

УДК 543.426; 546.66:615.07

¹Скрипинець Ю.В., к.х.н.; ¹Єгорова А.В., д.х.н., проф.; ²Войтюк О.Д.;
¹Антонович В.П., д.х.н., проф.

ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДОЛУТЕГРАВІРУ НАТРІЮ В ТАБЛЕТКАХ

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
²Товариство з додатковою відповідальністю ТДВ «ІНТЕРХІМ», м. Одеса,
Лютдорфська дорога, 86; e-mail: yegorova@interchem.com.ua

Контроль якості фармацевтичних препаратів, продуктів харчування та об'єктів навколишнього середовища є актуальною задачею сучасної аналітичної хімії і здійснюється за допомогою різних методів, часто використовуючи комплексні сполуки у якості аналітичних форм. В останні роки у фармацевтичному аналізі широко застосовуються комплексні сполуки іонів лантанідів з лікарськими препаратами, здатними сенсбілізувати 4f-люмінесценцію, для високочутливого визначення ксенобіотиків [1-3] у дозованих лікарських формах та у біологічних рідинах.

Долутегравір натрію (4R, 12aS) -9 - {[(2,4-діфторфеніл) метил] карбамойл} -4-метил-6,8-діоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагідро-2H-піrido[1', 2': 4,5] піразин [2,1-b] [1,3] оксазін-7-олат натрію) – противірусний засіб для лікування ВІЛ з класу інгібіторів інтегрази другого покоління. Вміст долутегравіру натрію у таблетованій лікарській формі становить 52,6 мг (50 мг долутегравіру). У літературі описано визначення долутегравіру натрію (ДН) у фармацевтичних препаратах та біологічних зразках за допомогою ВЕРХ [4-7] та спектрофотометрії [8-10].

Метою даної роботи був пошук нової аналітичної форми для високочутливого люмінесцентного визначення долутегравіру натрію у таблетованій лікарській формі з використанням сенсбілізованої люмінесценції іонів європію(III).

Експериментальна частина

В роботі використовували стандартний розчин хлориду європію (1×10^{-2} моль/л), який

готували з відповідного оксиду високої чистоти. Концентрацію металу стандартизували комплексометрично. Стандартні розчини долутегравіру натрію (1×10^{-3} моль/л та 0,44 мг/мл) готували розчиненням точних наважок субстанції в диметилформаміді. Робочий розчин ДН (44 мкг/мл) готували розведенням водою стандартного розчину (0,44 мг/мл) у 10 разів. Для створення необхідного значення рН середовища застосовували 40% уротропіновий буферний розчин, який готували розчиненням точної наважки уротропіну у воді. Всі використані реактиви були кваліфікації ч.д.а. і х.ч., вода – бідистильована.

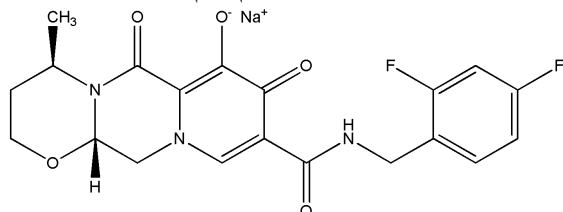
Спектри люмінесценції іонів Eu(III) реєстрували в області 560–680 нм із $\lambda_{\text{макс}} = 612, 590$ нм (переходи ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$, ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, відповідно) за допомогою спектрометру Cary Eclipse (Varian). Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC (Shimadzu).

Значення енергії триплетного рівня органічного ліганду (долутегравіру натрію) визначали реєстрацією спектрів фосфоресценції його комплексу з гадолінієм при 77°К. Час життя збудженого стану комплексу розраховували з кривої затухання його люмінесценції з наступною обробкою результатів у програмі OriginPro 7.5.

Значення рН розчинів вимірювали за допомогою рН-метру Seven Easy Mettler Toledo (Китай) із скляним електродом. Аналітичні електронні ваги серії ED 124 S фірми Sartorius (Німеччина). Усі вимірювання проводили при кімнатній температурі (22 ± 2 °C).

