

# Strukturna karakterizacija febuksostata i njegovih onečišćenja HPLC-DAD-MSn metodom

---

**Kukor, Tomislav**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:547928>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Tomislav Kukor**

**Strukturalna karakterizacija febuksostata i  
njegovih onečišćenja HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> metodom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

*Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Mirandi Sertić prije svega na ukazanom povjerenju, strpljenju, entuzijazmu, stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem, također, svojim prijateljima – bezrezervnoj podršci s kojima sam proživio studentske dane i koji su iste učinili ljepšima.*

*Najveća hvala mojoj obitelji i roditeljima koji su uvijek bili uz mene, podržavali me u odlukama te ohrabivali i motivirali u teškim trenucima.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Giht i hiperuricemija .....	1
1.2. Febuksostat.....	2
1.2.1. Mehanizam djelovanja.....	3
1.2.2. Farmakokinetika .....	3
1.2.3. Doziranje i prilagodbe doze.....	4
1.2.4. Nuspojave i interakcije s lijekovima.....	4
1.3. Masena spektrometrija.....	5
1.3.1. Dijelovi masenog spektrometra i princip tehnike .....	6
1.3.2. Ionizatori i analizatori.....	7
1.3.3. Vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS) .....	10
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>13</b>
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Kemikalije, standardne supstancije i plinovi .....	13
3.1.2. Radni instrumenti.....	13
3.1.3. Pribor .....	14
3.1.4. Programski paketi .....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema mobilne faze .....	15
3.2.2. Priprema standardnih otopina .....	15
3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka iz gotovog ljekovitog oblika .....	15
3.2.4. Uvjeti analize uzoraka .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>17</b>
4.1. Identifikacija analita i odabir valne duljine detekcije.....	17
4.2. Analiza masenih spektara i fragmentacijski putovi analita .....	21
4.2.1. Febuksostat .....	21

4.2.2. Febuksostat amid .....	23
4.2.3. Febuksostat DEE .....	26
4.2.4. Etil-febuksostat .....	28
4.3. Analiza onečišćenja u tableti febeksostata .....	30
4.3.1. Detekcija febeksostat amida .....	33
4.3.2. Detekcija febeksostat DEE-a .....	34
4.3.3. Detekcija etil-febeksostata .....	35
4.3.4. Ostala onečišćenja u ispitivanom uzorku .....	36
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>40</b>
<b>7. SAŽETAK / SUMMARY .....</b>	<b>42</b>
7.1. Sažetak .....	42
7.2. Summary .....	43

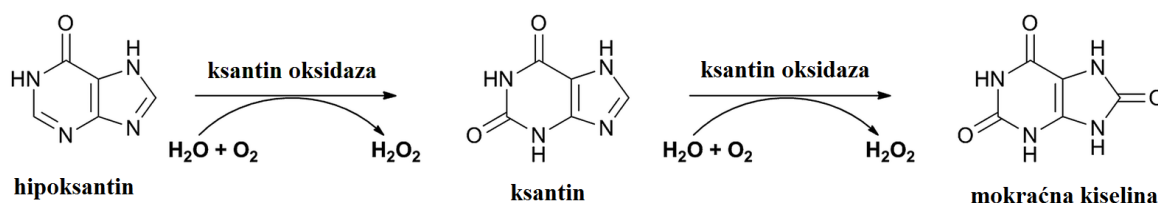
## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

# 1. UVOD

## 1.1. Giht i hiperuricemija

Giht je metabolička bolest karakterizirana ponavljanim napadima upalnog artritisa. U patofiziologiji bolesti ističe se značajna uloga mokraćne kiseline, kao i enzima ksantin oksidaze koji je bitan u metabolizmu purina, a ujedno i zaslužan za nastanak mokraćne kiseline. Naime, ksantin oksidaza katalizira oksidaciju hipoksantina u ksantin te njegovu daljnju oksidaciju u mokraćnu kiselinu (Slika 1). Upravo je glavni uzrok gihta stanje povećane koncentracije mokraćne kiseline u krvi, takozvana hiperuricemija (serumska koncentracija > 6,8 mg/dL) (Khanna i sur., 2012), a može biti uzrokovana povećanim stvaranjem mokraćne kiseline ili neadekvatnom eliminacijom mokraćne kiseline bubregom. Posljedično tomu, dolazi do stvaranja uratnih kristala i njihova odlaganja u vezivnom tkivu zgloba, zglobnim prostorima, hrskavici ili tetivama što pokreće upalnu reakciju i bolne napade; nakon nekoliko napada bolest postaje kronična, praćena deformacijom zgloba.



**Slika 1.** *Metaboličke reakcije katalizirane ksantin oksidazom  
(modificirano prema: Rodrigues i sur., 2015)*

Zlatni standard u farmakološkoj terapiji gihta jest alopurinol, ujedno i prva linija liječenja. Alopurinol se nakon apsorpcije pretvara u aktivni metabolit oksipurinol, djeluje kao purinski inhibitor ksantin oksidaze te tako smanjuje koncentraciju mokraćne kiseline u krvi ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Premda je alopurinol zlatni standard u terapiji gihta, on se ne koristi za suzbijanje akutnog napada. U slučaju akutnog napada moguće je pristupiti na više načina:

- nesteroidnim protuupalnim lijekovima – prvenstveno smanjuju bol, ali pokazuju i učinkovitost u smanjenju upalnog procesa

- b) kolhicinom – vrlo učinkovit u smanjenju boli i oteklina, kao i u prevenciji budućih napada, ali se njegova upotreba napušta ili izbjegava zbog nuspojava (gastrointestinalne smetnje)
- c) oralnim kortikosteroidima – učinkoviti u smanjenju upalnog procesa, daju se kod uznapredovalog napada u kojem nesteroidni protuupalni lijekovi ili kolhicin nisu pokazali dovoljno snažan učinak (Chohan, 2011)

Nakon toga, kako bi se prevenirali novi akutni napadi i kako bi se održavala približno stalna koncentracija mokraćne kiseline u krvi, može se započeti dugotrajna terapija alopurinolom. Kako otprilike 10% pacijenata ne podnosi alopurinol zbog reakcija preosjetljivosti (kožne reakcije, vaskulitisi) (Chohan, 2011) ili im je alopurinol kontraindiciran zbog teške bubrežne insuficijencije, razvijen je noviji lijek kao zamjena alopurinolu – febuksostat.

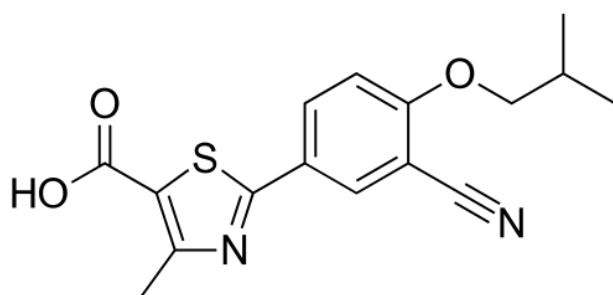
## 1.2. Febuksostat

Febuksostat je oralni lijek registriran i odobren za liječenje kronične hiperuricemije u stanjima postojećih depozita urata i/ili uričnog artritisa ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Prema ATK klasifikaciji pripada u skupinu M04 (Lijekovi koji inhibiraju stvaranje urične kiseline). Koristi se u kroničnoj farmakološkoj terapiji gihta, kao druga linija liječenja nakon neuspjelih nefarmakoloških mjera i nemogućnosti korištenja alopurinola. Febuksostat je, u odnosu na alopurinol, učinkovitiji u sniženju vrijednosti koncentracije mokraćne kiseline u krvi. Budući da je glavni cilj primjene febuksostata smanjenje učestalosti i prevencija novih napada gihta, on se u terapiju uvodi 1 – 2 tjedna nakon akutnog napada i potrebno ga je kontinuirano koristiti, čak i u slučaju novog akutnog napada. Na početku liječenja febuksostatom moguć je napad gihta, stoga se terapiji dodaje neki nesteroidni protuupalni lijek ili kolhicin tijekom minimalno šest mjeseci s ciljem prevencije opisane nuspojave ([www.lancsmmg.nhs.uk](http://www.lancsmmg.nhs.uk)).

Europska je agencija za lijekove (engl. *European medicines agency, EMA*) 2006. godine zaprimila zahtjev za stavljanjem febuksostata na tržište, a konačno je odobrenje za stavljanje lijeka u promet na području Europske unije dala Europska komisija u travnju 2008. pod zaštićenim imenom *Adenuric*<sup>®</sup>. HALMED (*Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode*) dao je odobrenje za stavljanje *Adenurica*<sup>®</sup> (febuksostat) u promet na području Republike Hrvatske u ožujku 2012. Dostupan je u obliku filmom obloženih tableta, i to u dvjema dozama: 80 mg i 120 mg ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu); [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### 1.2.1. Mehanizam djelovanja

Febuksostat (2-(3-cijano-4-izobutoksifenil)-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina) tiazolni je derivat i snažan, selektivan, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze. Inhibicijom ksantin oksidaze smanjuje se stvaranje mokraćne kiseline što pridonosi uklanjanju stanja hiperuricemije i smanjenju rizika akutnog napada gihta. Febuksostat ne inhibira druge enzime uključene u metabolizam purina i pirimidina kao npr. gvanin deaminazu, hipoksantin gvanin fosforiboziltransferazu i sl. jer ne sadrži purinski prsten (www.ema.europa.eu). Na Slici 2 prikazana je kemijska struktura febuksostata.



**Slika 2.** *Kemijska struktura febuksostata*

### 1.2.2. Farmakokinetika

Febuksostat se nakon oralne primjene apsorbira brzo i dobro – vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije lijeka u krvi iznosi otprilike 60 minuta (Khosravan i sur., 2006), dok postotak apsorbiranog lijeka iznosi više od 84%. Primjena febuksostata uz hranu ne utječe na njegovu kliničku učinkovitost u smanjenju koncentracije mokraćne kiseline u krvi što upućuje na mogućnost primjene neovisno o hrani. Snažno se veže na proteine plazme, ponajviše albumin (postotak vezanja nakon apsorpcije iznosi oko 99,2%) (Khosravan i sur., 2006). Opsežne reakcije biotransformacije odvijaju se u jetri na dva načina: dominantno glukuronidacijom uz enzim uridin-difosfoglukuronoziltransferazu (UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9) u acil-glukuronidne metabolite te manjim dijelom oksidacijom uz enzime iz sustava citokroma P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8) u aktivne metabolite. Eliminacija febuksostata vrši se podjednako putem jetre i bubrega pri čemu je u urinu dominantan acil-glukuronidni metabolit, dok su u stolici ponajviše prisutni oksidirani



metaboliti i njihovi konjugati ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Poluvrijeme života febeksostata u plazmi iznosi između 5 i 8 sati ([www.reference.medscape.com](http://www.reference.medscape.com)).

### **1.2.3. Doziranje i prilagodbe doze**

Preporučena doza febeksostata iznosi 80 mg dnevno, primijenjeno jednokratno, neovisno o hrani. Ukoliko se ne postigne značajno smanjenje koncentracije mokraćne kiseline u krvi nakon 2 – 4 tjedna primjene lijeka ( $< 6$  mg/dL), doza se može povećati na 120 mg dnevno, jednokratno. Ujedno, doza od 120 mg je i maksimalna dnevna doza febeksostata.

Nije potrebna prilagodba doze kod blage i umjerene kronične bubrežne bolesti (klirens kreatinina  $30 - 89$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>), međutim kod teške kronične bubrežne bolesti gdje klirens kreatinina iznosi  $< 30$  mL/min/1,73m<sup>2</sup> potreban je oprez prilikom primjene febeksostata zbog njegove poznate eliminacije bubregom, odnosno urinom. U slučaju zatajenja jetre preporuke su slične – kod blagog (Child-Pugh stadij A) i umjerenog (Child-Pugh stadij B) zatajenja nije potrebna prilagodba doze, međutim nije ni preporučeno uzimati više od 80 mg lijeka dnevno. Primjena febeksostata kod teškog zatajenja jetre (Child-Pugh stadij C) nije klinički ispitana, stoga se njegova primjena savjetuje uz oprez. Febeksostat nije preporučeno koristiti tijekom trudnoće i dojenja, a sigurnost primjene i učinkovitost kod djece do 18 godina također nisu ispitani ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### **1.2.4. Nuspojave i interakcije s lijekovima**

Nuspojave febeksostata mogu se klasificirati na dva glavna načina: prema ozbiljnosti ili prema učestalosti nuspojave. Glavnina nuspojava pripada u blage, odnosno umjerene nuspojave, dok se manji broj svrstava u rijetke, ali ozbiljne. Od najčešćih se nuspojava ističu napadi gihta na početku liječenja (zbog naglog pada koncentracije mokraćne kiseline u krvi i posljedične mobilizacije urata iz tkivnih naslaga), gastrointestinalni problemi (proljev, mučnina, povraćanje), vrtoglavica, glavobolja, kožni osip, edemi. Ozbiljne i po život opasne nuspojave rijetke su i prvenstveno se odnose na reakcije preosjetljivosti na febeksostat koje se mogu manifestirati kao Steven-Johnsonov sindrom, toksična epidermalna nekroliza ili anafilaktički šok. Takve reakcije ujedno mogu biti dodatno karakterizirane vrućicom i hematološkim promjenama te zahvaćanjem jetre ili bubrega. Također, moguće su nuspojave

na razini kardiovaskularnog sustava koje uključuju kardiovaskularnu smrt, nefatalni infarkt miokarda i nefatalni moždani udar ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Zbog mehanizma djelovanja feboksostata inhibicijom ksantin oksidaze očekivane su farmakodinamičke interakcije s lijekovima koji taj enzim koriste u svom metabolizmu, poput azatioprina, merkaptopurina, teofilina. U slučaju istovremene primjene nekog od ovih lijekova s feboksostatom, očekuje se povećanje koncentracije primijenjenog lijeka u krvi što može dovesti do toksičnih učinaka (Phansalkar i sur., 2012). Istovremena se primjena azatioprina ili merkaptopurina s feboksostatom ne preporučuje, dok primjena teofilina i feboksostata ne zahtijeva nikakve prilagodbe jer je kliničko ispitivanje iz 2012. godine pokazalo da ne dolazi do promjene farmakokinetike teofilina prilikom administracije 80 mg feboksostata i 400 mg teofilina (Tsai i sur., 2012). S druge strane, moguće su i metaboličke interakcije, i to zbog lijekova koji inhibiraju ili induciraju enzime zadužene za metabolizam feboksostata. Često korišteni lijekovi, a ujedno inhibitori UGT enzima, nesteroidni su protuupalni lijekovi poput naproksena ili indometacina, međutim nisu u klinički značajnoj interakciji s feboksostatom pa se mogu primjenjivati zajedno bez prilagodbe doze. Također, nije potrebna ni prilagodba doze tijekom istovremene primjene feboksostata s antacidima, kolhicinom, hidroklorotiazidom, varfarinom. Ipak, savjetuje se oprez u slučaju primjene induktora UGT enzima (rifampicin, fenitoin, fenobarbital...) i feboksostata jer može doći do njegovog smanjenog učinka ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

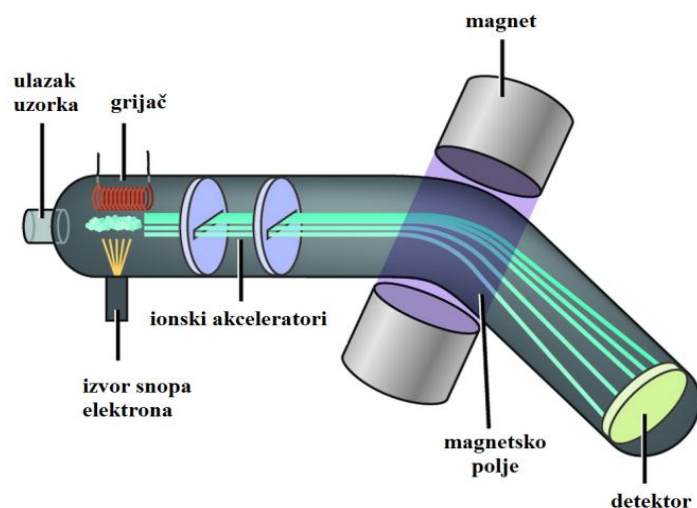
### **1.3. Masena spektrometrija**

Masena je spektrometrija tehnika koja omogućuje analizu molekula na temelju njihove molekulske mase. Postupak započinje ionizacijom molekule analita u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska u visoki vakuum pri čemu nastaje molekulski ion u plinovitom stanju. Međutim, tijekom ionizacije molekule analita moguća je i njena fragmentacija, stoga nastaju molekulski fragmenti, također nabijeni i u plinovitom stanju. Ioni se analita zatim ubrzavaju te uvode u električno ili magnetsko polje u kojem se razdvajaju ovisno o njihovu omjeru mase i naboja ( $m/z$ ), a konačno se, proizvodeći električni signal, detektiraju (Watson, 1999). Rezultat cijelog postupka jest maseni spektar na temelju kojeg se može odrediti molekulska masa ionizirane molekule analita ili bilo kojeg fragmenta nastalog fragmentacijom, a istovremeno moguća je i njihova kvantifikacija.

