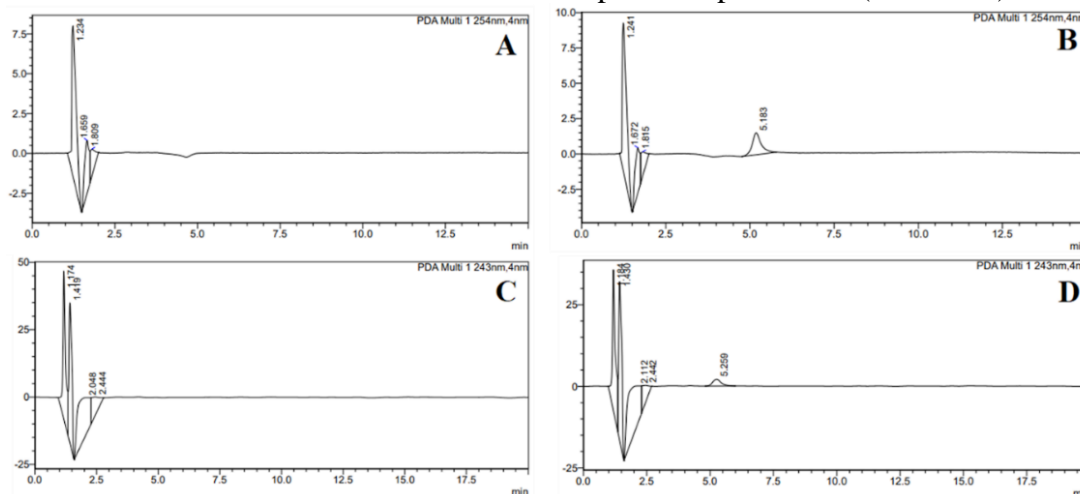
Uji stabilitas dilakukan untuk melihat bahwa analit dalam matriks sampel tidak mengalami perubahan konsentrasi di luar rentang persyaratan pada kondisi yang mensimulasikan proses. Kriteria penerimaan untuk stabilitas yakni %tersisa antara 85-115%. Stabilitas dilakukan dalam beberapa uji, diantaranya uji stabilitas stok (7 hari, 4°C), *freeze and thaw* (3 siklus beku-cair), *autosampler* (24 jam), jangka pendek (24 jam, 25°C), dan jangka menengah (2 bulan, -20°C).<sup>16,17</sup>

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Validasi Metode Bioanalisis

#### Selektivitas

Selektivitas dinilai dengan membandingkan kromatogram sampel blanko dan sampel QC. Sistem KCKT secara selektif mampu memisahkan TMP dan senyawa endogen ditandai dengan tidak adanya puncak lain di waktu retensi TMP pada sampel blanko (Gambar 1).



Gambar 1. Kromatogram A: Blanko urin bebas obat; B: TMP dalam urin; C: Blanko plasma bebas obat; D: TMP dalam plasma

Metode preparasi dengan ekstraksi cair-cair (ECC) dan presipitasi protein dapat meminimalkan keberadaan pengotor berupa senyawa metabolit yang berasal dari matriks sampel. Selain itu, dilakukan pemeriksaan terhadap larutan SMZ dan ditemukan bahwa puncak SMZ muncul pada waktu retensi 15,98 menit sehingga tidak mengganggu puncak TMP (kromatogram tidak ditunjukkan). Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode analisis memenuhi syarat validasi metode bioanalisis yakni tidak ada puncak lain yang tumpang tindih dengan puncak TMP.<sup>16,17</sup>

### **Linearitas**

Linearitas diuji dengan menginjeksikan larutan kerja dengan konsentrasi 5-60 mg/L untuk urin dan 5-35 mg/L. Kurva kalibrasi dibuat antara respon area yang dibandingkan dengan konsentrasi (Gambar 2). Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh persamaan regresi TMP yaitu  $y=2783,2x-221,29$  dalam urin dan  $y = 3202,2x - 3472$  dalam plasma. Nilai %-error tidak lebih dari 6,51% dan koefisien korelasi kedua persamaan sebesar 0,997. Dengan demikian metode dinyatakan memenuhi persyaratan linearitas dengan nilai konsentrasi masuk di dalam rentang farmakokinetika dan diperoleh nilai  $R \geq 0,99$  dan %-error tidak lebih dari  $\pm 15\%$ .<sup>16,17,18</sup>