Результати та їх обговорення

Долутегравір натрію є здатним до утворення з іонами Eu(III) комплексної сполуки, в якій за рахунок внутрішньомолекулярного переносу енергії збудження від органічного ліганду на іон Eu(III) спостерігається інтенсивна люмінесценція останнього.



Долутегравір натрію (ДН)

Спектр поглинання водного розчину долутегравіру натрію характеризується наявністю двох смуг в УФ-області спектру з максимумами 252 нм та 325 нм, молярні коефіцієнти поглинання ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) яких становлять 30450 та 9090, відповідно. Енергія триплетного рівня ДН (18000 см^{-1}) більше енергії рівня першого збудженого стану іону Eu(III) (17300 см^{-1}) та менше – іону Tb(III) (20500 см^{-1}). Наявність смуг поглинання в УФ області спектру з високими молярними коефіцієнтами поглинання, триплетний рівень ліганду дозволяють припустити імовірність того, що в комплексі із зазначеним лігандом може здійснюватися ефективна передача енергії збудження від органічної частини молекули на резонансний рівень тільки іонів Eu(III).

Комплексоутворення іонів Eu(III) з долутегравіром натрію спостерігається в широкому інтервалі значень рН (4,0-11,0) з максимальною інтенсивністю люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) при рН=7,0-8,0. У кислому середовищі (рН < 4,0) ступінь утворення комплексу дуже малий, що, імовірно, пов'язано з незначною депротонізацією долутегравіру натрію, якої недостатньо для комплексоутворення. У сильно лужному середовищі (рН > 12,0) спостерігається руйнування комплексу та гідроліз іонів європію(III). Для утворення оптимального рН розчину використовували 0,5 мл 40% уротропінового буферного розчину.

$I_{\text{люм}}$ комплексу залежить від природи органічного розчинника. Додавання до комплексу Eu(III)–ДН органічних розчинників (50%, об/об) незначно підвищує $I_{\text{люм}}$

європію на 30-40 % (ДМФА, ДМСО) та на 5-10 % (етанол, метанол, ізопропанол). Розглянуто вплив деяких поверхнево-активних речовин (додецилсульфат натрію, тритон X-100, твін 80, цетилпіридинію хлорид) на $I_{\text{люм}}$ комплексу Eu(III)–ДН. Встановлено, що їх введення у розчин не впливає на $I_{\text{люм}}$, або гасить її. Для аналізу запропоновано водне середовище.

З метою оптимізації умов комплексоутворення та виявлення придатності комплексу Eu(III)–ДН для визначення долутегравіру натрію було вивчено його люмінесцентні властивості.

Спектр збудження комплексу, представлений на рис. 1 (а), має два максимуми за довжинами хвиль 250 нм та 290 нм. Для аналітичних цілей було вибрано смугу збудження при 290 нм.

Час життя збудженого стану ($\tau = 95 \text{ мкс}$) вивченого комплексу розраховано з кривих затухання сенсibilізованої люмінесценції (рис. 1, б).

За допомогою методу обмеженого логарифмування встановлено співвідношення компонентів у комплексі Eu(III)–ДН, яке становить 1:2. Можливо, долутегравір натрію координується до іону Eu(III) по фенольному фрагменту та по карбонільним групам.

В оптимальних умовах $I_{\text{люм}}$ іонів Eu(III) в комплексі Eu(III)–ДН досягає максимуму через 5 хвилин після змішування розчинів і залишається постійною протягом 1 години.

Люмінесцентні властивості комплексу Eu(III) з долутегравіром натрію були використані для кількісного визначення ДН в таблетованій формі даного препарату в таблетках «Долутегравір» (Aurobindo Pharma Limited, Індія) та Tivicay® (ViiV Healthcare, Великобританія).