Mogućnosti su masene spektrometrije velike, ne samo u analitici lijekova, već i u drugim znanstvenim disciplinama. Tehnika je to koja omogućuje određivanje relativne molekulske mase nepoznatih molekula, izotopnog sastava uzorka, određivanje strukture i potvrdu identiteta ljekovitih tvari. Unatoč svemu tome, masena je spektrometrija doživjela pravi procvat kad se povezala sa separacijskim tehnikama, i to u početku s plinskom (GC-MS), a kasnije i s tekućinskom kromatografijom (LC-MS). Takvi su vezani sustavi zbog visoke selektivnosti, osjetljivosti te niske granice detekcije (Nigović, 2015a) postali vodeći u strukturnoj karakterizaciji i kvantifikaciji tragova onečišćenja u lijekovima, analizi lijekova u biološkim tekućinama (omogućena kvantifikacija i strukturna karakterizacija metabolita) te u proteomici. Glavni nedostatak masene spektrometrije obuhvaća činjenicu da je to destruktivna tehnika – uzorak analita unesen u uređaj nepovratno se troši, no, kako su u masenoj spektrometriji potrebne vrlo male količine uzoraka, ovaj nedostatak i nije toliko izražen (Ahuja i Scypinski, 2001). Nadalje, tehnika je ograničena i ekonomskim aspektima, tj. uređaj je skup, a rukovanje njime zahtijeva obrazovanog stručnjaka.

### **1.3.1. Dijelovi masenog spektrometra i princip tehnike**

Maseni se spektrometar sastoji od triju glavnih dijelova: ionizatora, analizatora masa i detektora (Mornar i sur., 2013). Uzorak se u obliku vodene otopine ili otopine u organskom otapalu injektira u uređaj. Na kraju sonde za injektiranje nalazi se grijač koji generiranjem topline dovodi do isparavanja uzorka. Uzorak se zatim uvodi u ionizacijsku komoru unutar koje dolazi do ionizacije i eventualne fragmentacije analita nekom od metoda ionizacije. Nastali se ioni ubrzavaju između pločica za ubrzanje te se takvi uvode u analizator masa. Premda se maseni spektrometri razlikuju ovisno o tipu analizatora, a u skladu s time i principom rada, konačni je rezultat prolaska iona kroz analizator njihovo razdvajanje prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Na izlasku iz analizatora smješten je detektor čija je uloga dvostruka: svakom registriranom ionu određuje omjer mase i naboja te mjeri koliko je pojedinog iona registrirao. Masenom se spektrometrijom dobiva maseni spektar analita koji pokazuje relativnu zastupljenost raznih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i naboja iona (Nigović, 2015b). Na Slici 3 prikazan je shematski prikaz masenog spektrometra.



**Slika 3.** Shematski prikaz masenog spektrometra  
(modificirano prema: [www.khanacademy.org](http://www.khanacademy.org))

### 1.3.2. Ionizatori i analizatori

Ionizacija se analita može provoditi na više načina, a temelji se na predaji energije molekuli analita pri čemu, ovisno o broju skupina pogodnih za ionizaciju, nastaju jednostruko ili višestruko nabijeni ioni analita. Ukoliko se ionizacija temelji na predaji manje količine energije molekuli analita, govori se o blagim ionizacijskim tehnikama (engl. *soft ionization*), a ako se predaje velika količina energije, riječ je o čvrstim ionizacijskim tehnikama (engl. *hard ionization*). Blage se ionizacijske tehnike koriste kad je potrebno dobiti signal molekulskog iona. Budući da kod čvrstih ionizacijskih tehnika dolazi do fragmentacije molekule analita, one se koriste za određivanje strukture analita (Mornar i sur., 2013). Pet je temeljnih načina ionizacije molekule analita:

- a) Ionizacija djelovanjem snopa elektrona (engl. *Electron impact ionization*) provodi se tako da se plinoviti uzorak izlaže elektronima energije 70 eV. Energija elektrona u interakciji s molekulom analita veća je od energije sadržane u njenim kemijskim vezama, stoga dolazi do ionizacije (Balogh, 2009). Nastaje visokoreaktivni molekulski ion  $M^+$  unutar kojeg može doći do pucanja kemijskih veza, odnosno fragmentacije. Dobiveni maseni spektar karakterističan je za ispitivanu tvar, a zbog značajne fragmentacije pik je molekulskog iona slabo izražen. Ova ionizacijska tehnika nije prikladna za termolabilne i nehlapljive analite, a omogućuje potvrdu identiteta

- ispitivanog analita usporedbom dobivenog masenog spektra s referentnim spektrom ili određivanje nepoznate strukture analita interpretacijom fragmentacijskih mehanizama.
- b) Kemijska ionizacija (engl. *Chemical ionization*) često je korištena u spregnutim sustavima tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS). Ionizacija analita događa se posredno, preko inertnog plina ( $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $C_4H_{10}$ ,  $NH_3$ ...). Uzorak u plinovitom stanju pomiješa se s viškom inertnog plina te se zajedno izlažu visokoenergetskim elektronima. Dolazi do ionizacije molekula inertnog plina, a nastali ioni potiču kemijsku ionizaciju molekula analita pri čemu najčešće dolazi do prijenosa protona s inertnog plina na analit –  $[M+H]^+$ . Fragmentiranje analita znatno je manje, stoga je pik molekulskog iona jasno vidljiv u masenom spektru. Tehnika je prikladna za termolabilne i hlapljive analite.
- c) Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*) najčešće je korištena u LC-MS sustavima. Mobilna faza dolazi s tekućinskog kromatografa prolazeći kroz usku kapilaru čiji je kraj na visokom potencijalu (2 – 5 kV) (Cindrić i sur., 2009). Kako mobilna faza izlazi iz kapilare, dolazi do raspršenja uzorka pri atmosferskom tlaku i disocijacije molekule analita. Raspršenje potpomaže i struja zagrijanog plina za sušenje (dušik) koja uzrokuje isparavanje otapala. Pritom se kapljice mobilne faze smanjuju, a površinski naboj koji potječe od istovrsno nabijenih iona analita raste. U nekom trenutku odbojne sile između iona prevladaju sile napetosti površine, kapljica se dodatno rasprsnje te nastaju pojedinačni ioni u plinovitom stanju. Oni mogu biti pozitivno i negativno nabijeni, a tehnika je prikladna za analizu kako manjih, tako i većih molekula poput proteina i peptida (Mornar i sur., 2013; Sertić, 2013).
- d) Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionization*) slična je ionizaciji elektroraspršenjem. Mobilna se faza s tekućinskog kromatografa kapilaram dovodi u zagrijanu komoru te se djelovanjem visoke temperature i struje dušika raspršuje u kapljice. Kao i kod kemijske ionizacije koriste se elektroni koji posredno uzrokuju ionizaciju analita. Važno je uočiti da se ionizacija analita odvija u plinovitom stanju (Mornar i sur., 2013), dok se kod ionizacije elektroraspršivanjem odvija u tekućem stanju. Molekulski ion najčešće je protoniran, ali često se stvaraju i aduktori s ionima soli, npr.  $NH_4^+$ . Tehnika nije primjenjiva za termolabilne i nehlapljive analite.
- e) Matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-assisted laser desorption ionization*) tehnika je najčešće korištena za analizu visokomolekularnih spojeva poput proteina. Analit se ugrađuje u kristalnu strukturu

molekula matriksa (Mornar i sur., 2013) i kristalizira s matriksom nakon isparavanja otapala (Nigović, 2015b). Na takav se matriks zatim djeluje laserskom zrakom pri čemu se on trenutno zagrijava. Zagrijavanjem dolazi do isparavanja i ionizacije molekula matriksa i analita, a nastali su ioni protonirane molekule, uz slabo izraženu fragmentaciju. Prednost ovakve ionizacije relativna je neosjetljivost na onečišćenja u uzorcima poput soli, pufera i detergenata (Mornar i sur., 2013), ali je ograničena samo na analizator vremena leta (engl. *Time of flight*, TOF), što predstavlja nedostatak.

Nakon što su molekule analita uspješno ionizirane, ioni ulaze u analizator masa. Njegova je svrha nastale ione analita razdvojiti prema omjeru mase i naboja. Više je dostupnih analizatora masa, a najčešća su sljedeća četiri tipa:

- a) Magnetski analizator (engl. *Magnetic sector mass analyzer*) radi tako da se nastali ioni analita ubrzavaju djelovanjem električnog polja (3 – 8 kV) (Watson, 1999), a nakon toga se uvode u magnetsko polje. U magnetskom polju dobivaju otklon ovisno o omjeru mase i naboja. Masa iona analita i veličina otklona obrnuto su proporcionalni, stoga ioni veće mase imaju manji otklon, i obrnuto:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

gdje je  $m$  masa,  $z$  naboj,  $B$  jakost magnetskog polja,  $r$  radijus puta iona, a  $V$  napon ubrzavanja. Samo za konstantan  $B$  i  $V$  ioni s odgovarajućim omjerom  $m/z$  doći će do detektora, a ostali će se sudariti sa stijenkom cijevi kroz koju putuju ili neće pogoditi pukotinu koja vodi do detektora. Da bi se detektirali ioni šireg raspona mase, potrebno je varirati jakost magnetskog polja,  $B$ . Zbog toga ovaj analizator radi sporije, ali ima vrlo visoku razlučivost (Watson, 1999).

- b) Kvadrupolni analizator masa (engl. *Quadrupole mass analyzer*) primjenjuje dva elektrostatska polja (pozitivnog i negativnog polariteta) međusobno orijentirana pod pravim kutem. Jedno elektrostatsko polje oscilira što rezultira stvaranjem rezonantne frekvencije za svaku  $m/z$  vrijednost. Samo ioni koji rezoniraju na frekvenciji kvadrupolnog analizatora mogu biti detektirani jer im je putanja stabilna dok se ostali sudaraju sa stijenkom analizatora (Watson, 1999). Ovim se analizatorom može selektirati ion točno određenog omjera  $m/z$  ili se, mijenjajući napon elektrostatskog

polja, varirati kvadrupolna frekvencija te, posljedično, detektirati ione šireg raspona omjera  $m/z$ .

- c) Analizator stupica za ione (engl. *Ion-trap mass analyzer*) trodimenzionalni je analog kvadrupolnog analizatora (Wong i Graham Cooks, 1997). Sastavljen je od dviju kružnih i dviju polukružnih elektroda koje okružuju prostor za zadržavanje iona. U tom prostoru, tzv. stupici, ioni osciliraju sve dok zbog promjene napona ne budu izbačeni van (Sertić, 2013). Ovo daje analitičaru mogućnost odabira i izolacije jednog točno određenog iona iz smjese iona. Tako izolirani ion moguće je primjenom plina helija fragmentirati (Sertić, 2013). Glavna je prednost analizatora stupice za ione mogućnost daljnjih fragmentacija, tj. odabrani se ion može dalje fragmentirati, a nakon toga moguće je među njegovim fragmentnim ionima ponovno izolirati jedan i fragmentirati ga dalje. Izolacija i fragmentacija događaju se u istom prostoru (Mornar i sur., 2013).
- d) Analizator vremena leta (engl. *Time of flight mass analyzer*) radi tako da se za početak ioni ubrzavaju djelovanjem pulsnog homogenog električnog polja. Rezultat djelovanja električnog polja jest takav da svi ioni istog naboja imaju jednaku kinetičku energiju (Balogh, 2009). Tako se ubrzani ioni puste da putuju kroz dugu cijev različitim brzinama pri čemu brzina putovanja iona ovisi o njegovoj masi, i to obrnuto proporcionalno. Budući da ioni manje mase kroz cijev putuju brže, potrebno im je manje vremena za dolazak do detektora i obrnuto. Na temelju mjerenja vremena potrebnog za dolazak do detektora moguće je odrediti masu iona analita, odnosno omjer  $m/z$ . Ovaj se analizator najčešće upotrebljava u analitici peptida i proteina, međutim može se koristiti i za manje molekule.

### **1.3.3. Vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS)**

Vezani je sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS) tehnika koja ujedinjuje separacijske mogućnosti tekućinske kromatografije i mogućnosti analize masa masene spektrometrije. Prolaskom uzorka kroz kolonu tekućinskog kromatografa (najčešće tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC) dolazi do razdvajanja komponenata uzorka. Uzorak se s kolone dalje prenosi u maseni spektrometar kojim se dobiva uvid u maseni spektar svake komponente uzorka što može poslužiti u potvrdi njenog identiteta ili strukturnoj karakterizaciji. Rezultat je analize ovakvim LC-MS vezanim sustavom kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total ion current chromatogram*, TIC)

koji predstavlja ukupni intenzitet signala (svih masenih pikova) u cijelom raponu mase snimljen u svakom trenutku analize. Glavna je prednost LC-MS vezanog sustava mogućnost dobivanja kromatograma izoliranih iona (engl. *Extracted ion chromatogram*, EIC) što znači da je iz kromatograma ukupne ionske struje moguće izvući podatke samo za interesni pik. Na ovaj se način uspješno doskače čestom problemu u tekućinskoj kromatografiji – neodjeljivanju kromatografskih pikova u baznoj liniji. U LC-MS sustavu, čak i ako pikovi nisu odvojeni u baznoj liniji u kromatogramu ukupne ionske struje, moguće ih je prikazati kao pojedinačne pikove u kromatogramima izoliranih iona.

LC-MS vezani sustavi ujedinjuju prednosti tekućinske kromatografije i masene spektrometrije, a ujedno i uklanjaju nedostatke obiju pojedinačnih tehnika. Upravo su zbog toga ovi vezani sustavi pronašli svoje mjesto u brojnim znanstvenim i industrijskim disciplinama uključujući i farmaceutsku industriju. Postali su nezamjenjivi, primjerice, u identifikaciji i strukturnoj karakterizaciji onečišćenja niske koncentracije u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima zahvaljujući svojoj brzini, osjetljivosti i selektivnosti (Sertić, 2013).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ispitivanje čistoće aktivnih farmaceutskih supstancija jedan je od ključnih koraka u osiguranju njihove kvalitete. Onečišćenje u lijekovima može se definirati kao bilo koji sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar (ICH Q3A). Nažalost, onečišćenja nisu bezazlena jer mogu imati farmakološku aktivnost ili toksična svojstva, mogu utjecati na aktivnost i/ili stabilnost ljekovite aktivne tvari, a u konačnici mogu i utjecati na rezultate analitičkih postupaka. Budući da je onečišćenja gotovo nemoguće izbjeći, zakonska im regulativa pristupa vrlo strogo. Određena količina onečišćenja u ljekovitoj tvari dopuštena je prvenstveno da se izbjegne njeno pretjerano čišćenje, ali se svodi na najmanju moguću mjeru kako bi farmaceutski zahtjevi bili zadovoljeni te kako bi se osigurala sigurnost primjene lijeka (Nigović, 2015c).

Febuksostat je noviji lijek indiciran za kronično liječenje gihta i još nema svoju monografiju u Europskoj farmakopeji.

Cilj je ovog diplomskog rada predloženom HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> metodom provesti strukturnu karakterizaciju febuksostata i njegovih triju onečišćenja – febuksostat amida, febuksostat DEE-a i etil-febuksostata, a nakon toga ispitati prisutnost navedenih onečišćenja u uzorku febuksostata u gotovom ljekovitom obliku. Masena spektrometrija spregnuta s tekućinskom kromatografijom idealna je za analizu i strukturnu karakterizaciju febuksostata i njegovih onečišćenja. Na temelju dobivenih fragmenata mogu se opisati mehanizmi fragmentacije, a potom i pretpostaviti kemijske strukture potencijalnih onečišćenja.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije, standardne supstancije i plinovi

##### Kemikalije

- Acetonitril za tekućinsku kromatografiju (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- *Adenuric*<sup>®</sup> 80 mg filmom obložene tablete (Berlin-Chemie Menarini Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Dimetilsulfoksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina 98-100%, p.a. čistoće (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Pročišćena voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, SAD)

##### Standardne supstancije:

- Febuksostat (2-(3-cijano-4-izobutoksifenil)-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina) (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario Canada)
- Etil-febuksostat (etil 2-[3-cijano-4-izobutoksifenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina) (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario Canada)
- Febuksostat amid (2-[3-karbamoil-4-izobutoksifenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina) (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario Canada)
- Febuksostat DEE (2-[3-(etoksikarbonil)-4-izobutoksifenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina) (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario Canada)

##### Plinovi

- Dušik > 99,999% vol (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)
- Helij > 99,999% vol (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

#### 3.1.2. Radni instrumenti

- LC/MSD Trap VL maseni detektor s elektrosprej ionizatorom i analizatorom stupicom iona (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

- Tekućinski kromatograf (Agilent 1100 chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

### **3.1.3. Pribor**

- Analitička vaga AG245 na četiri decimale (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, SAD)
- Bočice za uzorkovanje 1,5 mL sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, SAD)
- Celulozni nitratni membranski filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji veličine pora 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Centrifugirka (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Eppendorf epruveta 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)
- Luer slip šprica (Beckton, Dickinson and Company, Španjolska)
- Filter za špricu (Chromafil Xtra 0,2 µm, 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju XBridge C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 µm (Waters, Milford, SAD)
- Mikropipeta promjenjivog volumena (Hirschmann, Eberstadt, Njemačka)
- Stakleni sustav za filtriranje mobilnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

### **3.1.4. Programski paketi**

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema mobilne faze**

Mobilna faza pripremljena je miješanjem acetonitrila čistoće za tekućinsku kromatografiju, vode pročišćene WaterPro sustavom i mravlje kiseline tako da joj sastav bude 75:25:0,1% redom navedenih komponenata. Mobilna je faza profiltrirana pomoću sustava za filtriranje mobilnih faza i celuloznog nitratnog membranskog filtera veličine pora 0,45 µm.

### **3.2.2. Priprema standardnih otopina**

Matične standardne otopine febeksostata, etil-febeksostata i febeksostat DEE-a pripremljene su otapanjem čistih supstancija u odmjernoj tikvici od 5,0 mL u acetonitrilu tako da koncentracija otopina standarda iznosi 1 mg/mL. Otopina standarda febeksostat amida pripremljena je otapanjem čiste supstancije u odmjernoj tikvici od 5,0 mL u dimetilsulfoksidu (DMSO), također tako da koncentracija otopine iznosi 1 mg/mL. U svrhu potpunog otapanja praškastih supstancija u acetonitrilu, standardne su otopine stavljene na ultrazvučnu kupelj tijekom 5 minuta. Standardne otopine febeksostata, etil-febeksostata i febeksostat DEE-a čuvane su u hladnjaku na temperaturi +4°C dok je standardna otopina febeksostat amida čuvana na sobnoj temperaturi.