### **Akurasi Presisi**

Akurasi dan presisi diuji menggunakan sampel QC pada empat tingkat konsentrasi yakni 5-46 mg/L untuk TMP dalam urin dan 5-26 mg/L untuk TMP dalam plasma (Tabel 1). Hasil pengujian menunjukkan bahwa metode analisis TMP dalam sampel urin dan plasma memiliki %-error  $\leq 10,29\%$  pada kisaran LLOQ dan %-error  $\leq 10,45\%$  di atas LLOQ. Nilai %RSD yang ditemukan sebesar  $\leq 11,79\%$  di tingkat LLOQ dan  $\leq 10,82\%$  di atas LLOQ. Baik pada sampel urin maupun plasma yang dilakukan secara *within-run* dan *between-run* memenuhi persyaratan dengan %-error dan RSD tidak melebihi 15% pada tingkat di atas LLOQ dan tidak lebih dari 20% pada tingkat LLOQ.<sup>16,17</sup>

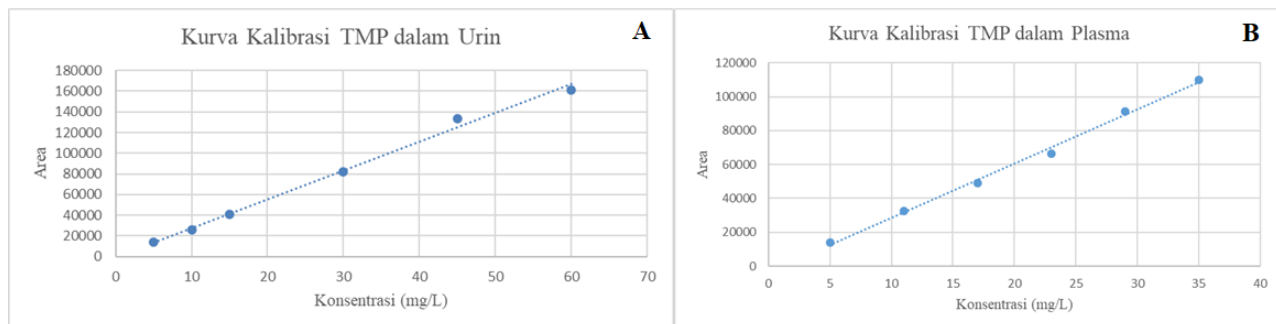
### **Limit of Detection (LOD)**

Penetapan LOD dilakukan dengan menggunakan metode visual. Metode visual dilakukan dengan mempersiapkan sampel pada konsentrasi analit yang sudah ditetapkan dan diencerkan hingga konsentrasi yang masih dapat dideteksi. Konsentrasi terakhir yang masih dapat dideteksi oleh KCKT adalah 0,7 mg/L untuk urin (Gambar 3) dan 3,6 mg/L untuk plasma (Gambar 4). Setelah dilakukan analisis larutan sampel QC pada daerah LOD diperoleh %RSD pada sampel urin sebesar 7,77% dan pada sampel plasma sebesar 13,02%. Nilai %RSD pada daerah LOD ini memenuhi persyaratan yakni  $\leq 17\%$ .<sup>19,20</sup>

### **Stabilitas**

Stabilitas TMP dilakukan dalam beberapa pengujian. Berdasarkan hasil pengujian larutan stok pada suhu 4°C, larutan stok TMP mulai tidak stabil pada hari ke-7 (Gambar 5). Sehingga larutan stok TMP hanya dapat digunakan selama  $\pm 5$  hari dan apabila melebihi waktu ini perlu dilakukan pembuatan larutan stok TMP kembali. Sedangkan pada pemeriksaan stabilitas TMP dalam sampel urin dan plasma (Tabel 2) yakni melalui pengujian jangka pendek, jangka menengah, *freeze-thaw*, dan *autosampler* dihasilkan nilai %tersisa berada pada rentang 85-115% sehingga TMP dapat dinyatakan stabil pada kondisi percobaan simulasi.<sup>16,17</sup>