Побудова градуовального графіку

У мірні колби місткістю 10,0 мл вносили 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 2,0, 3,0 мл робочого розчину ДН (44 мкг/мл). У кожен пробірку додавали по 1,0 мл 1×10^{-2} моль/л стандартного розчину хлориду Eu(III); 0,5 мл 40% уротропінового буферного розчину. Об'єм розчину в кожній колбі доводили дистильованою водою до позначки, перемішували і вимірювали $I_{\text{люм}}$ за довжин хвиль $\lambda_{\text{збуд}} = 290 \text{ нм}$ та $\lambda_{\text{еміс}} = 612 \text{ нм}$ (рис. 2, а).

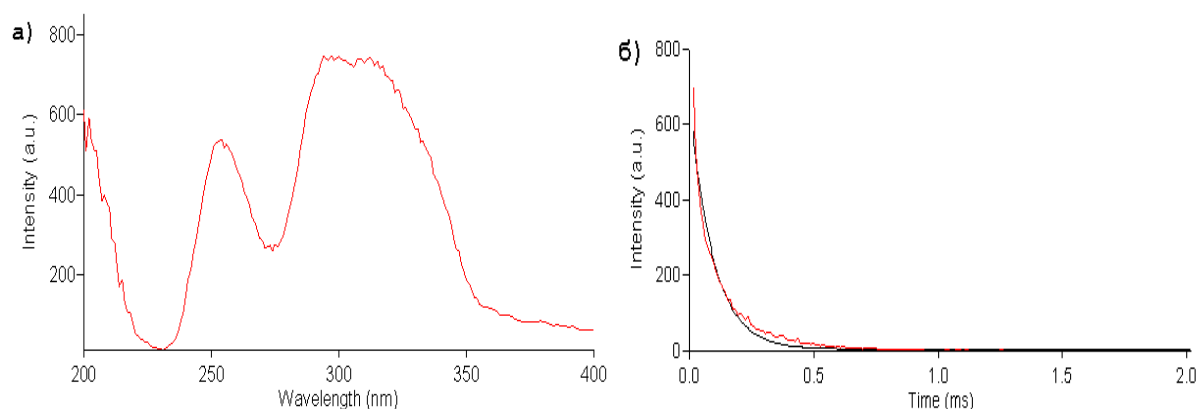


Рис. 1. Спектри збудження люмінесценції (а) та крива затухання сенсibiliзованої люмінесценції (б) комплексу Eu(III)–ДН ($C_{Eu} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{ДН} = 4,4$ мкг/мл; рН=7,5).