Radne standardne otopine korištene u HPLC analizama pripremane su svakodnevno pipetiranjem odgovarajućih volumena matičnih standardnih otopina te razrjeđivanjem do željene koncentracije (50 µg/mL za svaki standard) mobilnom fazom.

### **3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka iz gotovog ljekovitog oblika**

Uzorak otopine febeksostata iz tablete pripremljen je tako da koncentracija otopine iznosi 1 mg/mL. Izvagana je odgovarajuća masa praha prethodno usitnjene tablete te je potom prebačena u odmjernu tikvicu od 10,0 mL. Tikvica je do otprilike 1 cm ispod oznake dopunjena acetonitrilom i stavljena na ultrazvučnu kupelj uz spontano zagrijavanje tijekom 30 minuta. Nakon toga dodan je acetonitril do oznake, a dobiveni je supernatant raspodijeljen u Eppendorf epruvete te centrifugiran. Otopina iznad taloga zatim je

profiltrirana kroz Chromafil Xtra filter veličine pora 0,2 µm u novu tikvicu i kasnije je korištena u pripremi uzoraka (koncentracija 1 mg/mL) za kromatografske analize. Uzorak otopine feboksostata iz tablete čuvan je u hladnjaku na temperaturi +4°C.

### 3.2.4. Uvjeti analize uzoraka

Odjeljivanje sastojaka u radnim standardnim otopinama i analiza ispitivanog uzorka provedeni su na Agilent 1100 kromatografskom sustavu, na koloni obrnutih faza XBridge C18 (Waters, dimenzije 4,6 mm x 150 mm, veličina čestica 3,5 µm). Tijekom analize nije se mijenjao sastav mobilne faze. Njen je protok iznosio 0,1 mL/min, tlak je namješten na 100 bar, a temperatura kolone na 30°C. Kromatogrami su snimani na trima valnim duljinama: 237 nm, 254 nm i 320 nm detektorom niza dioda (engl. *Diode array detector*, DAD).

Masena analiza provedena je na instrumentu Agilent 6300 Series Ion Trap. Za ionizaciju analita korištena je elektrosprej ionizacija (ESI) dok je kao analizator korišten analizator stupica iona (engl. *Ion-trap*). Napon na kapilari iznosio je 3,5 kV. Za raspršivanje uzorka korišten je plin dušik, a tlak je raspršivanja iznosio 10 psi. Dušik je također poslužio i za sušenje mobilne faze pri čemu mu je protok namješten na 6 L/min, a temperatura na 325°C. Maseni spektri snimani su u rasponu  $m/z$  100 – 500.

Svakodnevno, prije prve analize HPLC sustav ispiran je mobilnom fazom, a na kraju radnog dana acetonitrilom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Identifikacija analita i odabir valne duljine detekcije

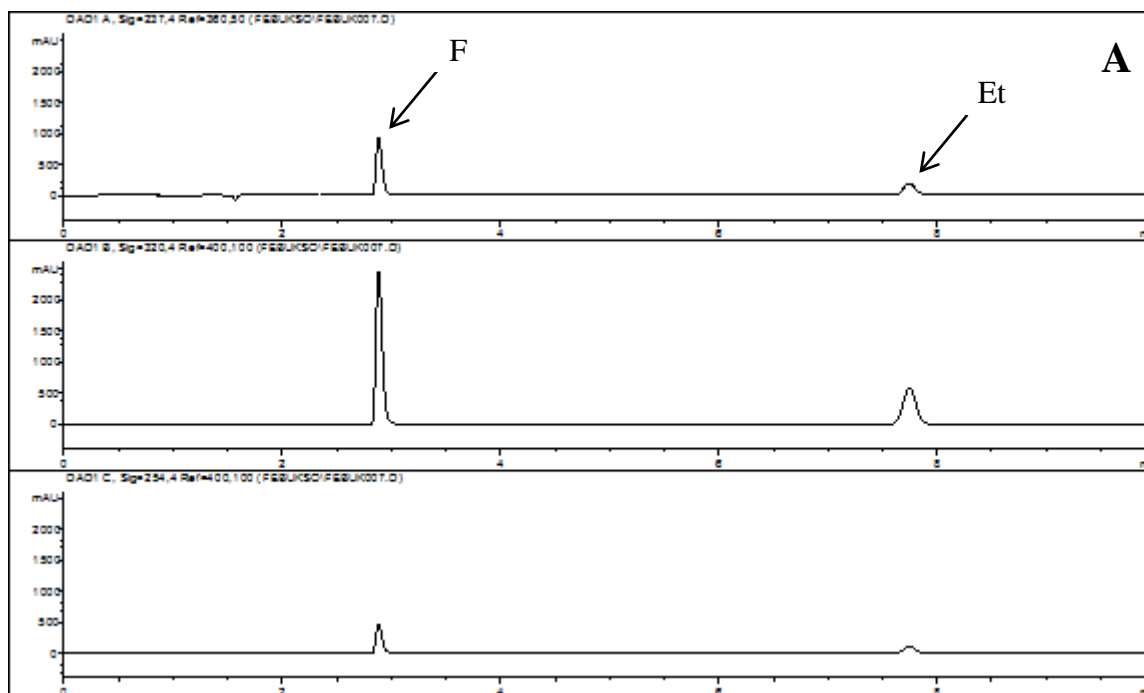
Na početku rada snimljeni su kromatogrami febuksostata i njegovih onečišćenja na različitim valnim duljinama detekcije, i to s trima glavnim ciljevima:

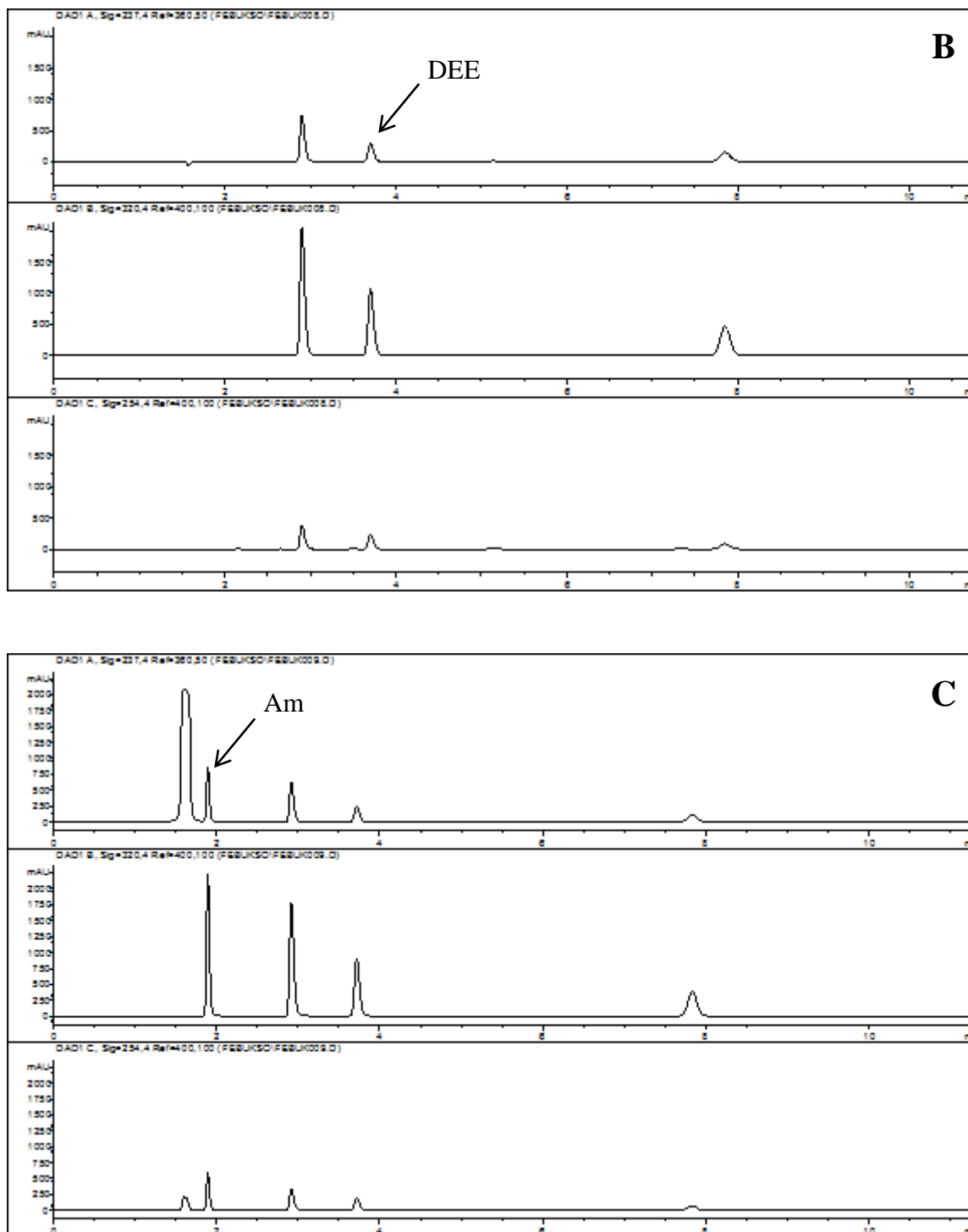
1. kromatografski opisati pikove febuksostata i onečišćenja s obzirom na njihovo vrijeme zadržavanja ( $t_r$ ) kako bi se odredilo kada i kojim redom analiti izlaze
2. utvrditi jesu li svi kromatografski pikovi odvojeni u baznoj liniji
3. odabrati odgovarajuću valnu duljinu detekcije analita

U tu svrhu pripremljene su tri smjese radnih otopina standarda pri čemu je koncentracija svakog analita u svakoj smjesi iznosila 50 µg/mL:

- a) febuksostat i etil-febuksostat
- b) febuksostat, etil-febuksostat i febuksostat DEE
- c) febuksostat, etil-febuksostat, febuksostat DEE i febuksostat amid

Smjese su injektirane u HPLC sustav, a za detekciju analita DAD detektorom odabrane su valne duljine od 237 nm, 254 nm i 320 nm. Dobiveni su kromatogrami prikazani na Slici 4.





**Slika 4.** HPLC-DAD kromatogrami smjese standarda: febuksostat i etil-febuksostat (A); febuksostat, etil-febuksostat i DEE (B); febuksostat, etil febuksostat, DEE i febuksostat amid (C)

*F* – febuksostat, *Et* – etil-febuksostat, *DEE* – febuksostat DEE, *Am* – febuksostat amid  
 Uvjeti analize: XBridge kolona C18, 4.6x150 mm, 3.5  $\mu$ m, temperatura kolone 30°C, mobilna faza: ACN:H<sub>2</sub>O:HCOOH=75:25:0.1%, brzina protoka 1 mL/min, valne duljine detekcije: 237 nm, 244 nm, 320 nm

Kao što se vidi iz priloženih kromatograma, analiti su razdvojeni u baznoj liniji što potvrđuje da je metoda prikladna za daljnje analize. Svaki kromatografski pik opisan je na temelju vremena zadržavanja analita,  $t_r$ . Dobivena su vremena zadržavanja navedena u Tablici 1.

**Tablica 1.** *Vremena zadržavanja analita*

<i>Analit</i>	<i>Vrijeme zadržavanja (<math>t_r</math>) / min</i>
febuksostat amid	1,891
febuksostat	2,914
febuksostat DEE	3,719
etil-febuksostat	7,838

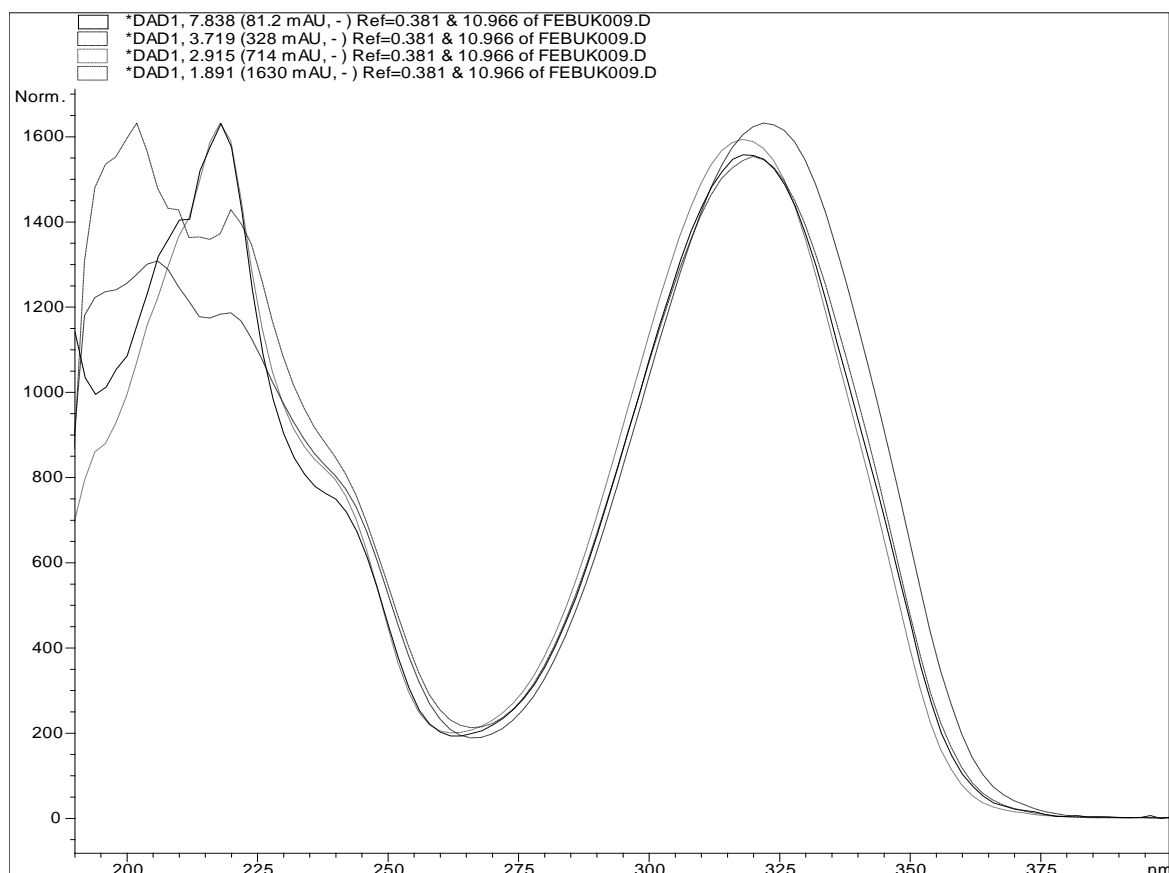
*Uvjeti analize: XBridge kolona C18, 4.6x150 mm, 3.5  $\mu$ m, temperatura kolone 30°C, mobilna faza: ACN:H<sub>2</sub>O:HCOOH=75:25:0.1%, brzina protoka 1 mL/min, valne duljine detekcije: 237 nm, 244 nm, 320 nm*

Nakon toga provjerena je čistoća dobivenih kromatografskih pikova. Budući da DAD detektor ima mogućnost snimati apsorbanciju analita po svim valnim duljinama, osim kromatograma snimljenog na željenoj valnoj duljini, dobiva se također uvid u cijeli UV-Vis spektar analita. Upravo se ta glavna prednost DAD detektora obilno koristi u provjeri čistoće kromatografskih pikova. Princip je takav da se u trima točkama pika (na početku, vrhu i kraju pika) pogleda i usporedi UV-Vis spektar. Ukoliko pik odgovara samo jednom analitu (čist pik), UV-Vis spektri u svakoj se odabranoj točki poklapaju, odnosno imaju isti oblik. Nasuprot tomu, ako je došlo do koelucije dvaju ili više analita, DAD detektor zbraja apsorbancije svih entiteta u danom trenutku te se, posljedično, vide promjene u UV-Vis spektru. Jednostavnije rečeno, UV-Vis spektri u odabranim se točkama tada ne poklapaju.

Za svaki analit odabrane su tri točke na njegovom kromatografskom piku i uspoređeni su dobiveni UV-Vis spektri. U sva su se četiri slučaja UV-Vis spektri poklapali iz čega je zaključeno da je svaki pik čist, odnosno da odgovara samo jednom analitu. Također, međusobnom usporedbom UV-Vis spektara četiriju analita uočeno je da su im spektri prilično



podudarni. Međutim, ta spoznaja i ne iznenađuje jer su strukture febuksostata i njegovih onečišćenja vrlo slične. Na Slici 5 prikazani su UV-Vis spektri četiriju analita.