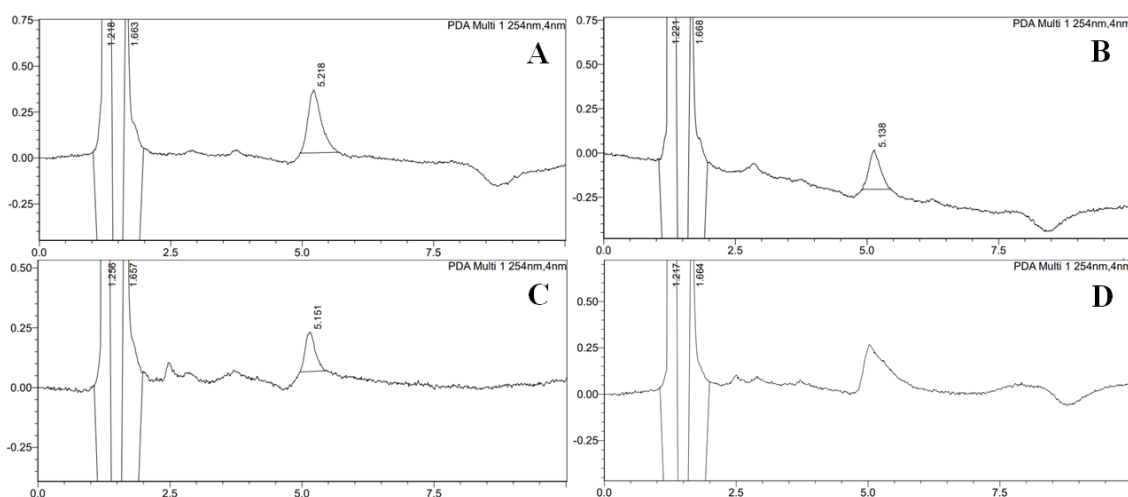
Gambar 2. Kurva kalibrasi TMP dalam sampel biologis. A: Urin manusia; B: plasma manusia

Tabel 1. Akurasi dan presisi metode analisis TMP dalam sampel urin dan plasma

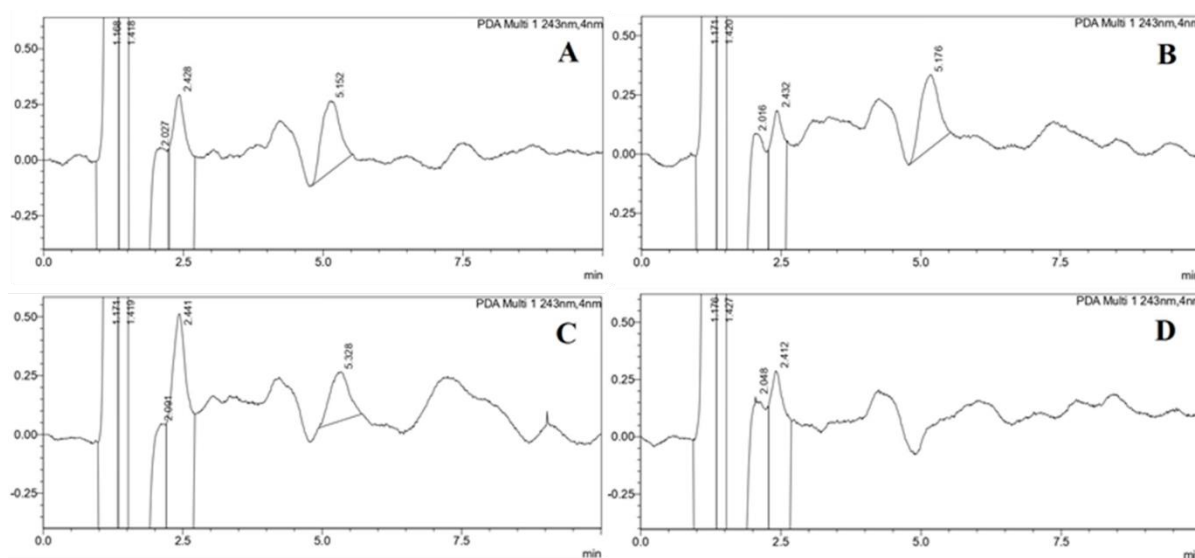
Sampel	Konsentrasi (mg/L)	Hari	Within run		Between run	
			Error (%)	RSD (%)	Error (%)	RSD (%)
Urin	5	1	8,79	12,45	9,25	11,79
		2	7,72	9,53		
		3	11,24	13,40		
	16	1	8,45	10,21	8,21	10,82
		2	7,52	10,91		
		3	8,65	11,34		
	24	1	6,50	7,89	7,08	6,33
		2	4,04	4,01		
		3	10,69	7,08		
	46	1	12,84	13,70	10,45	8,88
		2	8,51	9,67		
		3	10,00	3,28		
Plasma	5	1	14,16	12,90	10,29	10,00
		2	7,68	7,82		
		3	11,24	13,40		
	15	1	4,49	7,53	5,36	6,15
		2	5,03	4,51		
		3	6,55	6,41		
	18	1	3,43	3,85	3,82	4,99
		2	5,66	7,14		
		3	2,35	3,96		
	26	1	5,23	6,50	3,52	4,39
		2	2,06	2,76		
		3	3,27	3,92		