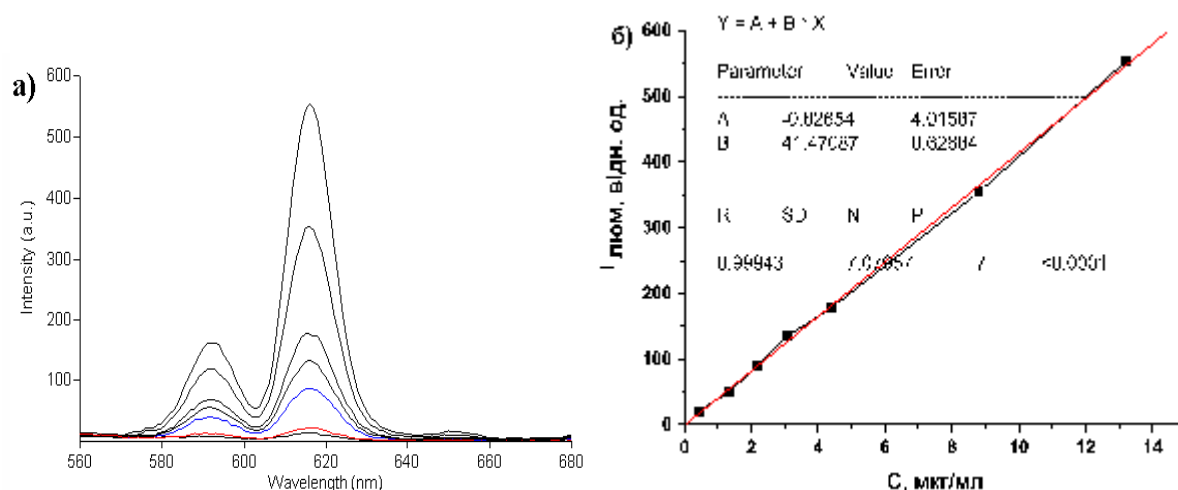


Рис. 2. Спектри люмінесценції (а) комплексу Eu(III)–ДН у присутності різних концентрацій долутегравіру натрію та калібрувальний графік (б) для його визначення ($C_{Eu} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $\lambda_{збуд} = 290$ нм)

За отриманими результатами будували градувальний графік залежності $I_{\text{люм}}$ від концентрації долутегравіру натрію: $I_{\text{люм}} = -0.82654 + 41.47087 \times C_{\text{ДН}}$ (коефіцієнт кореляції $R = 0.99943$), де $C_{\text{ДН}}$ – концентрація долутегравіру натрію (мкг/мл) (рис. 2, б). Лінійність спостерігається в інтервалі концентрацій долутегравіру натрію 0.44 – 13.2 мкг/мл з межею кількісного визначення 0.2 мкг/мл (3σ -критерій).

Правильність визначення долутегравіру натрію в таблетованій лікарській формі перевірено методом «введено-знайдено» на модельних розчинах у присутності допоміжних речовин: маніт (Е 421), целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію стеарилфумарат, натрію крохмальгліколят; оболонка таблетки: Opadry II Brown

85F565096 (спирт полівініловий, титану діоксид (Е 171), ПЕГ 3350, тальк, заліза оксид червоний (Е 172)). Одержані результати наведені в табл. 1.

Запропонована методика характеризується задовільними метрологічними характеристиками та простотою виконання.

Методика кількісного визначення долутегравіру натрію в таблетованій формі

Для кількісного визначення беруть наважку з порошку 20 розтертих таблеток.

Розчинник: вода : метанол (50:50 об/об).

Випробовуваний розчин. Точну наважку 310,0 мг порошку розтертих таблеток, еквівалентну 50 мг долутегравіру, поміщують у мірну колбу місткістю 500,0 мл, додають 400 мл розчинника, ретельно перемішують на магнітній мішалці протягом 40 хв (50°C),

охолоджують. Доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. Одержаний розчин фільтрують крізь мембранний фільтр (0,20 мкм; RC 15).

1,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10,0 мл, додають по

1.0 мл 1×10^{-2} моль/л стандартного розчину хлориду Eu(III); 0.5 мл 40% уротропінового буферного розчину, об'єм розчину доводять водою до позначки, перемішують.

Таблиця 1. Результати визначення долутегравіру натрію в модельних розчинах методом «введено-знайдено» (n=5, P=0.95)

| № з/п | Введено, мкг/мл | Знайдено, мкг/мл | S _r , % |
|-------|-----------------|------------------|--------------------|
| 1. | 2,2 | 2,21 ± 0,11 | 2,04 |
| 2. | 4,4 | 4,41 ± 0,19 | 1,73 |
| 3. | 8,8 | 8,80 ± 0,29 | 1,31 |
| 4. | 13,2 | 13,19 ± 0,41 | 1,26 |

Розчин порівняння. 52,6 мг РСЗ долутегравіру натрію поміщають у мірну колбу місткістю 500,0 мл, додають 400 мл розчинника, ретельно перемішують на магнітній мішалці протягом 40 хв (50°C), охолоджують. Доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

1,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10,0 мл, додають по 1.0 мл 1×10^{-2} моль/л стандартного розчину хлориду Eu(III); 0.5 мл 40% уротропінового буферного розчину, об'єм розчину доводять водою до позначки, перемішують.

Через 5 хвилин вимірюють $I_{\text{люм}}$ випробовуваного розчину та розчину порівняння за довжини хвилі $\lambda_{\text{еміс}} = 612$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 290$ нм).