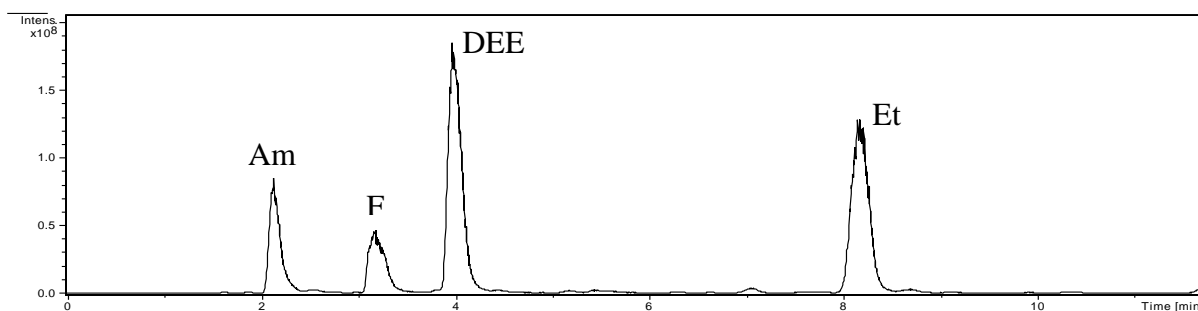


**Slika 5.** UV-Vis spektri svih četiriju analita: febuksostata, etil-febuksostata, febuksostat DEE-a i febuksostat amida

UV-Vis spektar analita može pomoći pri odabiru valne duljine njegove detekcije. Priložena Slika 5 jasno pokazuje da febuksostat i njegova onečišćenja imaju apsorpcijski maksimum na valnoj duljini oko 320 nm što ju definira kao prvi izbor za valnu duljinu detekcije. Kromatogrami su, kao što je rečeno, snimljeni na  $\lambda_{\text{det}} = 237, 244$  i 320 nm. U skladu s očekivanjima, pokazalo se da su pri  $\lambda_{\text{det}} = 320$  nm kromatografski pikovi najvećeg intenziteta. Međutim, kako na toj valnoj duljini apsorbira vrlo malo poznatih tvari, postoji velika šansa da neko onečišćenje u tableti ostane nezapaženo, stoga su kao valne duljine detekcije analita odabrane  $\lambda_{\text{det}} = 237$  nm i  $\lambda_{\text{det}} = 254$  nm.

## 4.2. Analiza masenih spektara i fragmentacijski putovi analita

Nakon odjeljivanja analita i potvrde da jedan pik odgovara jednom analitu, pristupljeno je analizi na masenom spektrometru. Četiri su odijeljena analita iz smjese standarda za početak puštena kroz maseni spektrometar kako bi se snimio kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total ion current chromatogram*, TIC) (Slika 6) i maseni spektar za svaki analit.

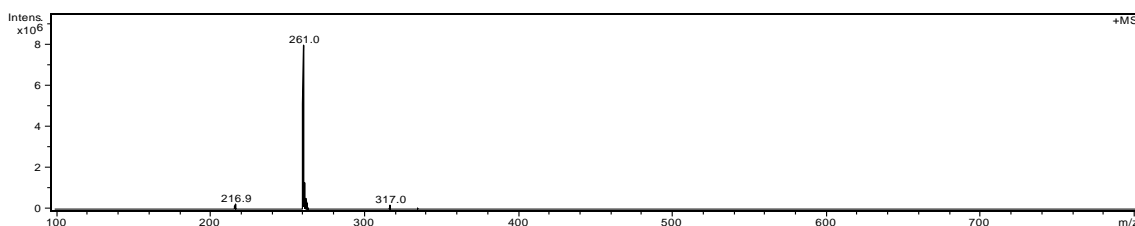


**Slika 6.** Kromatogram ukupne ionske struje (TIC) smjese standarda (50  $\mu\text{g/mL}$ )  
*Am* – febuksostat amid, *DEE* – febuksostat DEE, *Et* – etil-febuksostat, *F* - febuksostat

Na priloženom kromatogramu ukupne ionske struje vidljiv je pomak u vremenu zadržavanja ( $t_r$ ) za svaki analit u odnosu na kromatogram dobiven DAD detektorom. Razlog je tomu činjenica da DAD detektor snima analite na izlasku iz kromatografske kolone dok se TIC dobiva pomoću detektora u masenom spektrometru. Pomak u vrijednosti  $t_r$  pripisuje se, dakle, vremenu potrebnom da analit fizički prijeđe put od DAD detektora u HPLC-u do masenog detektora u MS-u.

### 4.2.1. Febuksostat

Ionizacijom febuksostata nastao je protonirani molekularni ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  317. Na istom se spektru mogu uočiti još dva fragmentna iona pri  $m/z$  217 i  $m/z$  261 (Slika 7).

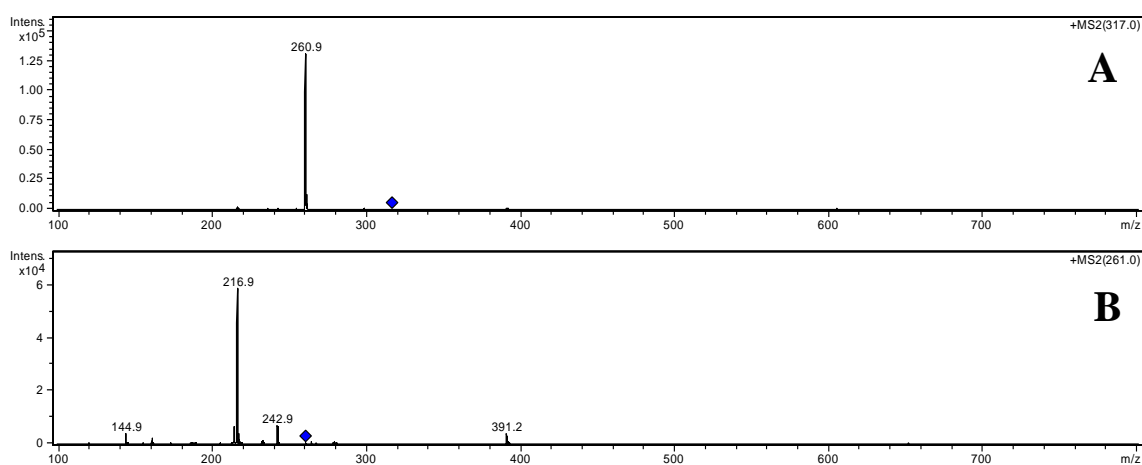


**Slika 7.** Maseni spektar febuksostata

Kod fragmentnog iona pri  $m/z$  261 uočen je gubitak mase od 56 Da ( $317 \rightarrow 261$ ) koji odgovara odcjepljenju izobutilne skupine iz postraničnog eterskog lanca na prstenu benzena pri čemu ondje ostaje hidroksilna skupina. Drugi fragmentni ion pri  $m/z$  217 nastaje, slično kao i prethodni fragment, odcjepljenjem izobutilne skupine iz eterskog lanca na benzenskom prstenu, ali i dodatnim gubitkom karboksilne skupine s C5 atoma u tiazolnom prstenu.

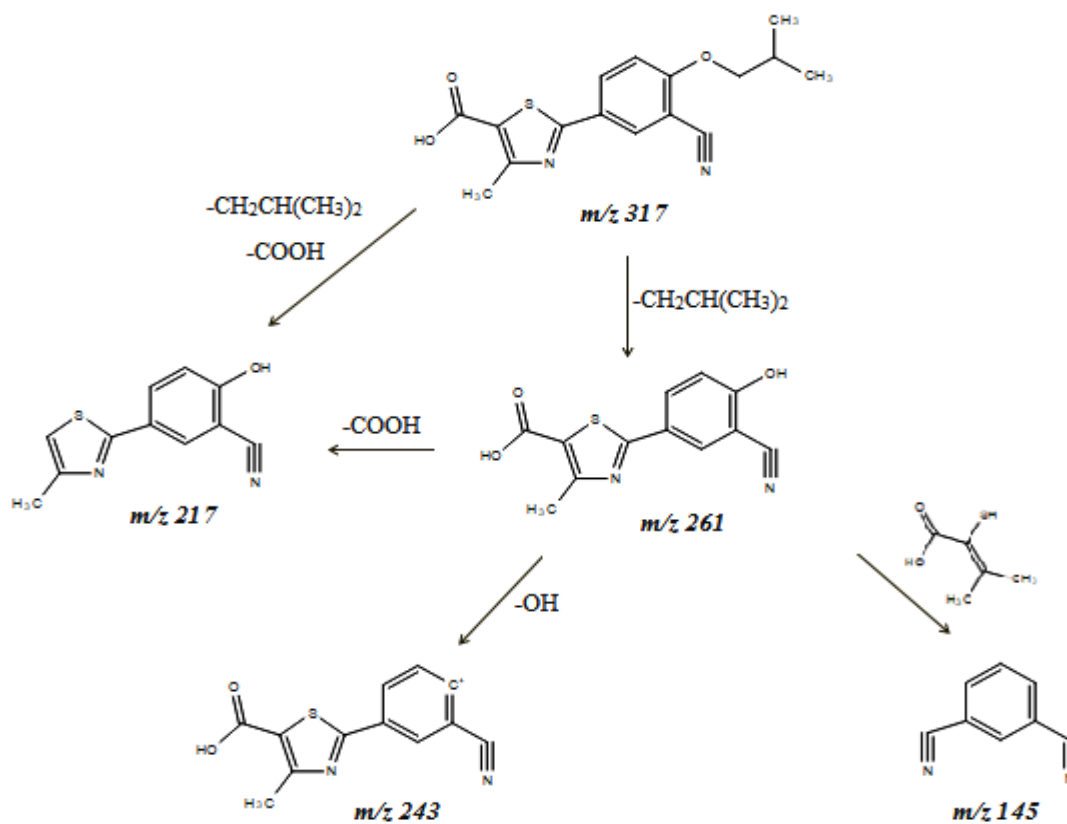
Kako u masenom spektru febuksostata najintenzivniji signal daje fragmentni ion pri  $m/z$  261, snimljen je njegov  $MS^2$  spektar. Fragmentacijom navedenog iona dobiven je glavni fragment pri  $m/z$  217, a vidljiva su i tri manja signala pri  $m/z$  145, 243 i 391. Fragmentni ion pri  $m/z$  217 pokazuje smanjenje mase od 44 Da ( $261 \rightarrow 217$ ) što upućuje na već spomenuti gubitak karboksilne skupine s tiazolnog prstena. Fragment pri  $m/z$  243 ima za 18 Da manju masu od početnog fragmenta pri  $m/z$  261. Takav gubitak mase inače upućuje na eliminaciju molekule vode iz spoja, no pretpostavlja se da ovdje dolazi do eliminacije hidroksilne skupine s benzenskog prstena što je u skladu s mehanizmom koji su opisali Kadivar i suradnici (2011). Budući da je kisik jako elektronegativan, prilikom odcjepljenja skupine povlači k sebi oba elektrona iz kemijske veze ostavljajući ugljik u benzenskom prstenu pozitivno nabijenim. Nastali je fragment ioniziran i dovoljno stabilan da se detektira na detektoru masenog spektrometra. Konačno, fragmentni ion pri  $m/z$  145 nastaje kompleksnim otvaranjem tiazolnog prstena, odnosno pucanjem kemijskih veza između S i C2 te N i C4, nakon čega slijedi eliminacija stvorenog fragmenta.

Također, snimljen je i  $MS^2$  spektar molekulskog iona febuksostata pri  $m/z$  317. Dobiven je jedan fragmentni ion pri  $m/z$  261, a mehanizam njegova nastanka već je objašnjen. Opisani maseni spektri prikazani su na Slici 8.



**Slika 8.** ESI- $MS^2$  spektar molekulskog iona  $m/z$  317 (A) i fragmentnog iona  $m/z$  261 (B)

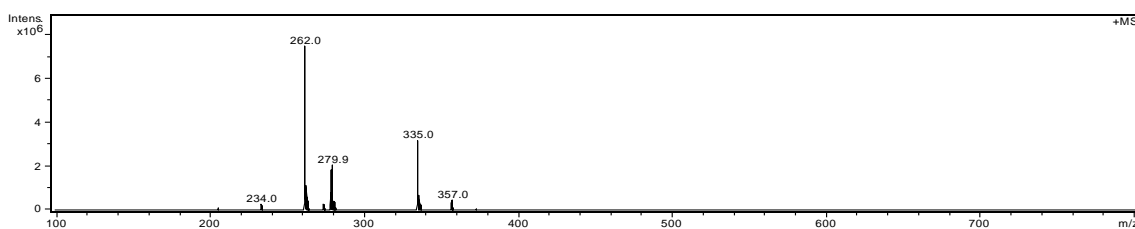
Na temelju dobivenih fragmentnih iona na Slici 9 prikazani su predloženi putovi fragmentacije febuksostata.



Slika 9. Predloženi putovi fragmentacije febuksostata

#### 4.2.2. Febuksostat amid

Febuksostat amid poznato je onečišćenje febuksostata koje najvjerojatnije nastaje kao nusprodukt hidrolizom  $-\text{CN}$  skupine već tijekom sinteze (Kadivar i sur., 2011). Ionizacijom febuksostat amida nastao je protonirani molekulski ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  335, a na istom je spektru zapažen i aduktor s ionom natrija  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  pri  $m/z$  357. Osim navedenih iona, maseni spektar pokazuje još tri fragmentna iona, i to pri  $m/z$  234, 262 i 280 (Slika 10).

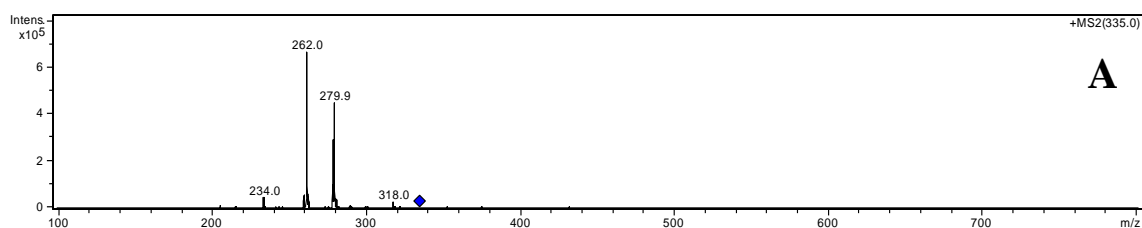


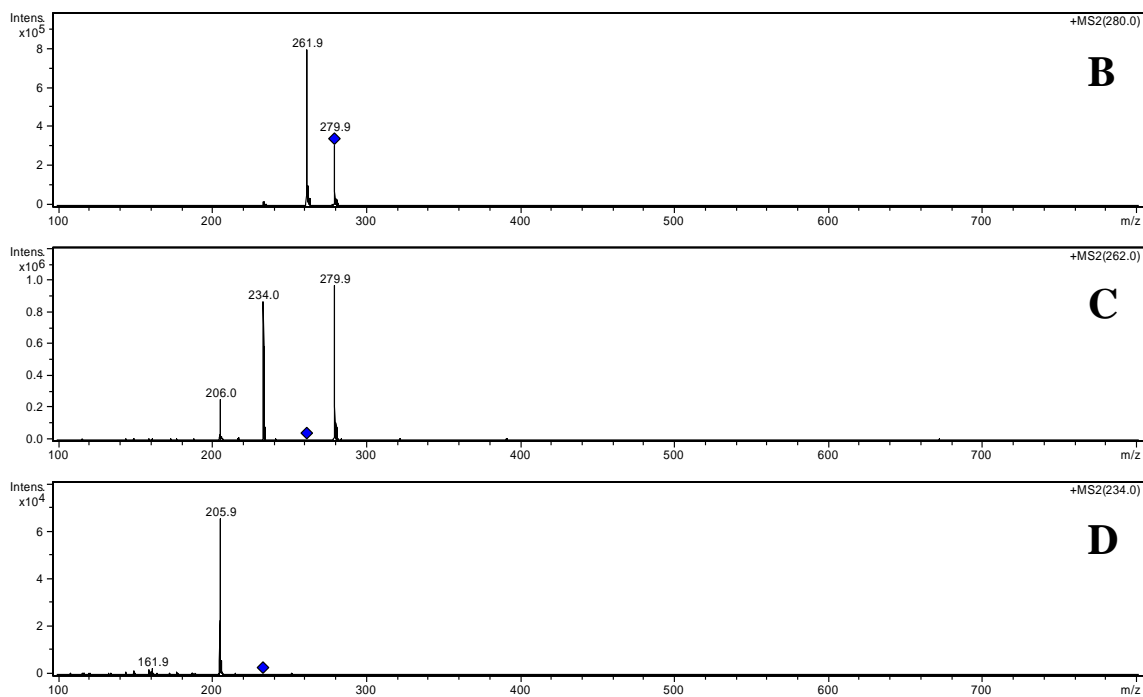
Slika 10. Maseni spektar febuksostat amida

Fragmentni ion pri  $m/z$  262 odgovara gubitku mase od 73 Da ( $335 \rightarrow 262$ ) što upućuje na dva fragmentacijska koraka: odcjepljenje izobutilne skupine iz eterskog postraničnog lanca na benzenskom prstenu i  $-NH_2$  skupine iz amidne skupine, također na benzenskom prstenu, pri čemu na karbonilnom ugljiku ostaje pozitivan naboj. S druge strane, fragmentni ion pri  $m/z$  234 ima masu manju za 101 Da ( $335 \rightarrow 234$ ). Njegov je nastanak sličan nastanku prethodnog fragmentnog iona te uključuje odlazak izobutilne skupine iz eterskog lanca, ali i odcjepljenje cijele amidne skupine uz nastanak karbokationa na ugljiku benzena.

Problem je nastao u identifikaciji fragmenta pri  $m/z$  280 jer njegov gubitak mase od 55 Da ( $335 \rightarrow 280$ ) isprva upućuje na odlazak samo izobutilne skupine iz eterskog lanca. Međutim, kako bi relativna molekulska masa tako nastalog fragmenta iznosila 278, on bi se u masenom spektru vidio pri  $m/z$  279, stoga je ova mogućnost odbačena. Snimljen je  $MS^2$  spektar fragmenta pri  $m/z$  280 te su uočeni signali pri  $m/z$  262 i 280. Poznata je struktura fragmenta pri  $m/z$  262 potvrdila da se promjene događaju u dijelu molekule s benzenom. Kadivar i suradnici naveli su ovaj fragment u svom radu. Analizom rada primijećen je amonijev acetat u sastavu mobilne faze pa postoji mogućnost povezanosti fragmenta i amonijeva iona. Kasnije, kad je snimljen  $MS^2$  spektar fragmentnog iona pri  $m/z$  262, jedan je od signala bio pri  $m/z$  280. Uočeno bi povećanje mase od 18 Da ( $262 \rightarrow 280$ ) moglo biti rezultat stvaranja aduktora s  $NH_4^+$  ionom. Iako ovdje amonijev acetat nije u mobilnoj fazi,  $NH_4^+$  ioni mogu biti onečišćenje acetonitrila (Keller i sur., 2008), zato mogućnost nastanka ovog aduktora ipak postoji, ali on će biti predmetom daljnjih istraživanja. Ostala dva uočena signala u  $MS^2(262)$  bila su pri  $m/z$  234 i 206. Fragment pri  $m/z$  234 već je definiran, a fragment pri  $m/z$  206 nastaje odlaskom hidroksilne skupine s benzenskog prstena, metilne skupine s C4 tiazolnog prstena te pucanjem veze između ugljika u benzenu i karbokationa.