**Tabel 2. Stabilitas TMP dalam urin dan plasma manusia**

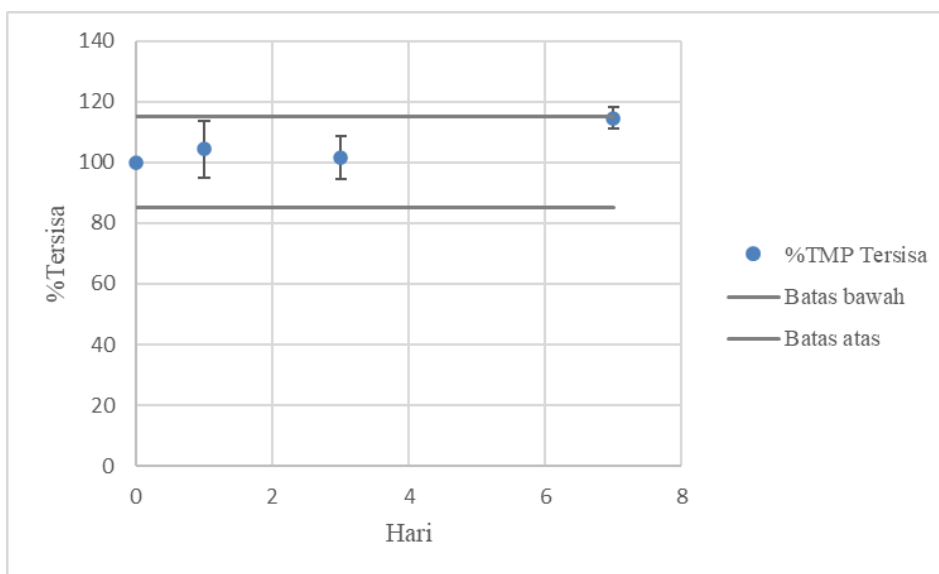
Uji Stabilitas	%Tersisa ( $\bar{x} \pm SD$ , %)	
	Urin	Plasma
24 jam setelah penyimpanan pada suhu 25°C	85,08 ± 0,62%	93,61 ± 0,93%
2 bulan setelah penyimpanan pada suhu -20°C	87,48 ± 1,28%	92,18 ± 1,13%
Tiga siklus beku (-20 ± 2°C) dan cair (25 ± 2°C)	86,56 ± 1,07	90,65 ± 1,19%
24 jam dalam <i>autosampler</i>	110,39 ± 0,44%	96,94 ± 0,63%



**Gambar 3. Kromatogram penentuan LOD secara visual TMP dalam urin manusia. A: TMP 0,9 mg/L; B: TMP: 0,8 mg/L; C: TMP 0,7 mg/L; D: TMP 0,6 mg/L**



**Gambar 4. Kromatogram Penentuan LOD secara visual TMP dalam plasma manusia. A: TMP 3,8 mg/L; B: TMP 3,7 mg/L; C: 3,6 mg/L; D: TMP 3,5 mg/L**



**Gambar 5. Stabilitas larutan stok TMP dalam penyimpanan 4°C selama 7 hari**

**KESIMPULAN**

Metode yang telah dikembangkan untuk menganalisis TMP dalam urin dan plasma manusia menggunakan KCKT-PDA dengan metode ECC dan presipitasi protein sebagai penyiapan sampel terbukti memenuhi persyaratan validasi metode bioanalisis dengan selektivitas, linearitas, akurasi, dan presisi yang dapat diterima berdasarkan panduan resmi yang dikeluarkan FDA dan EMA. Selain itu, stabilitas analit dalam urin dan plasma selama penyimpanan telah dievaluasi untuk mensimulasi kondisi pada saat penangangan sampel dan larutan baku kerja.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Terimakasih diucapkan kepada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya yang telah memberikan bantuan fasilitas penelitian.