Вміст $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5$ (долутегравіру) в таблетці має бути від 47,5 мг до 52,5 мг, у перерахунку на середню масу таблетки.

Вміст долутегравіру (X) в одній таблетці, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{I_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot 500 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 0,9506}{I_0 \cdot m_1 \cdot 1 \cdot 500 \cdot 10} = \frac{I_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot 0,9506}{I_0 \cdot m_1}$$

де: I_1 – інтенсивність люмінесценції випробовуваного розчину, відн.од.;

I_0 – інтенсивність люмінесценції розчину РСЗ долутегравіру натрію, відн.од.;

m_0 – маса наважки РСЗ долутегравіру натрію, мг; m_1 – наважка порошку розтертих таблеток, мг; 0,9506 – коефіцієнт перерахунку долутегравіру натрію на долутегравір; b – середня маса таблетки, мг.

Результати кількісного визначення вмісту долутегравіру натрію в таблетках наведені в табл. 2.

Порівняння чутливості запропонованого методу і інших методів, що застосовуються для визначення ДН, представлено в табл. 3. Запропонований метод показує чутливість, яку можна порівняти з більшістю представлених методів.

З урахуванням припустимих меж кількісного визначення вмісту долутегравіру в таблетках ($\pm 5\%$), застосування запропонованої методики люмінесцентного визначення ДН з відносною похибкою до 2% є припустимим для контролю якості цього лікарського засобу.

Висновки

Наявність смуг поглинання в УФ області спектру з високими молярними коефіцієнтами поглинання та значення триплетного рівня ліганду відповідає умовам, необхідним для ефективного переносу енергії збудження від органічної молекули ліганду до іону лантаніду з наступним збудженням f-f люмінесценції.

Встановлено оптимальні умови взаємодії іонів Eu(III) з долутегравіром натрію (ДН), досліджено спектрально-люмінесцентні властивості комплексу Eu – ДН. Розроблена аналітична форма запропонована для люмінесцентного визначення даного препарату в таблетках «Долутегравір» (Aurobindo Pharma Limited, Індія) та Tivicay® (ViiV Healthcare, Великобританія).

Розроблена методика валідована за лінійність, точність, межа кількісного наступними показниками: специфічність, визначення.

Таблиця 2. Результати визначення вмісту долутегравіру натрію в таблетках (n = 5; P = 0,95)

| Таблетки | Знайдено, мг | Метрологічні параметри |
|--|--------------|--|
| «Долутегравір 50 мг» (Aurobindo Pharma Limited, Індія) | 49,54 | $X_{cp} = 49,94$ $S = 0,88$ $\Delta X = 1,09$ $S_r = 1,75 \%$ |
| | 51,22 | |
| | 50,02 | |
| | 48,83 | |
| | 50,11 | |
| Tivicay® 50 мг (ViiV Healthcare, Великобританія) | 49,52 | $X_{cp} = 50,10$ $S = 0,58$ $\Delta X = 0,72$ $S_r = 1,15 \%$ |
| | 49,85 | |
| | 50,15 | |
| | 49,94 | |
| | 51,05 | |

Таблиця 3. Методи, які використовуються для визначення долутегравіру натрію

| Метод визначення | Інтервал лінійності (мкг/мл) | Межа визначення (мкг/мл) | Література |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| ВЕРХ | 2,5-15,0 | 0,263 | [4] |
| ВЕРХ | 0,05-7,5 | 0,017 | [5] |
| ВЕРХ ВЕТШХ | 5,0-35,0 200-900* | 1,91 86,69* | [6] |
| ВЕРХ | 2,5-12,5 | 0,038 | [7] |
| СФ | 2,5-20,0 | 0,57 | [8] |
| СФ | 5-40 | - | [9] |
| Люмінесценція | 0,44-13,2 | 0,2 | дана робота |