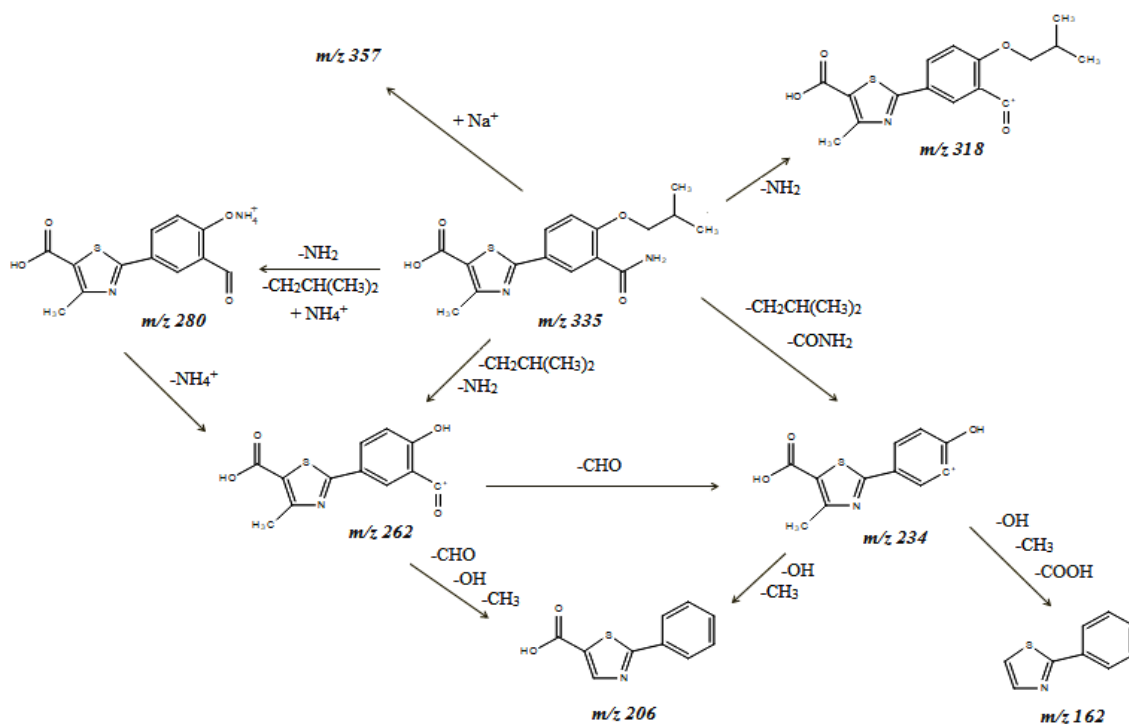
Snimljeni su i  $MS^2$  spektri fragmentnog iona pri  $m/z$  234 i molekuskog iona pri  $m/z$  335. Novost u  $MS^2(234)$  bio je fragment pri  $m/z$  162 koji nastaje odcjepljenjem hidroksilne skupine s benzenskog te karboksilne i metilne skupine s C5, odnosno C4 tiazolnog prstena. Također, novi je fragment uočeni u  $MS^2(335)$ , i to pri  $m/z$  318, međutim, poznato je da se formira odlaskom  $-NH_2$  skupine iz amida. Opisani maseni spektri prikazani su na Slici 11.





**Slika 11.** ESI-MS<sup>2</sup> spektar molekuskog iona  $m/z$  335 (A) i fragmentnih iona  $m/z$  280 (B),  $m/z$  262 (C),  $m/z$  234 (D)

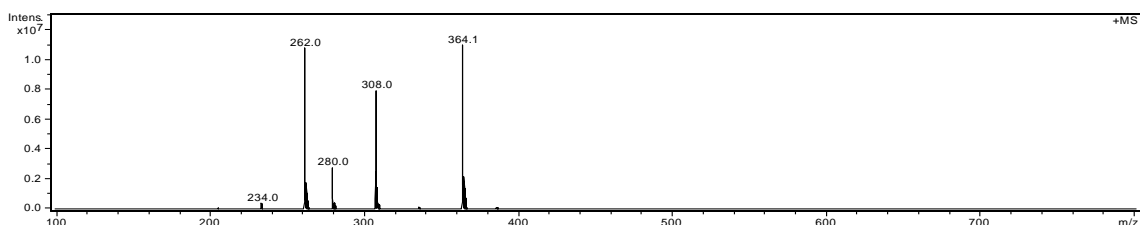
Na temelju provedene masene analize febeksostat amida predloženi su putovi njegove fragmentacije i stvaranja aduktora (Slika 12).



**Slika 12.** Prijedlog fragmentacijskih putova i stvaranja aduktora febeksostat amida

### 4.2.3. Febuksostat DEE

Ionizacijom febuksostat DEE-a dobiven je protonirani molekularni ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  364, a uočen je i niz manjih fragmentnih iona pri  $m/z$  308, 280, 262 i 234. Maseni spektar febuksostat DEE-a prikazan je na Slici 13.

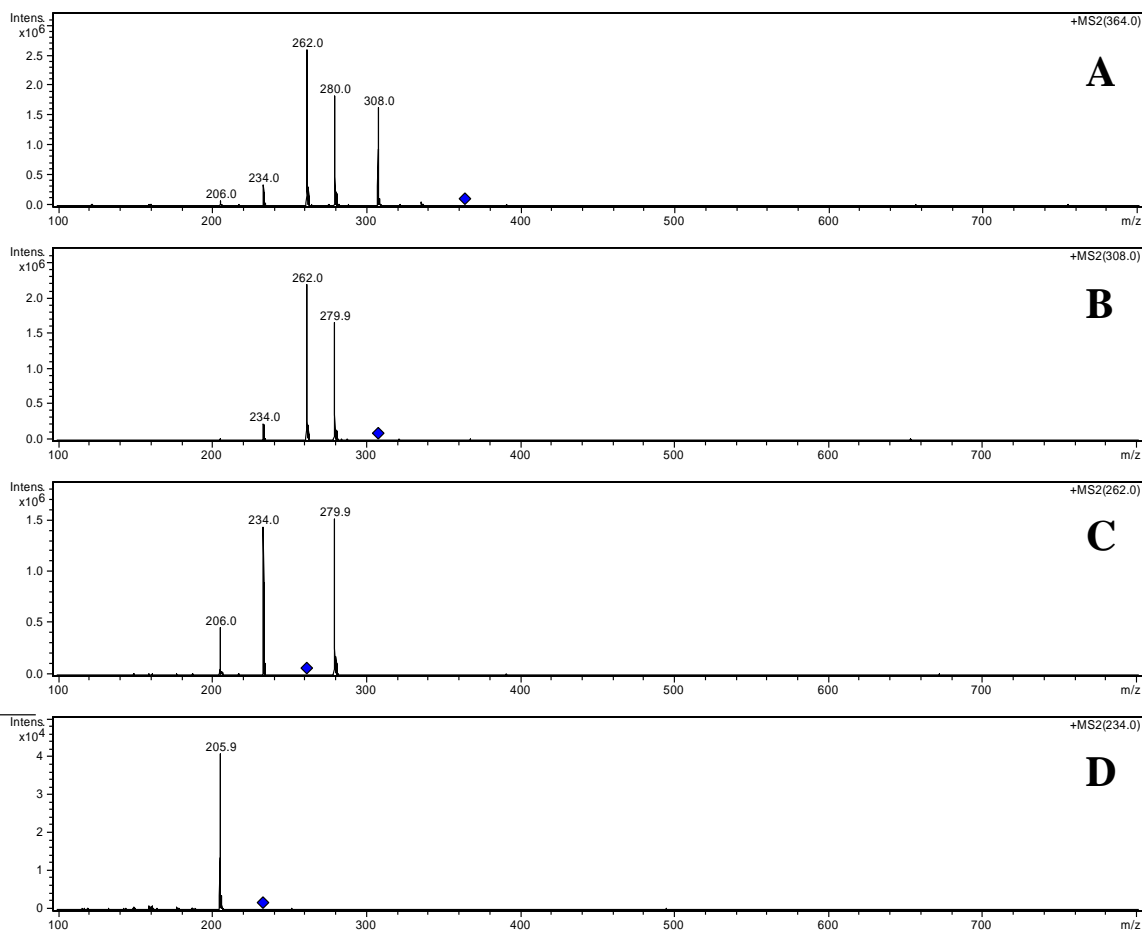


Slika 13. Maseni spektar febuksostat DEE-a

Fragmentni se ion pri  $m/z$  308 prvi put pojavljuje upravo u masenom spektru febuksostat DEE-a i pokazuje gubitak mase od 56 Da ( $364 \rightarrow 308$ ). Takvo smanjenje mase objašnjava se odcjepljenjem izobutilne skupine s postraničnog eterskog lanca na benzenskom prstenu. Ostatak navedenih fragmentnih iona strukturno je već opisan, a različit im je samo fragmentacijski put, odnosno odlazeće skupine. Tako fragmentni ion pri  $m/z$  280 nastaje odcjepljenjem izobutilne skupine iz eterskog lanca uz pretpostavljeni istovremeni dolazak amonijeva iona te odcjepljenjem  $-OCH_2CH_3$  skupine iz esterskog dijela molekule. Nastanak fragmentnog iona pri  $m/z$  262 tumači se kao i kod prethodnog fragmenta, samo što odlazak izobutilne skupine nije praćen dolaskom amonijeva iona. Pri nastajanju fragmentnog iona pri  $m/z$  234 za smanjenje mase od 100 Da ( $334 \rightarrow 234$ ) zaslužno je odcjepljenje izobutilne skupine te pucanje veze između ugljika u benzenu i karbonilnog ugljika unutar esterskog lanca uz nastajanje karbokationa.

U  $MS^2$  spektru molekularnog iona pri  $m/z$  364 vidljivi su poznati fragmentni ioni pri  $m/z$  308, 280, 262 i 234. Ipak, uočen je i jedan novi fragmentni ion pri  $m/z$  206. Njegovo smanjenje mase od 158 Da ( $364 \rightarrow 206$ ) opisano je odcjepljenjem eterskog i esterskog lanca s benzena te metilne skupine s C4 tiazolnog prstena.

Snimljeni su, također, i  $MS^2$  spektri fragmentnih iona pri  $m/z$  308,  $m/z$  234 i  $m/z$  262, međutim nije otkriven nijedan nepoznati ionski fragment. Tako  $MS^2$  spektar fragmenta pri  $m/z$  308 pokazuje tri fragmentna iona – pri  $m/z$  234, 262 i 280;  $MS^2$  spektar fragmenta pri  $m/z$  234 pokazuje samo jedan signal, i to pri  $m/z$  206, dok  $MS^2$  spektar fragmenta pri  $m/z$  262 pokazuje signale pri  $m/z$  206, 234 i 280. Opisani maseni spektri prikazani su na Slici 14.

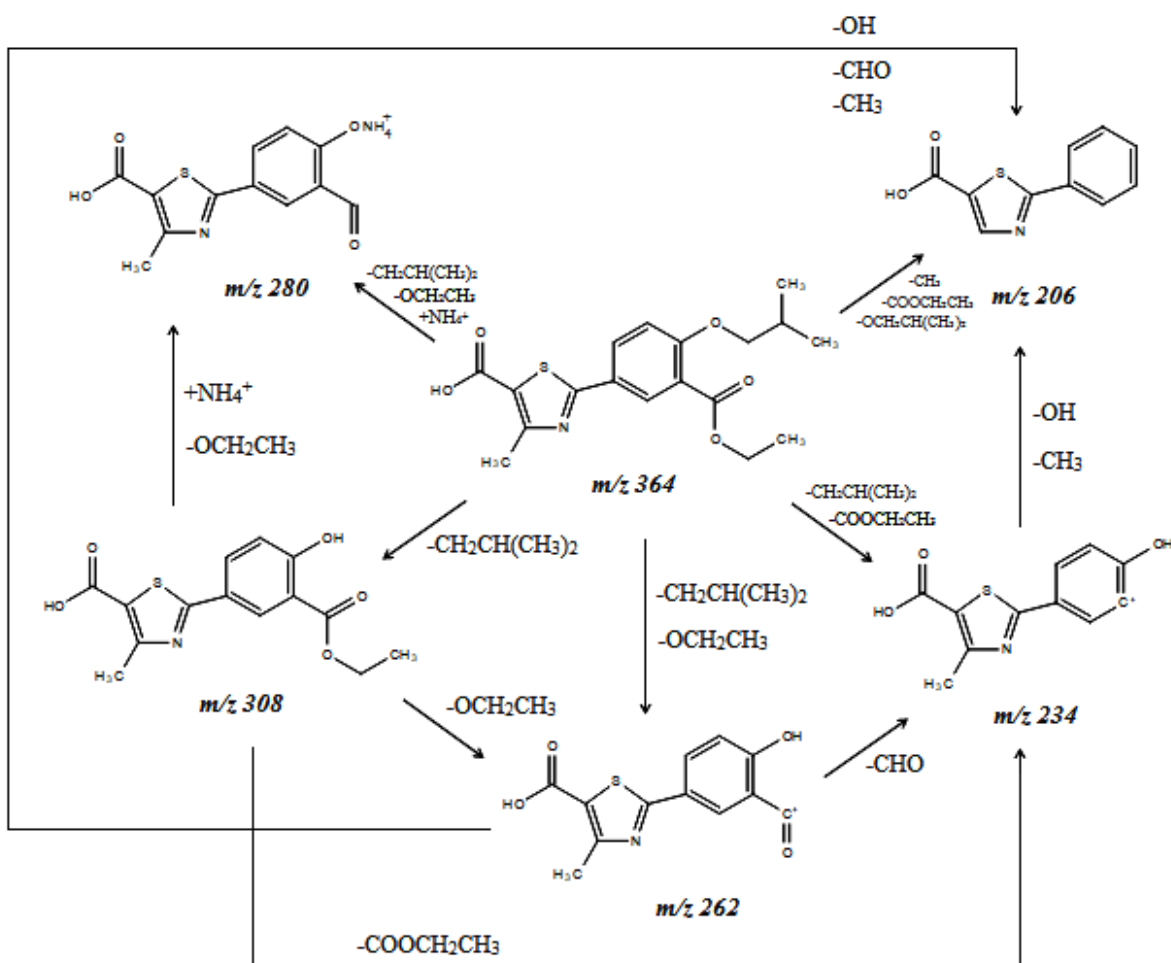


**Slika 14.** ESI-MS<sup>2</sup> spektar molekuskog iona  $m/z$  364 (A) i fragmentnih iona  $m/z$  308 (B),  $m/z$  262 (C),  $m/z$  234 (D)

Zanimljivo je uočiti kako su MS<sup>2</sup> spektri fragmentnih iona pri  $m/z$  262 i  $m/z$  234 snimljeni tijekom masene analize i febuksostat amida i febuksostat DEE-a. Dobiveni su spektri podudarni – fragmentni ion pri  $m/z$  262 daje iste fragmente kod obaju analita, i to s jednakim poretком signala prema intenzitetu ( $m/z$  280 je najintenzivniji, slijedi ga  $m/z$  234, a  $m/z$  206 je najslabijeg intenziteta). Kod fragmentnog iona pri  $m/z$  234 također se uočava podudarnost dobivenih spektara. Opisana opažanja upućuju na činjenicu da tijekom fragmentacije analita (u početku strukturno različitih) u nekom trenutku, najčešće nakon odcjepljenja različitih postraničnih skupina, dolazi do nastanka istih kemijskih entiteta. Na tim nižim razinama postoje obrasci, tj. putovi prema kojima se odvija fragmentacija, stoga bi se pri snimanju MS<sup>3</sup> spektara mogli očekivati identični fragmentni ioni neovisno o tome koji je analit u startu odabran za analizu.

Na temelju masene analize febuksostat DEE-a dana je pretpostavka njegovih fragmentacijskih putova (Slika 15).

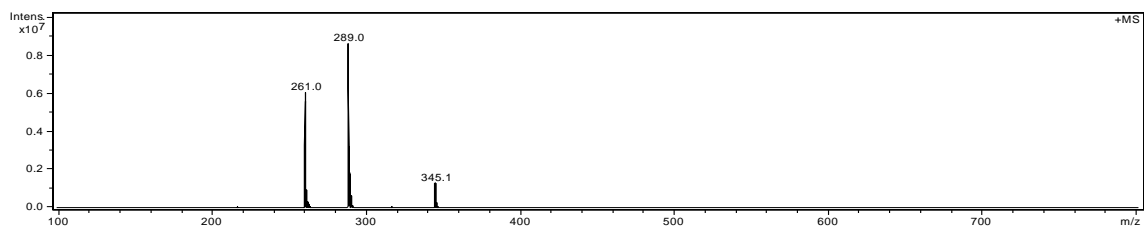




Slika 15. Pretpostavka fragmentacijskih putova febuksostat DEE-a

#### 4.2.4. Etil-febuksostat

Snimljen je maseni spektar etil-febuksostata, najmanje polarnog onečišćenja febuksostata (Slika 16). Njegovom je ionizacijom nastao protonirani molekularni ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  345 te dva fragmentna iona pri  $m/z$  289 i 261, uz napomenu da je fragment pri  $m/z$  261 već uočen u masenom spektru febuksostata. Ionski fragment pri  $m/z$  289 odgovara gubitku mase od 56 Da ( $345 \rightarrow 289$ ) što je posljedica odcjepljenja izobutilne skupine iz postraničnog eterskog lanca na benzenskom prstenu. Kod fragmenta pri  $m/z$  261 uočeno je značajnije smanjenje mase, i to za 84 Da ( $345 \rightarrow 261$ ). Njegovo formiranje zapravo se nastavlja na formiranje prethodnog fragmenta tako da, osim gubitka izobutilne skupine, dolazi i do odcjepljenja etilne skupine iz esterskog lanca na položaju C5 tiazolnog prstena.