**DAFTAR RUJUKAN**

1. Castiglione V, Cavalier E, Gadisseur R. Clinical data on rare Sulfamethoxazole crystalluria assessed by Fourier transform infrared spectrophotometry. *Data Brief.* 2018;21:2033-2036. doi: 10.1016/j.dib.2018.11.006.

2. Caron F, Wehrle V, Etienne M. The comeback of trimethoprim in France. *Medecine et maladies infectieuses.* 2017;47(4):253–60. doi:10.1016/j.medmal.2016.12.001.
3. Heudorf U, Weindel M, Wagenlehner F. Antibiotic resistance and antibiotic consumption in a region-using the example of community-acquired urinary tract infections. *Aktuelle Urologie.* 2021; doi: 10.1055/a-1468-8212.
4. Ahmed H, Farewell D, Jones HM, Francis NA, Paranjothy S, Butler CC. Antibiotic prophylaxis and clinical outcomes among older adults with recurrent urinary tract infection: cohort study. *Age and ageing.* 2019;48(2):228–34. doi: 10.1093/ageing/afy146.
5. Hampton T, Whitehall E, Beasley C, Stevens K, Lowe N, Hogg E, et al. Recurrent acute otitis media: a survey of current management in England. *The Journal of Laryngology & Otology.* 2021;135(10):855–7. doi: 10.1017/S0022215121001924.
6. Soudais B, Ribeaucoup F, Schuers M. Guidelines for the management of male urinary tract infections in primary care: a lack of international consensus-a systematic review of the literature. *Family Practice.* 2022:cmac068. doi: 10.1093/fampra/cmacc068.
7. More AS, Bhangre NR, Gadekar KG, Kulkarni SG. Trimethoprim-induced



- hyperkalemia in renal transplant recipient. *Indian Journal of Transplantation*. 2018;12(2):149. doi: 10.4103/ijot.ijot\_4\_18.
8. Yokoyama S, Nakagawa J, Aiuchi N, Seito T, Niioka T. Impact of trimethoprim on serum creatinine, sodium, and potassium concentrations in patients taking trimethoprim-sulfamethoxazole without changes in glomerular filtration rate. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2022; doi: 10.1111/jcpt.13679.
  9. Crellin E, Mansfield KE, Leyrat C, Nitsch D, Douglas IJ, Root A, et al. Trimethoprim use for urinary tract infection and risk of adverse outcomes in older patients: cohort study. *British Medical Journal*. 2018;360. doi: 10.1136/bmj.k341.
  10. Rajput J, Moore LS, Mughal N, Hughes S. Evaluating the risk of hyperkalemia and acute kidney injury with cotrimoxazole: a retrospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(12):1651–7. doi: 10.1016/j.cmi.2020.02.021.
  11. El-Najjar N, Hösl J, Holzmann T, Jantsch J, Gessner A. UPLC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of 10 antibiotics used in intensive care units. *Drug Testing and Analysis*. 2018;10(3):584-591. doi: 10.1002/dta.2253.
  12. Fatica E, Faber J, Gaffron C, Bjergum M, Langman L, Jannetto P. Quantification of Serum Sulfamethoxazole and Trimethoprim by Ultra-fast Solid-Phase Extraction-Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2020;42(5):724-732. doi: 10.1097/FTD.0000000000000785.
  13. Rehm S, Rentsch KM. LC-MS/MS method for nine different antibiotics. *Clinica Chimica Acta*. 2020;511:360–7. doi: 10.1016/j.cca.2020.11.001.
  14. Hruska MW, Frye RF. Determination of trimethoprim in low-volume human plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2004;807(2):301–5. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.04.021.
  15. Liu L, Wan Q, Xu X, Duan S, Yang C. Combination of micelle collapse and field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in animal-originated foodstuffs. *Food Chemistry*. 2017;219:7-12. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.118.
  16. Food and Drug Administration. *Bioanalytical method validation guidance for industry*. US Department of Health and Human Services 2018.
  17. Kaza M, Karaźniewicz-Łada M, Kosicka K, Siemiątkowska A, Rudzki PJ. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;165:381-385. doi: 10.1016/j.jpba.2018.12.030.
  18. International Conference on Harmonization. *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis*. 2022.
  19. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons, 2011.
  20. Sonawane SS, Chhajed SS, Attar SS. An approach to select linear regression model in bioanalytical method validation. *Journal of Analytical Sciences and Technology*. 2019; 10:1-7. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0160-2>.