* нг/пляму

Список використаних джерел

1. Бельтюкова С.В., Егорова А.В., Теслюк О.И. Использование f-f люминесценции ионов Eu (III) и Tb (III) в анализе лекарственных препаратов. *Укр. хим. журн.* 2000, 66(10), 115–121.
2. Антонович В.П., Егорова А.В., Александрова Д.И. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Глава «Флуориметрия в исследовании и контроле качества лекарственных препаратов». Под ред. члена-корр. НАН Украины В.П. Георгиевского. Харьков: *Изд-во НТМТ*, 2011. Т. 1. С. 203–255.
3. Rieutord A., Prognon P., Brion F., Mahuzier G. Liquid chromatographid determination using lanthanides as time - resolved luminescence probes for drugs and xenobiotics: advantages and limitations. *Analyst.* 1997, 122, 59R – 66 R.
4. Purnima B.V., Kumari M.S., Ramu G., Reddy T., Ramachandran D. Validated reversed phase HPLC method for assay and degradation studies of lamivudine, abacavir sulphate and dolutegravir in combined dosage form. *Int. J. Educ. Appl. Res.* 2016, 6(2), 86–95.
5. Talari Kalpana, Tiruveedula Raja Rajeswari, Ramana Reddy Ganji. Development and Validation of Analytical Method for Determination of Dolutegravir Sodium, Lamivudine and Tenofovir Disoproxil Fumarate Using Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. *Der Pharma Chemica.* 2017, 9(8), 117–127.
6. Bhavar G.B., Pekamwar S.S., Aher K.B., Thorat R.S., Chaudhari S.R. High-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitative estimation of dolutegravir sodium in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Sci. Pharm.* 2016, 84(2), 305–320.
7. Dubey S., Duggirala M. Simultaneous estimation of lamivudine, abacavir and dolutegravir by UPLC method. *Int. J. App. Pharm.* 2018, 10(1), 46–52.
8. Masthanamma S.K., Sridhar T.A., Saidulu P. A novel UV-spectrophotometric method development

and validation of dolutegravir in bulk and its laboratory synthetic mixture by using 8 M urea as hydrotropic solubilizing agent. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 2015, 7(4), 370–375.

9. Bhavar G.B., Aher K.B., Thorat R.S., Kakadsachin J., Pekamwar S.S. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of

dolutegravir sodium in tablet dosage form. *Malaysian J. Anal. Sci.* 2015, 19(6), 1156–1163.

10. Mulak U.A., Narkhede S.P., Shinde M.P. Development of analytical method for in-vitro drug dissolution study of dolutegravir marketed formulation. *J. Pharm. Sci. Res.* 2018, 10(11), 2726–2730.

Стаття надійшла до редакції: 25.03.2019.

LUMINESCENT DETERMINATION OF DOLUTEGRAVIR SODIUM IN TABLETS

¹Scrypynets Yu.V., ¹Yegorova A.V., ²Voitiuk O.D., ¹Antonovich V.P.

¹A.V. Bogantsky Physico-Chemical Institute of the NAS of Ukraine,

²InterChem SLC, Odessa, Lustdorfskaya road, 86; e-mail: yegorova@interchem.com.ua

The quality control of pharmaceuticals, food products and environmental objects is a topical task of analytical chemistry and is carried out using various methods, often using complex compounds as analytical forms. In recent years, in the pharmaceutical analysis, complex compounds of lanthanide ions are widely used in medicinal products that can sensitize 4f-luminescence, for their highly sensitive determination in dosage forms and in biological fluids.