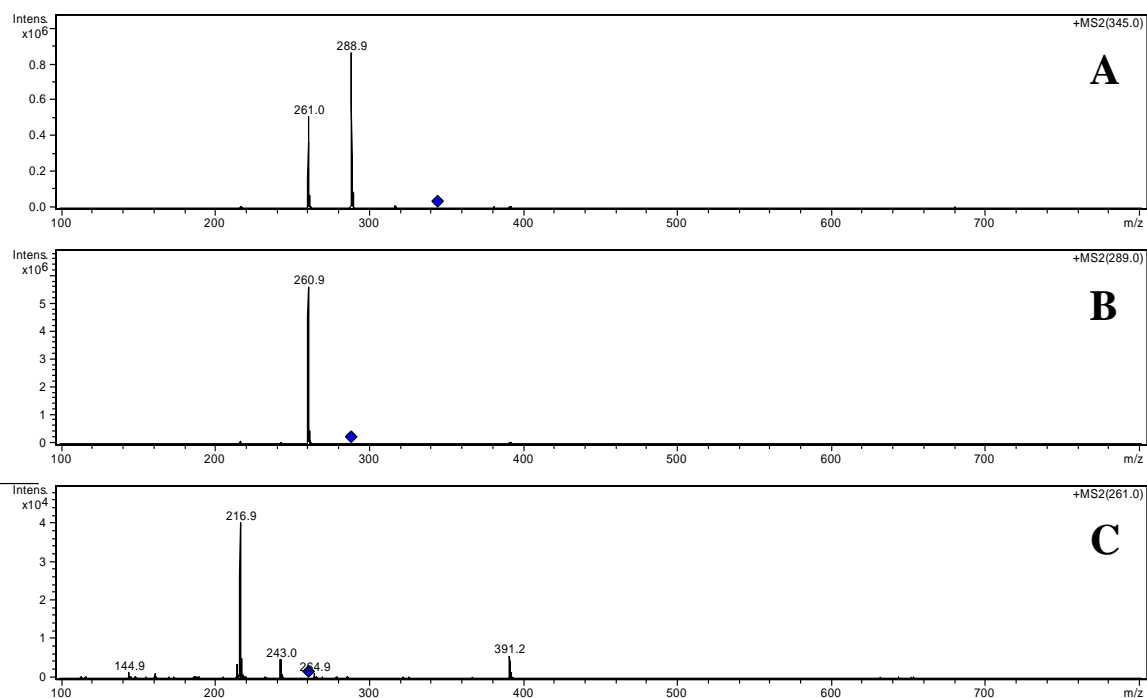


**Slika 16.** Maseni spektar etil-febuxostata

Također, snimljen je i MS<sup>2</sup> spektar molekuskog iona pri  $m/z$  345 na kojem su uočeni fragmentni ioni pri  $m/z$  261 i 289, isti oni prisutni u masenom spektru etil-febuxostata.

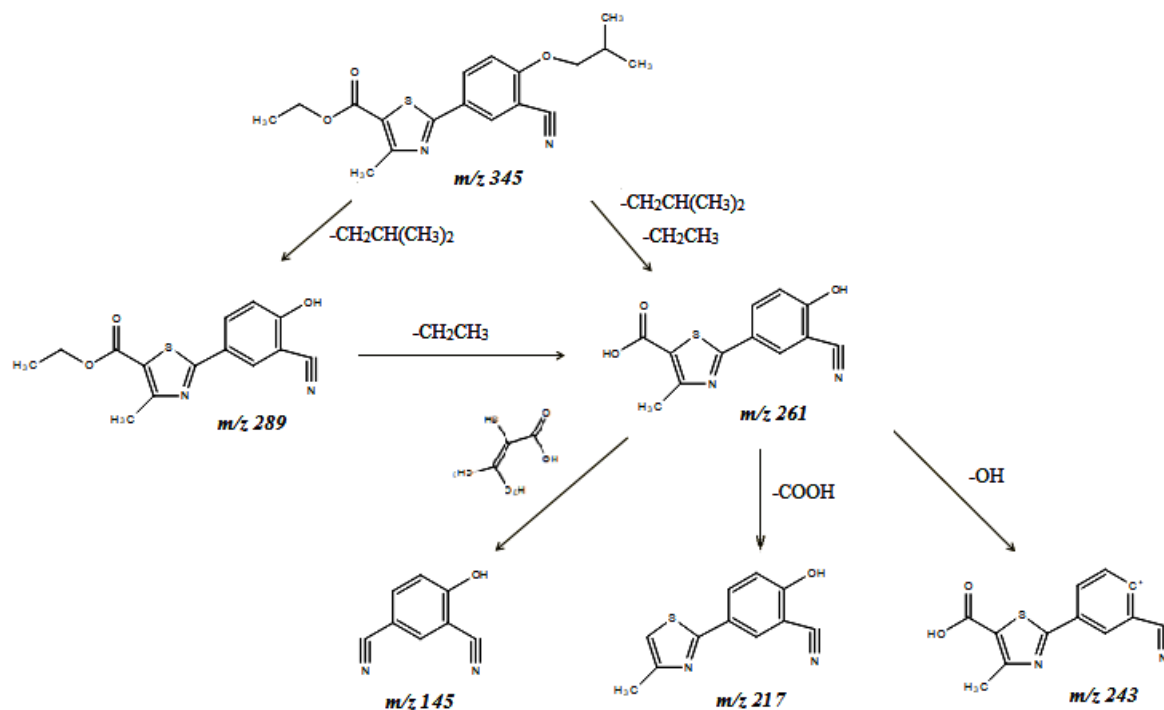
Budući da je ionski fragment pri  $m/z$  289 velikog intenziteta u masenom spektru analita, snimljen je njegov MS<sup>2</sup> spektar. Detektiran je samo jedan, otprije poznat, ionski fragment pri  $m/z$  261.

Nadalje, snimljen je i MS<sup>2</sup> spektar fragmentnog iona pri  $m/z$  261. Spomenuti je fragmentni ion već uočen u masenom spektru febuxostata, stoga je njegov MS<sup>2</sup> spektar poznat. Posljedično, očekuje se ponovna detekcija ranije detektiranih fragmenata. Pokazalo se da su ta dva spektra uistinu podudarna, odnosno opet su uočeni isti signali, pri  $m/z$  391, 243, 217 i 145. Navedeni su fragmenti strukturno poznati, a na Slici 17 prikazani su opisani maseni spektri.



**Slika 17.** ESI-MS<sup>2</sup> spektar molekuskog iona  $m/z$  345 (A) i fragmentnih iona  $m/z$  289 (B),  $m/z$  261 (C)

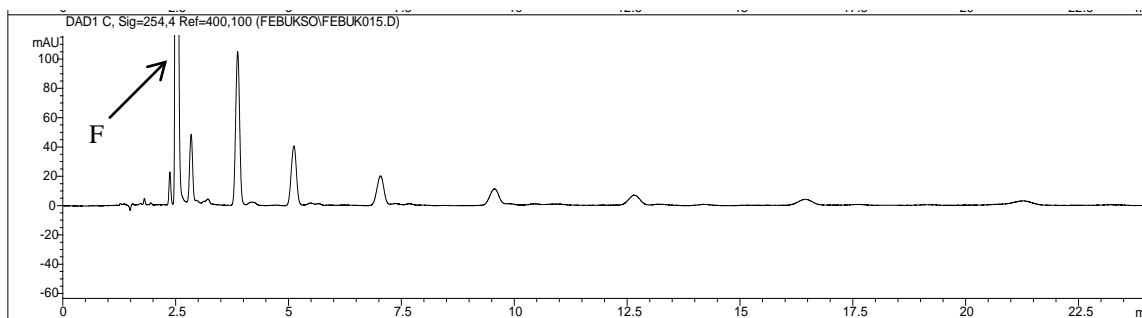
Prijedlog fragmentacijskih putova etil-febuksostata donesen je na temelju provedene masene analize tog analita (Slika 18).



Slika 18. Prijedlog fragmentacijskih putova etil-febuksostata

### 4.3. Analiza onečišćenja u tableti febuksostata

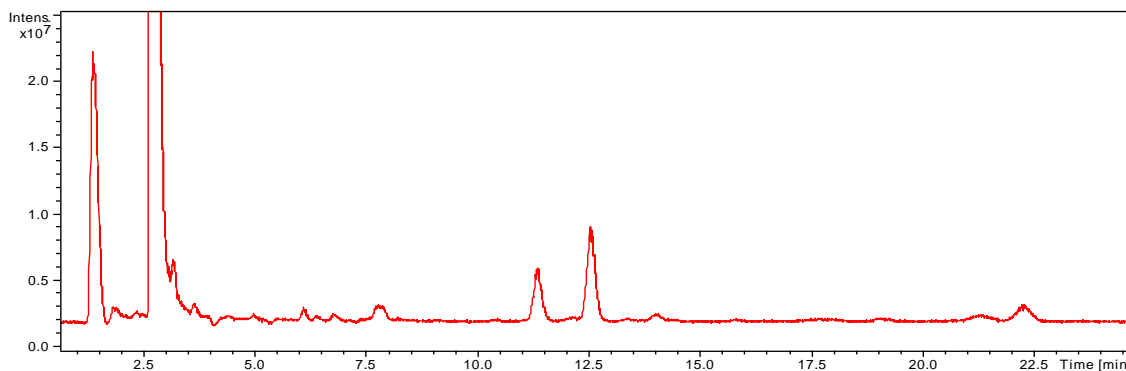
Ispitivani uzorak febuksostata koncentracije 1 mg/mL injektiran je u HPLC sustav kako bi se snimio njegov kromatogram. Budući da se radi o analizi gotovog ljekovitog oblika s jednom aktivnom tvari, očekuje se jedan glavni kromatografski pik velikog intenziteta koji odgovara febuksostatu te veći broj vrlo malih pikova koji odgovaraju onečišćenjima. Kromatogram ispitivanog uzorka ljekovitog oblika snimljen je na trima valnim duljinama (237, 254 i 320 nm), međutim, za kasniju interpretaciju odabran je onaj s valnom duljinom detekcije 254 nm jer se na njemu onečišćenja najbolje vide. Primjerice, na kromatogramu s  $\lambda_{\text{det}} = 320$  nm nije uočen niti jedan manji pik koji bi odgovarao onečišćenju febuksostata. S druge strane, na kromatogramu s  $\lambda_{\text{det}} = 237$  nm onečišćenja su vidljiva, ali su nešto slabijeg intenziteta nego kod  $\lambda_{\text{det}} = 254$  nm. Na Slici 19 prikazan je kromatogram ispitivanog uzorka.



**Slika 19.** HPLC-DAD kromatogram uzorka febeksostata (F) iz tablete Adenuric® (1 mg/mL)  
 Uvjeti analize: XBridge kolona C18, 4.6x150 mm, 3.5  $\mu$ m, temperatura kolone 30°C,  
 mobilna faza: ACN:H<sub>2</sub>O:HCOOH=75:25:0.1%, brzina protoka 1 mL/min, valna duljina  
 detekcije: 254 nm

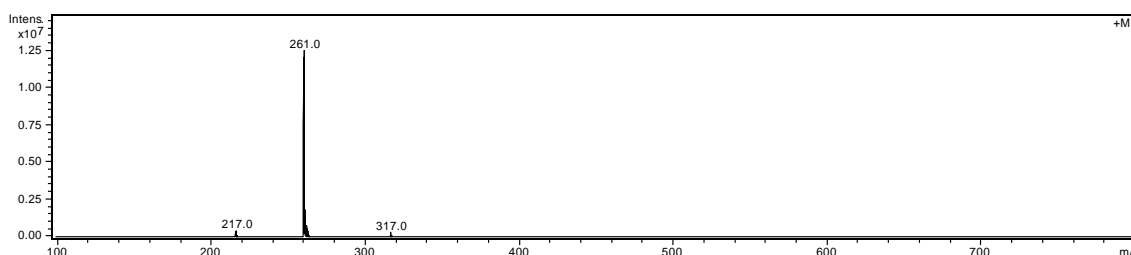
Na Slici 19 važno je uočiti vrijeme zadržavanja,  $t_r$ , febeksostata koje iznosi 2,512 min. Ako se ovo vrijeme zadržavanja usporedi s vremenom zadržavanja prethodno snimljenog standarda febeksostata ( $t_r = 2,914$  min), vidi se neslaganje između rezultata. Ono proizlazi iz činjenice da su se tijekom rada pojavile nepravilnosti u radu degazera mobilne faze čija je uloga uklanjanje zraka iz nje. Ukoliko zrak ostane u mobilnoj fazi, moguće je oslobađanje mjehurića zraka tijekom analize što u konačnici dovodi do nepravilnog protoka i varijacija u vremenu zadržavanja. Na snimljenom kromatogramu ispitivanog uzorka febeksostata iz gotovog ljekovitog oblika nedvojbeno je da glavni pik pripada upravo febeksostatu, stoga njegova  $t_r$  vrijednost igra sporednu ulogu. Slično, identifikacija ciljanih onečišćenja tek je orijentacijski provedena prema njihovim vremenima zadržavanja. Konačna potvrda identiteta temeljila se na podudarnosti masenih spektara onečišćenja iz uzorka i standarda onečišćenja. Zbog navedenog, opisani problem nije utjecao na ishode rada.

Kako bi se provela masena analiza uzorka febeksostata iz gotovog ljekovitog oblika, snimljen je i njegov TIC kromatogram (Slika 20).



**Slika 20.** TIC kromatogram ispitivanog uzorka iz gotovog ljekovitog oblika (1 mg/mL)

Na priloženom kromatogramu ukupne ionske struje uočeno je više pikova. Pik najvećeg intenziteta identificiran je kao aktivna tvar febuksostat, i to usporedbom masenog spektra pika (Slika 21) s masenim spektrom standarda febuksostata (Slika 7). Utvrđeno je da su u oba spektra detektirani signali pri istim  $m/z$  vrijednostima (317, 261, 217) što upućuje na istu tvar. Ostali pikovi odgovaraju onečišćenjima. Da bi se utvrdila interesna onečišćenja (etil-febuksostat, febuksostat amid i febuksostat DEE) u ispitivanom uzorku, promatran je uglavnom lijevi dio kromatograma do  $t_r \approx 10$  min jer se njihov dolazak do detektora u masenom spektrometru očekuje unutar tog vremena. Odmah je vidljivo nekoliko suspektnih pikova vrlo slabog intenziteta u navedenom području što upućuje na potencijalnu prisutnost interesnih onečišćenja, ali u vrlo malim količinama. Pozornost privlače kromatografski pikovi nešto većeg intenziteta detektirani nakon 10. minute. Vjerojatno je riječ o prilično nepolarnim onečišćenjima koje bi trebalo dodatno analizirati, tj. strukturno identificirati.



**Slika 21.** Maseni spektar pika najvećeg intenziteta identificiranog kao febuksostat

Zbog spomenutog problema s degazerom mobilne faze, prethodno očitana vremena zadržavanja pojedinih onečišćenja nisu bila pouzdana, stoga je snimljen novi TIC kromatogram smjese standarda febuksostata i onečišćenja, a novoočitana vremena zadržavanja analita iz TIC kromatograma prikazana su u Tablici 2.

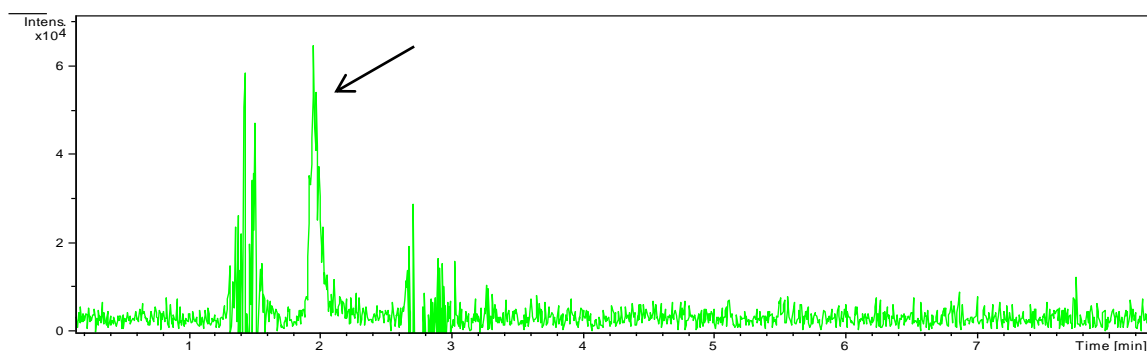
**Tablica 2.** Novoočitana vremena zadržavanja pojedinih analita

<i>Analit</i>	<i>Vrijeme zadržavanja (<math>t_r</math>) / min</i>
febuksostat amid	2,0
febuksostat	2,7
febuksostat DEE	3,4
etil-febuksostat	6,4

Detekciji interesnih onečišćenja u ispitivanom uzorku febeksostata iz gotovog ljekovitog oblika pristupljeno je koristeći temeljnu prednost LC-MS vezanog sustava – analizom kromatograma izoliranih iona (EIC) dobivenih iz kromatograma ukupne ionske struje. Naime, iz snimljenog TIC kromatograma ispitivanog uzorka dobiveni su EIC kromatogrami tako da je programu zadano da prikaže signale samo za ion definirane  $m/z$  vrijednosti. Za prikaz takvog EIC kromatograma odabrane su one  $m/z$  vrijednosti koje odgovaraju  $m/z$  vrijednostima molekulskih iona pojedinih onečišćenja. Tako je u svrhu detekcije febeksostat amida odabrana vrijednost  $m/z$  335, febeksostat DEE-a  $m/z$  364 i etilfebeksostata  $m/z$  345. Ukoliko je onečišćenje prisutno u uzorku, u EIC kromatogramu uočiti će se pik na onom vremenu zadržavanja koje odgovara  $t_r$  vrijednosti tog onečišćenja, a konačna potvrda slijedi usporedbom masenog spektra pika s masenim spektrom standarda onečišćenja.

#### 4.3.1. Detekcija febeksostat amida

Budući da protonirani molekularni ion febeksostat amida u masenom spektru daje signal pri  $m/z$  335, ta je vrijednost zadana za dobivanje EIC kromatograma (Slika 22) u svrhu detekcije ovog onečišćenja.

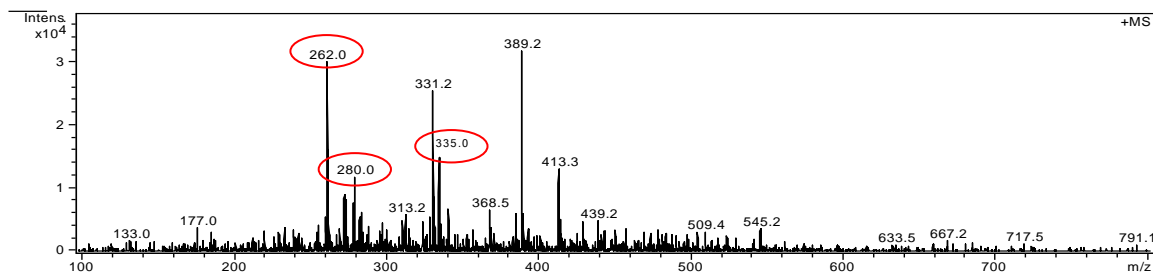


**Slika 22.** EIC kromatogram izoliranih iona za  $m/z$  335

Na EIC(335) kromatogramu uočava se pik pri očekivanom vremenu zadržavanja  $t_r = 2,0$  min. Kako se za bilo koju točku na ovom piku može vidjeti maseni spektar, on je uspoređen s masenim spektrom standarda febeksostat amida.

Maseni spektar kromatografskog pika pri  $t_r = 2,0$  min pokazuje mnoštvo signala pri različitim  $m/z$  vrijednostima (Slika 23). Ipak, moguće je izdvojiti signale pri  $m/z$  262, 280 i 335 koji su također prisutni u masenom spektru standarda onečišćenja. Ostali signali, inače uočeni u spektru standarda, npr. pri  $m/z$  234 i 357, prisutni su i ovdje, ali su toliko slabog

intenziteta da se ne vide od šuma bazne linije. Važno je napomenuti da su intenziteti signala u ovom masenom spektru reda veličine  $10^4$  što su za masenu spektrometriju vrlo male vrijednosti. One indiciraju prisutnost onečišćenja, međutim u vrlo maloj količini. Da bi se pikovi onečišćenja bolje vidjeli u TIC/EIC kromatogramu, odnosno da bi intenziteti signala u masenom spektru bili veći, potrebno je u startu prirediti ispitivani uzorak veće koncentracije.

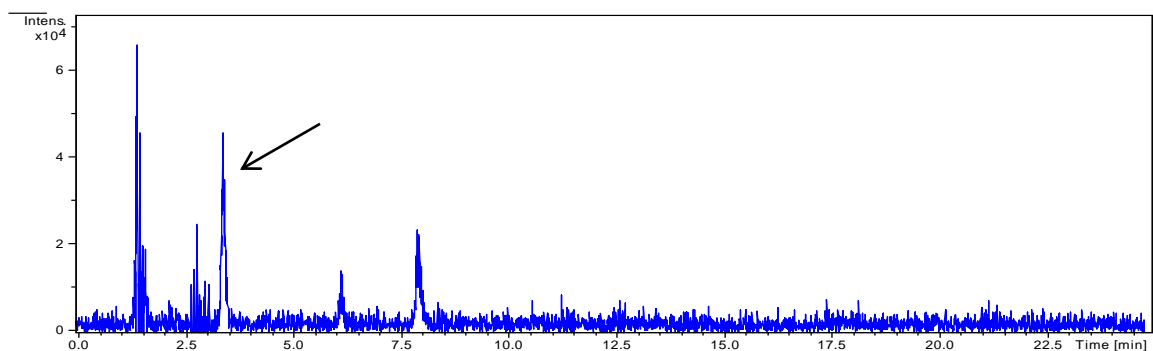


**Slika 23.** Maseni spektar kromatografskog pika pri  $t_r = 2,0$  min iz EIC(335)

Na temelju provedene analize, kromatografski pik s vremenom zadržavanja  $t_r = 2,0$  min mogao bi odgovarati febuksostat amidu.

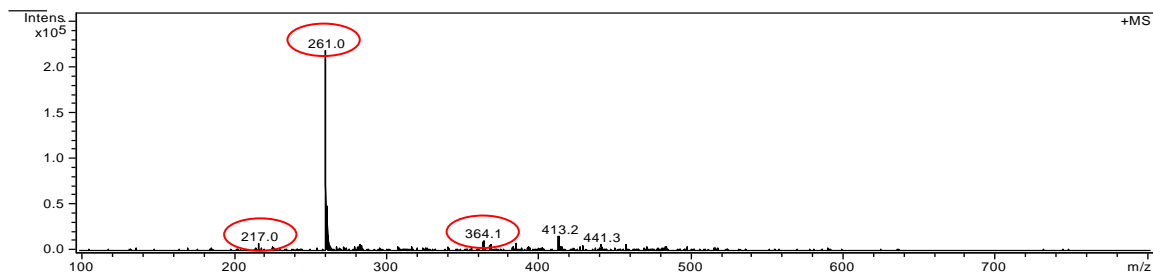
#### 4.3.2. Detekcija febuksostat DEE-a

Kako bi se ispitala prisutnost febuksostat DEE-a, snimljen je EIC kromatogram za njegov molekularni ion koji daje signal pri  $m/z$  364 (Slika 24). Budući da vrijeme zadržavanja ovog onečišćenja iznosi 3,4 min, u EIC kromatogramu očekuje se pik pri tom vremenu.



**Slika 24.** EIC kromatogram izoliranih iona za  $m/z$  364

Uočeni kromatografski pik pri  $t_r = 3,4$  min sugerira nastanak većeg broja iona  $m/z$  vrijednosti 364, međutim potreban je uvid u maseni spektar tog pika (Slika 25).



**Slika 25.** Maseni spektar kromatografskog pika pri  $t_r = 3,4$  min iz EIC(364)

Dobiveni maseni spektar pokazuje nekoliko signala od kojih valja izdvojiti tri, i to pri  $m/z$  217, 261 i 364. Od navedenih, ion pri  $m/z$  364 odgovarao bi protoniranom molekulskom ionu febuksostat DEE-a. S druge strane, fragmentni ioni pri  $m/z$  217 i 261 nisu prisutni u masenom spektru standarda febuksostat DEE-a, a nisu se pojavili ni u jednom  $MS^2$  spektru fragmentnih iona tijekom masene analize standarda ovog onečišćenja. Oni su, pak, karakteristični za maseni spektar febuksostata, ali njihova prisutnost zapravo ne iznenađuje. Dodatnom analizom TIC kromatograma ispitivanog uzorka na Slici 20 vidi se nesimetričnost pika koji odgovara febuksostatu. U točki koja odgovara  $t_r = 3,4$  min taj pik ima tzv. rep (engl. *tailing*) što znači da ioni koji potječu od febuksostata koeluiraju s ionima koji potječu od raznih onečišćenja. Posljedično, na istom je masenom spektru uočljivo više fragmentnih iona, a da se pritom ne zna točno koji ion potječe od čega.

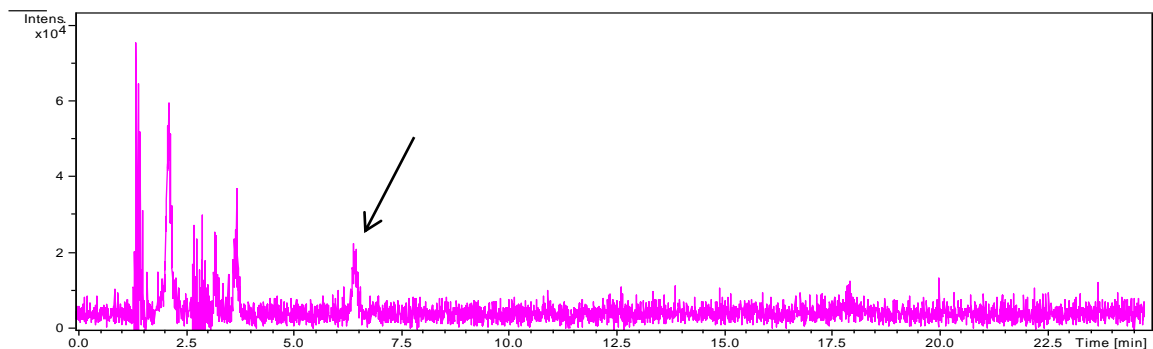
Fragmenti koji bi omogućili potvrdu identiteta febuksostat DEE-a, ujedno uočeni u masenom spektru standarda, jesu oni pri  $m/z$  234, 262, 280 i 308. Oni su prisutni u masenom spektru na Slici 25, međutim iznimno su slabog intenziteta.

Na temelju navedenog donesen je zaključak kako nije moguće sa sigurnošću utvrditi pripada li pik s  $t_r = 3,4$  min febuksostat DEE-u. Gore opisana interferencija vjerojatna je posljedica nepravilnosti u radu degazera mobilne faze, međutim, ukoliko se ispostavi da nije, bit će potrebno unijeti promjene u kromatografske uvjete analize ispitivanog uzorka s ciljem potpunog odvajanja pikova febuksostata i onečišćenja.

#### 4.3.3. Detekcija etil-febuksostata

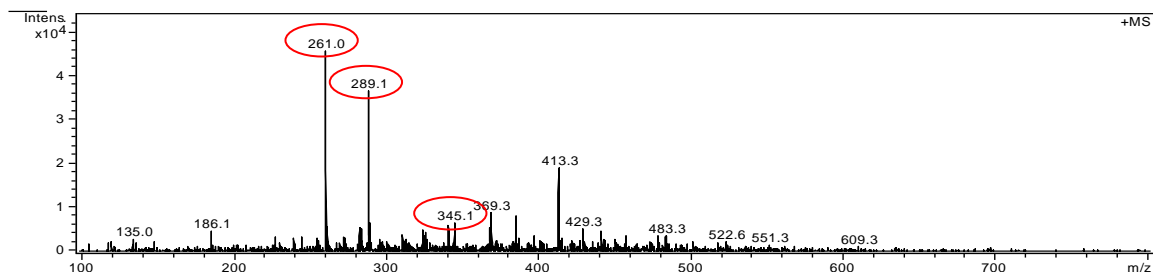
U svrhu detekcije etil-febuksostata u ispitivanom uzorku iz gotovog ljeovitog oblika odabrana je vrijednost  $m/z$  345 za dobivanje odgovarajućeg EIC kromatograma (Slika 26). Očekuje se pojava kromatografskog pika pri vremenu zadržavanja etil-febuksostata  $t_r = 6,4$  min.





**Slika 26.** EIC kromatogram izoliranih iona za  $m/z$  345

Kao i kod prethodnih onečišćenja, snimljen je maseni spektar interesnog pika (Slika 27), nakon čega je uspoređen s masenim spektrom standarda etil-feboksostata.



**Slika 27.** Maseni spektar kromatografskog pika pri  $t_r = 6,4$  min iz EIC(345)

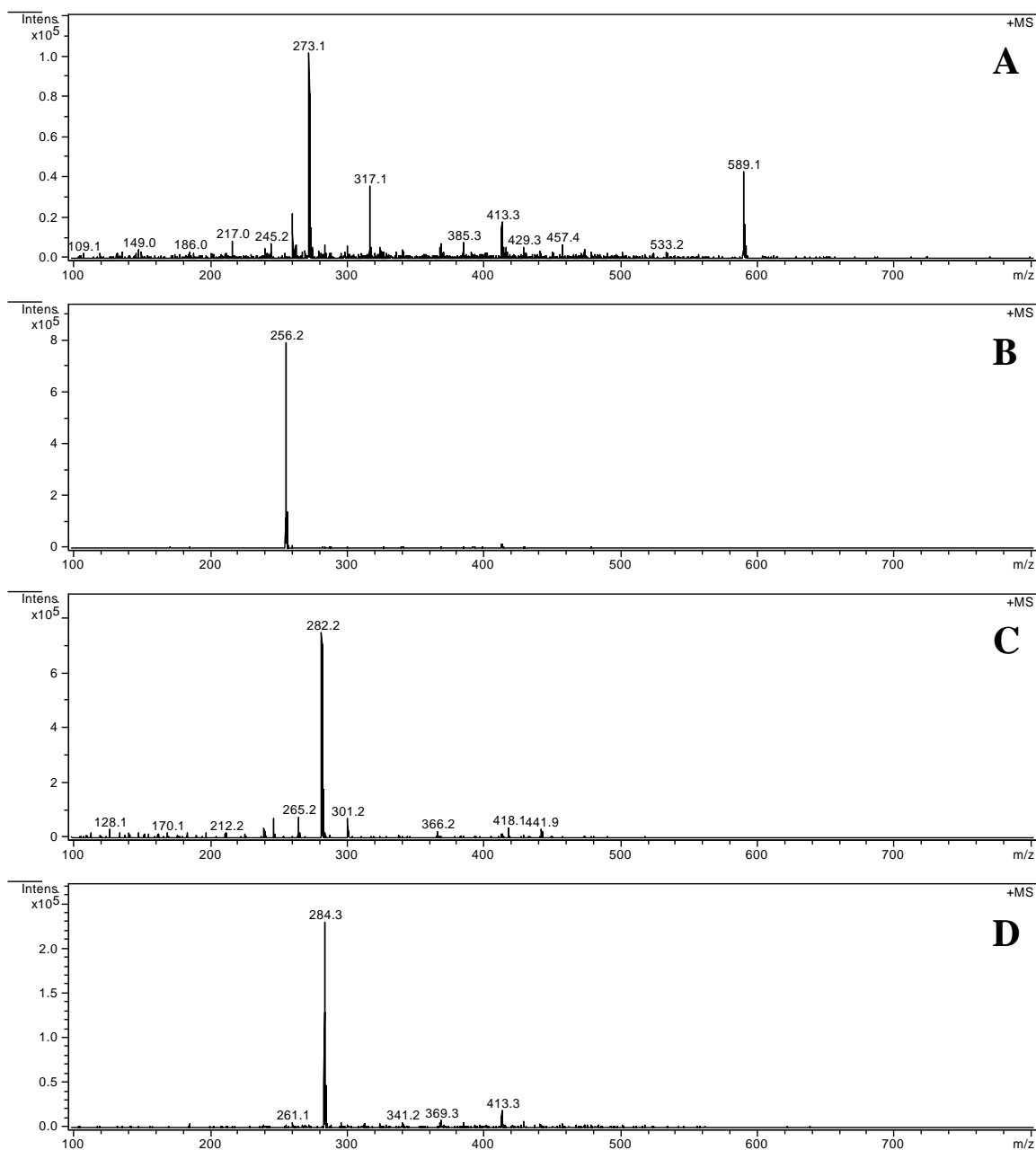
Maseni je spektar pika pri  $t_r = 6,4$  min vrlo informativan. Vidljiv je velik broj fragmentnih iona, među kojima su prisutni i oni potrebni za identifikaciju etil-feboksostata. Naime, signali pri  $m/z$  261, 289 i 345 pojavljuju se i u masenom spektru standarda ovog onečišćenja. Ponovno je važno uočiti da je red veličine intenziteta uočenih signala  $10^4$  što ide u prilog vrlo maloj količini onečišćenja.

Na temelju slaganja dobivenog i masenog spektra standarda onečišćenja, kromatografski pik s vremenom zadržavanja  $t_r = 6,4$  min mogao bi odgovarati etil-feboksostatu.

#### 4.3.4. Ostala onečišćenja u ispitivanom uzorku

S ciljem daljnjeg istraživanja tematike onečišćenja feboksostata, snimljeni su maseni spektri ostalih onečišćenja uočenih na TIC kromatogramu ispitivanog uzorka. Ta onečišćenja nisu analizirana zbog nedostatka odgovarajućih standardnih supstancija, međutim njihovi maseni spektri mogu poslužiti kao polazna točka za nastavak rada.

Na Slici 28 prikazani su maseni spektri onečišćenja koja odgovaraju vremenima zadržavanja  $t_r = 7,8$  min, 11,4 min, 12,5 min i 22,2 min.