Dolutegravir sodium (DN) is an integrase inhibitor that is meant to be used as part of combination therapy for the treatment of HIV. The sensitized luminescence of Eu(III) ions in complexes with dolutegravir sodium have been investigated ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{lum}} = 612 \text{ nm}$). Optimum concentration and acid-basic conditions of complex Eu:DN=1:1 formation has been established. I_{lum} is maximum at pH 7.5 (urotropine buffer). The absorption spectrum of DN in water characterized by intense bands in the UV region of the spectrum with maxima at $\lambda = 252 \text{ nm}$ and $\lambda = 325 \text{ nm}$. A ratio of the energy of triplet state of the ligand (18000 cm^{-1}) and the first emitting level of Eu(III) ion (17300 cm^{-1}) as well as high extinction coefficients of DN determine the high intensity of a 4f-luminescence (I_{lum}) of complex. The excitation spectra and luminescence spectra have been recorded on a spectrofluorimeter Cary Eclipse «Varian». Electronic absorption spectra have been recorded on a spectrophotometer

UV-2401 PC «Shimadzu». Influence of organic solvents, amount and nature of surfactants on I_{lum} of the complex has been investigated.

Complex Eu(III)–DN was proposed to use as the analytical form for the luminescence determination of DN. Calibration curve was linear over the concentration range of the dolutegravir sodium 0.44–13.2 $\mu\text{g/ml}$. The developed method was validated on the following parameters: specificity, linearity, precision, limit of quantification. The developed method can be recommended for the determination of DN in tablets.

Keywords: sensitized luminescence; europium; dolutegravir sodium; tablets.

References

1. Beltyukova S.V., Yegorova A.V., Teslyuk O.I. Ispolzovaniye f-f lyuminestsentsii ionov Eu (III) i Tb (III) v analize lekarstvennykh preparatov. *Ukr. khim. zhurn.* 2000, 66(10), 115–121 (in Russ.).
2. Antonovich V.P., Yegorova A.V., Aleksandrova D.I. Analiticheskaya khimiya v sozdanii, standartizatsii i kontrole kachestva lekarstvennykh sredstv. Glava «Fluorimetriya v issledovanii i kontrole kachestva lekarstvennykh preparatov». Pod red. chlena-korr. NAN Ukrainy V.P. Georgiyevskogo. Kharkov: *Izd-vo NTMT*, 2011. T. 1. S. 203–255 (in Russ.).
3. Rieutord A., Prognon P., Brion F., Mahuzier G. Liquid chromatographid determination using lanthanides as time - resolved luminescence probes for drugs and xenobiotics: advantages and limitations. *Analyst.* 1997, 122, 59R – 66R.
4. Purnima B.V., Kumari M.S., Ramu G., Reddy T., Ramachandran D. Validated reversed phase HPLC method for assay and degradation studies of lamivudine, abacavir sulphate and dolutegravir in combined dosage form. *Int. J. Educ. Appl. Res.* 2016, 6(2), 86–95.
5. Talari Kalpana, Tiruveedula Raja Rajeswari, Ramana Reddy Ganji. Development and Validation of Analytical Method for Determination of Dolutegravir Sodium, Lamivudine and Tenofovir Disoproxil Fumarate Using Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. *Der Pharma Chemica.* 2017, 9(8), 117–127.
6. Bhavar G.B., Pekamwar S.S., Aher K.B., Thorat R.S., Chaudhari S.R. High-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitative estimation of dolutegravir sodium in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Sci. Pharm.* 2016, 84(2), 305–320.
7. Dubey S., Duggirala M. Simultaneous estimation of lamivudine, abacavir and dolutegravir by UPLC method. *Int. J. App. Pharm.* 2018, 10(1), 46–52.
8. Masthanamma S.K., Sridhar T.A., Saidulu P. A novel UV-spectrophotometric method development and validation of dolutegravir in bulk and its laboratory synthetic mixture by using 8 M urea as hydrotropic solubilizing agent. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 2015, 7(4), 370–375.
9. Bhavar G.B., Aher K.B., Thorat R.S., Kakadsachin J., Pekamwar S.S. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of dolutegravir sodium in tablet dosage form. *Malaysian J. Anal. Sci.* 2015, 19(6), 1156–1163.
10. Mulak U.A., Narkhede S.P., Shinde M.P. Development of analytical method for in-vitro drug dissolution study of dolutegravir marketed formulation. *J. Pharm. Sci. Res.* 2018, 10(11), 2726–2730.