**Slika 28.** Maseni spektri ostalih detektiranih onečišćenja u ispitivanom uzorku:

$t_r = 7,8$  min (A),  $t_r = 11,4$  min (B),  $t_r = 12,5$  min (C),  $t_r = 22,2$  min (D)

## 5. ZAKLJUČCI

Koristeći vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (HPLC-MS) analizirana su onečišćenja aktivne farmaceutske supstancije febeksostata. HPLC je dao svoj doprinos omogućivši razdvajanje onečišćenja, a masena je spektrometrija pomogla u strukturnoj karakterizaciji i određivanju fragmentacijskih putova svakog pojedinog onečišćenja. Ista je metoda kasnije upotrijebljena za analizu onečišćenja u uzorku febeksostata izoliranog iz gotovog ljekovitog oblika. Tijekom rada doneseni su sljedeći zaključci:

1. Prikladne valne duljine za detekciju febeksostata i njegovih onečišćenja DAD detektorom iznose 237 nm i 254 nm. Ukoliko se za detekciju koristi valna duljina od 320 nm, u ispitivanom uzorku febeksostata iz tablete onečišćenja nisu vidljiva. Nasuprot tomu, na valnim duljinama detekcije od 237 nm i 254 nm onečišćenja se uočavaju, uz napomenu da su njihovi pikovi jačeg intenziteta pri  $\lambda_{\text{det}} = 254 \text{ nm}$ .
2. Zbog strukturne sličnosti između febeksostata i njegovih onečišćenja, UV-Vis spektri svih su analita vrlo slični te se potvrda identiteta bilo kojeg od njih ne može izvršiti samo na temelju izgleda UV-Vis spektra.
3. Predložena HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> metoda omogućuje istovremeno razdvajanje i strukturnu identifikaciju onečišćenja. Analizom masenog spektra bilo kojeg analita moguće je odrediti njegovu relativnu molekulsku masu. Također, ukoliko se istražuju fragmentacijski putovi nekog analita, zahvaljujući analizatoru stupici iona, moguće je odabrati ion željene  $m/z$  vrijednosti te ga potom fragmentirati. Ponavljanjem postupka, odnosno snimanjem MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup>, MS<sup>4</sup> itd. spektara, dobiva se uvid u putove fragmentacije tog analita.
4. Predloženi fragmentacijski putovi febeksostata, febeksostat amida, febeksostat DEE-a i etil-febeksostata mogu pomoći u razumijevanju profila onečišćenja febeksostata te olakšati i ubrzati ispitivanje čistoće febeksostata u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovom ljekovitom obliku.
5. Fragmentacijski putovi onečišćenja febeksostata uglavnom započinju uklanjanjem postraničnih lanaca i skupina s osnovnih prstena (benzena i tiazola). Kako se onečišćenja međusobno razlikuju upravo u postraničnim lancima i skupinama, dijelovi fragmentacijskih putova uslijed kojih odlaze ove skupine karakteristični su za svako

- pojedino onečišćenje. Nakon toga, budući da se svode na jednostavnije kemijske entitete, fragmentacijski im se putovi više-manje isprepliću i nisu specifični kao na početku.
6. Tijekom analize ispitivanog uzorka febuksostata iz gotovog ljekovitog oblika na HPLC-DAD kromatogramu uočeni su pikovi koji zasigurno odgovaraju onečišćenjima. Također, suspektni su pikovi uočeni i na kromatogramu ukupne ionske struje (TIC kromatogramu) istog uzorka. Kako bi se utvrdilo odgovara li neki od tih pikova poznatom onečišćenju, iz TIC kromatograma dobiveni su kromatogrami izoliranih iona (EIC kromatogrami), i to tako da je programu zadano da prikaže kromatogram samo za željeni ion definirane  $m/z$  vrijednosti. Kao reprezentativni ion za svako je onečišćenje odabran njegov molekularni ion poznate vrijednosti  $m/z$ . Potencijalna prisutnost onečišćenja detektira se pojavom pika u EIC kromatogramu na onom vremenu koje odgovara vremenu zadržavanja onečišćenja nakon čega slijedi usporedba masenih spektara pika i standarda onečišćenja. Tako je zaključeno da su febuksostat amid i etil-febuksostat vrlo vjerojatno prisutni u uzorku, dok se za febuksostat DEE to ne može sa sigurnošću tvrditi.
  7. Zbog nesimetričnosti kromatografskog pika febuksostata nije postignuto potpuno razdvajanje febuksostata i onečišćenja febuksostat DEE-a, odnosno došlo je do njihove koelucije. Posljedica je toga pojava fragmentnih iona karakterističnih za febuksostat u masenom spektru koji bi, prema vremenu zadržavanja, trebao odgovarati febuksostat DEE-u. Potrebno je riješiti ovaj problem kako bi se sa sigurnošću mogla utvrditi prisutnost febuksostat DEE-a u ispitivanom uzorku.
  8. Intenziteti signala u EIC kromatogramima reda su veličine  $10^4$  što su za masenu spektrometriju vrlo male vrijednosti koje indiciraju prisutnost onečišćenja, ali u vrlo malim količinama.
  9. Na HPLC-DAD i TIC kromatogramima ispitivanog uzorka febuksostata iz gotovog ljekovitog oblika uočena su još 4 kromatografska pika koja odgovaraju onečišćenjima. S obzirom na njihovo vrijeme zadržavanja, riječ je o vrlo nepolarnim onečišćenjima koja je potrebno dodatno ispitati, tj. odrediti im strukturu.

## 6. LITERATURA

1. Adenuric<sup>®</sup> 80 mg filmom obložene tablete. Dodatak i sažetak opisa svojstava lijeka, 2012., <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.6.2017.
2. Ahuja S, Scypinski S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. San Diego, Academic Press, 2001, str. 127.
3. Alopurinol Belupo<sup>®</sup> 100 mg tablete. Sažetak opisa svojstava lijeka, 2015., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 7.6.2017.
4. Balogh MP. The Mass Spectrometry Primer. Milford, Waters Corporation, 2009, str. 13, 32-34.
5. Chohan S. Safety and Efficacy of Febuxostat Treatment in Subjects with Gout and Severe Allopurinol Adverse Reactions. *J. Rheumatol.*, 2011, 38 (9), 1957-1959.
6. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina*, 2009, 45 (3), 218-232.
7. Drugs & Diseases: Febuxostat, Pharmacology, <http://www.reference.medscape.com>, pristupljeno 7.6.2017.
8. Impurities in new drug substances, International Conference on Harmonization Q3A (R2), Geneva, 2006.
9. Isotopes and mass spectrometry, 2015., <http://www.khanacademy.org>, pristupljeno 9.6.2017.
10. Kadivar MH, Sinha PK, Kushwah D, Jana P, Sharma H, Bapodra A. Study of impurity carryover and impurity profile in Febuxostat drug substance by LC–MS/MS technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 56, 749-757.
11. Keller BO, Sui J, Young AB, Whittall RM. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 627 (1), 71-81.
12. Khanna D, FitzGerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh M, Neogi T, Pillinger MH, Merrill J, Lee S, Prakash S, Kaldas M, Gogia M, Perez-Ruiz F, Taylor W, Liote F, Choi H, Singh JA, Dalbeth N, Kaplan S, Niyyar V, Jones D, Yarows SA, Roessler B, Kerr G, King C, Levy G, Furst DE, Lawrence Edwards N, Mandell B, Schumacher HR, Robbins M, Wenger M, Terkeltaub R. American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout Part I: Systematic Non-pharmacologic and Pharmacologic Therapeutic Approaches to Hyperuricemia. *Arthritis Care & Research*, 2012, 64 (10), 1431-1446.

13. Khanna D, FitzGerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh M, Neogi T, Pillinger MH, Merill J, Lee S, Prakash S, Kaldas M, Gogia M, Perez-Ruiz F, Taylor W, Liote F, Choi H, Singh JA, Dalbeth N, Kaplan S, Niyyar V, Jones D, Yarows SA, Roessler B, Kerr G, King C, Levy G, Furst DE, Lawrence Edwards N, Mandell B, Schumacher HR, Robbins M, Wenger M, Terkeltaub R. American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout Part II: Therapy and Antiinflammatory Prophylaxis of Acute Gouty Arthritis. *Arthritis Care & Research*, 2012, 64 (10), 1447-1461.
14. Khosravan R, Grabowski BA, Wu JT, Joseph-Ridge N, Vernillet L. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Safety of Febuxostat, a Non-Purine Selective Inhibitor of Xanthine Oxidase, in a Dose Escalation Study in Healthy Subjects. *Clin Pharmacokinet.*, 2006, 45 (8), 821-841.
15. Lancashire Medicines Management Group. Gout Management Summary Guidelines, 2015., <http://www.lancsmmg.nhs.uk>, pristupljeno 7.6.2017.
16. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2013, str. 20-29.
17. Nigović B. Vezani sustavi u analitici lijekova. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015a.
18. Nigović B. Masena spektrometrija. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015b.
19. Nigović B. Onečišćenja u lijekovima. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015c.
20. Phansalkar S, Desai AA, Bell D, Yoshida E, Doole J, Czochanski M, Middleton B, Bates DW. High priority drug-drug interactions for use in electronic health records. *J. Am. Med. Inform. Assoc.*, 2012, 19 (5), 735-743.
21. Rodrigues MVN, Corrêa RS, Vanzolini KL, Santos DS, Batista AA, Cass QB. Characterization and screening of tight binding inhibitors of xanthine oxidase: An on-flow assay, *RSC Adv.*, 2015, 5, 37533-37538.
22. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina, Doktorska disertacija, Zagreb, 2013.
23. Tsai M, Wu JT, Gunawardhana L, Naik H. The effects of xanthine oxidase inhibition by febuxostat on the pharmacokinetics of theophylline. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012, 50 (5), 331-337.
24. Watson DG. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 167-195.
25. Wong PSH, Graham Cooks R. Ion trap mass spectrometry. *Current separations*, 1997, 16, 85-92.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1. Sažetak

Giht je metabolička bolest karakterizirana ponavljanim napadima upalnog artritisa čiji je glavni uzrok stanje povećane koncentracije mokraćne kiseline u krvi, hiperuricemija. Srećom, postotak je populacije s dijagnozom gihta još uvijek nizak, međutim, incidencija je gihta u porastu. Ukoliko bolest nije dobro kontrolirana nefarmakološkim mjerama, potrebna je administracija lijekova, pri čemu glavnu ulogu imaju lijekovi za snižavanje razine mokraćne kiseline u krvi. Prva je linija liječenja alopurinol, ali, u slučaju neučinkovitosti ili nepodnošenja alopurinola, lijek je izbora febeksostat.

Febeksostat je relativno nov lijek – selektivan, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze, enzima koji katalizira nastajanje mokraćne kiseline u organizmu. Učinkovit je u prevenciji i smanjenju učestalosti akutnih napada gihta. Febeksostat još uvijek nema svoju monografiju u Europskoj farmakopeji, stoga je potrebno razviti brze, selektivne, osjetljive i točne metode za potvrdu identiteta, ispitivanje čistoće te određivanje sadržaja febeksostata u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima.

Cilj je ovog diplomskog rada ispitivanje čistoće febeksostata. Korištena je visoko sofisticirana HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> metoda te je postignuto odjeljivanje febeksostata i njegovih triju onečišćenja (febeksostat amid, febeksostat DEE, etil-febeksostat), a nakon toga masenom su spektrometrijom pretpostavljeni fragmentacijski putovi svakog analita. Predloženi fragmentacijski putovi mogu pomoći u razumijevanju profila onečišćenja febeksostata te olakšati i ubrzati ispitivanje njegove čistoće u gotovom ljekovitom obliku. S tim je ciljem pripremljen i analiziran uzorak febeksostata ekstrahiranog iz tablete, a uočeno je više kromatografskih pikova koji odgovaraju onečišćenjima. Od triju interesnih onečišćenja, u uzorku febeksostata iz tablete detektirana su dva, dok se prisutnost trećeg onečišćenja ne može sa sigurnošću potvrditi. Također, uočena su još četiri pika onečišćenja koje u nastavku rada treba strukturno karakterizirati i identificirati.

**ključne riječi:** febeksostat, onečišćenja, HPLC, masena spektrometrija, putovi fragmentacije

## 7.2. Summary

Gout is a metabolic disease characterized by recurrent attacks of inflammatory arthritis. It is mostly connected with the state of abnormally high blood level of uric acid called hyperuricemia, which is considered to be the main cause of gout. The percentage of the population diagnosed with this disease is quite small, but the incidence of gout tends to grow nowadays. If non-pharmacological measures are not effective in controlling the disease, drug administration is needed. Although there are a few pharmacological groups of drugs that can be used in gout treatment, the main role is played by drugs that lower the blood concentration of uric acid. Allopurinol represents the first line of treatment, but in the case of its ineffectiveness or intolerance, febuxostat can be used.

Febuxostat is a relatively new drug, which acts like selective, non-purine xanthine oxidase inhibitor. Xanthine oxidase is an enzyme that catalyzes the production of uric acid, therefore, its inhibition may help prevent and reduce the frequency of acute gout attacks. Febuxostat still does not have an official monograph in pharmacopoeia so it is highly necessary to develop fast, selective, sensitive and accurate analytical methods for the identification and determination of febuxostat and its impurities in active pharmaceutical ingredients and finished drug products.

The aim of this diploma thesis was to analyze impurities in febuxostat. In order to do so, highly sophisticated HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> method was used to separate febuxostat and its three impurities (febuxostat amide, febuxostat DEE, ethyl-febuxostat). Then, fragmentation pathways for all analytes were determined using mass spectrometry. Suggested pathways of fragmentation can be helpful in understanding the impurity profile of febuxostat, and can also contribute to a fast and easy way of impurity profiling of finished drug product. Hence, the sample of febuxostat extracted from a tablet was taken and analyzed. Many chromatographic peaks that matched impurities were noticed. Two out of three impurities of interest were detected in this sample, while the presence of the third impurity could not be confirmed with certainty. Also, four more peaks were noticed but they will be structurally characterized and identified in later research.

**keywords:** febuxostat, impurities, HPLC, mass spectrometry, fragmentation pathways



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA FEBUKSOSTATA I NJегоVIH ONEČIŠĆENJA HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> METODOM

Tomislav Kukor

#### SAŽETAK

Giht je metabolička bolest karakterizirana ponavljanim napadima upalnog artritisa čiji je glavni uzrok stanje povećane koncentracije mokraćne kiseline u krvi, hiperuricemija. Srećom, postotak je populacije s dijagnozom gihta još uvijek nizak, međutim, incidencija je gihta u porastu. Ukoliko bolest nije dobro kontrolirana nefarmakološkim mjerama, potrebna je administracija lijekova, pri čemu glavnu ulogu imaju lijekovi za snižavanje razine mokraćne kiseline u krvi. Prva je linija liječenja alopurinol, ali, u slučaju neučinkovitosti ili nepodnošenja alopurinola, lijek je izbora febuksostat.

Febuksostat je relativno nov lijek – selektivan, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze, enzima koji katalizira nastajanje mokraćne kiseline u organizmu. Učinkovit je u prevenciji i smanjenju učestalosti akutnih napada gihta. Febuksostat još uvijek nema svoju monografiju u Europskoj farmakopeji, stoga je potrebno razviti brze, selektivne, osjetljive i točne metode za potvrdu identiteta, ispitivanje čistoće te određivanje sadržaja febuksostata u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima.

Cilj je ovog diplomskog rada ispitivanje čistoće febuksostata. Korištena je visoko sofisticirana HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> metoda te je postignuto odjeljivanje febuksostata i njegovih triju onečišćenja (febuksostat amid, febuksostat DEE, etil-febuksostat), a nakon toga masenom su spektrometrijom pretpostavljeni fragmentacijski putovi svakog analita. Predloženi fragmentacijski putovi mogu pomoći u razumijevanju profila onečišćenja febuksostata te olakšati i ubrzati ispitivanje njegove čistoće u gotovom ljekovitom obliku. S tim je ciljem pripremljen i analiziran uzorak febuksostata ekstrahiranog iz tablete, a uočeno je više kromatografskih pikova koji odgovaraju onečišćenjima. Od triju interesnih onečišćenja, u uzorku febuksostata iz tablete detektirana su dva, dok se prisutnost trećeg onečišćenja ne može sa sigurnošću potvrditi. Također, uočena su još četiri pika onečišćenja koje u nastavku rada treba strukturno karakterizirati i identificirati.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranice, 28 grafičkih prikaza, 2 tablice i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: febuksostat, onečišćenja, HPLC, masena spektrometrija, putovi fragmentacije

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Mirela Matić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Biljana Nigović**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytics and Control of Medicines  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF FEBUXOSTAT AND ITS IMPURITIES BY HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> METHOD

Tomislav Kukor

#### SUMMARY

Gout is a metabolic disease characterized by recurrent attacks of inflammatory arthritis. It is mostly connected with the state of abnormally high blood level of uric acid called hyperuricemia, which is considered to be the main cause of gout. The percentage of the population diagnosed with this disease is quite small, but the incidence of gout tends to grow nowadays. If non-pharmacological measures are not effective in controlling the disease, drug administration is needed. Although there are a few pharmacological groups of drugs that can be used in gout treatment, the main role is played by drugs that lower the blood concentration of uric acid. Allopurinol represents the first line of treatment, but in the case of its ineffectiveness or intolerance, febuxostat can be used.

Febuxostat is a relatively new drug, which acts like selective, non-purine xanthine oxidase inhibitor. Xanthine oxidase is an enzyme that catalyzes the production of uric acid, therefore, its inhibition may help prevent and reduce the frequency of acute gout attacks. Febuxostat still does not have an official monograph in pharmacopoeia so it is highly necessary to develop fast, selective, sensitive and accurate analytical methods for the identification and determination of febuxostat and its impurities in active pharmaceutical ingredients and finished drug products.

The aim of this diploma thesis was to analyze impurities in febuxostat. In order to do so, highly sophisticated HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> method was used to separate febuxostat and its three impurities (febuxostat amide, febuxostat DEE, ethyl-febuxostat). Then, fragmentation pathways for all analytes were determined using mass spectrometry. Suggested pathways of fragmentation can be helpful in understanding the impurity profile of febuxostat, and can also contribute to a fast and easy way of impurity profiling of finished drug product. Hence, the sample of febuxostat extracted from a tablet was taken and analyzed. Many chromatographic peaks that matched impurities were noticed. Two out of three impurities of interest were detected in this sample, while the presence of the third impurity could not be confirmed with certainty. Also, four more peaks were noticed but they will be structurally characterized and identified in later research.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 28 figures, 2 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: febuxostat, impurities, HPLC, mass spectrometry, fragmentation pathways

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mirela Matić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017