التقدير الطيفي لعقار الكلورومفينكول في المستحضرات الصيدلانية بوساطة تفاعل الازدواج التأكسدي وبتقنية القياس اللوني

جنان حسين محمد، سهيلة كاظم صيهود، سلمى سهام جميل، منى محمود خضير، عبد الله سامي مطلك، مهند زهير عبد الرحمن

وزارة العلوم والتكنلوجيا

e-mail: *Suhalia kadhim @yahoo.com*

Abstract

In this study the spectrophotometric method was developed for the determination of chloramphenicol in pharmaceutical. The method is based on the reaction between the drug with 4-amino antipyrine in the presence of sodium periodate as a oxidizing agent forming a rosy dye soluble in water has a maximum absorbance at 531.5nm.The linearity of Calibration Curve was at range(0.02-5) ppm, The method was applied successfully on the pharmaceutical preparations.

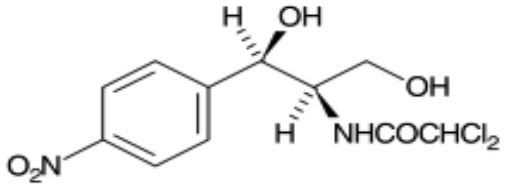
الخلاصة

يتضمن البحث تطوير طريقة طيفية للتقديرالكمي لمقادير ضئيلة من عقار الكلورومفينكول في المحاليل المائية باستخدام مطيافية الاشعة فوق البنفسجية والمرئية،تعتمد الطريقة على تفاعل الازدواج التاكسدي بين الكلورومفينكول وكاشف٤-امينوانتي بايرين بوجود العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم وفي وسط متعادل ، حيث تتكون صبغة وردية مستقرة وذائبة في الماء وتعطي اعلى امتصاص عند طول موجي ٥٣١ نانوميتر. ويشير الرسم البياني الخطي للامتصاص مقابل التركيز بان قانون بيير ينطبق ضمن المدى(٠,٠٢-٥) مايكروغم/مل من العقار، طبقت الطريقة على نماذج من ادوية الكلورومفينكول واعطت نتائج مطابقة لما مثبت على عبوة الدواء .

الكلمات المفتاحية: عقار الكلورومفينكول، تفاعل الازدواج التاكسدي، ٤-امينوانتي بايرين.

المقدمة

تعريف الدواء Chloramphenicol: صيغتة الجزيئية $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ **وزنة الجزيئي** 323.1 غرام / مول ، **درجة الانصهار** 150.5-151.5 درجة مئوية ، max=278nm ג و **الكلورومفينكول** [1]**هو**-2,2-dichloro N[(1R,2R)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(4- nitrophenyl)ethyl acetamide. **صيغته التركيبية** هي:



الكلورومفينكول هو مركب مضاد للجراثيم والميكروبات ، اشتق في الاصل من البكتريا النسيجيةVenezuele عزلت من قبل العالم David Gottlieb ، قدم كدواء في عام1949 [2] .

ويعتبر الكلورومفينكول مضادا حيويا واسع الطيف استعمل في الطب والطب البيطري كمضافات غذائية لتحسين النمو وهو فعال جدا كونه يستطيع التخلص من انواع عديدة من المجهريات ، فهو كابح لنمو وتكاثر الجراثيم الدقيقة جدا من خلال فعاليته في تثبيط التخليق الاحيائي للبروتين ومن ناحية ثانية فهو ايضا له تاثيرات سمية على الكائنات البشرية ،الفعل السمي للكلورومفينكول مشابه للمركبات المولدة للسرطان[3-5] .

يستعمل بشكل واسع كمطهر للوقاية من الامراض اوكعامل للعلاج الكيميائي لمكافحة الامراض ومن المحتمل ان يكون عامل مسبب لفقر الدم اللاننسجي الحالة التي لايستطيع نخاع العظم ان ينتج خلايا جديدة كافية لتجديد خلايا الدم ومن الممكن ان يكون الكلورومفينكول مادة مسرطنة في البشر لذلك تم حظر استخدامه في كل من الاتحاد الاوربي وكندا والولايات المتحدة الامريكية وعلى الرغم من هذا الحظرالانه لايزال يستخدم لعلاج منتجات الماكولات البحرية بسبب نشاطه الواسع وتوفره ورخص ثمنه[6-9].

استعمل على نطاق واسع لعلاج العدوى المهددة للحياة (الانفلونزا) والتهاب السحايا الطفولي وهو ايضا دواء فعال لحمى التيفوئيد[11,10] . واستعمل قي قطرات العين لعلاج التهابات العين السطحية والتهابات الملتحمة الجرثومي[2] .

العديد من الطرق التحليلية الحديثة استخدمت لتقدير الكلورومفينكول تضمنت الطرق الطيفية وتقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة(TLC) ، وكروموتوغرافيا السائل العالي الاداء(HPLC) ، وكروموتوغرافيا الغاز(GC) [11-13] .

كما استخدمت طريقة HPLC وUPLC لتقدير الكلورومفينكول في النماذج المائية ، المستحضرات الصيدلانية، مستحضرات التجميل ، الكريمات، الدم ،مسحوق gastric المستخدم للمعدة ، الادرار والأنسجة وسوائل النخاع الشوكي [14].

تعد تفاعلات الازدواج التأكسدي من التفاعلات العضوية المهمة التي لها تطبيقات واسعة في الكيمياء ، وتتضمن عملية الازدواج التأكسدي تفاعل مادتين عضويتين او اكثر بوجود عامل مؤكسد حيث تحدث عملية اكسدة لهذه المواد مكونة مركبات وسيطة تتفاعل مع بعضها لتكوين ناتج ملون يمكن تعيينه اما بالطرق الطيفية او البولاروغرافية او طرق الكروماتوغرافيا المختلفة واستخدمت هذه التفاعلات للتقدير الكمي للكثير من المركبات العضوية واللاعضوية المختلفة. ولأهمية هذه التفاعلات فقد درست الظروف المثلى من كواشف ازدواج وعوامل مؤكسدة واوساط تتم فيها التفاعلات التحليلية ودرجات حرارة مناسبة ومدى استقرارية النواتج وكذلك جميع المتداخلات العضوية واللاعضوية التي يمكن ان تؤثر في سير التفاعل وطبيعة النواتج للحصول على افضل النتائج التحليلية اضافة الى تفسير ميكانيكية هذه التفاعلات[16,15].

استخدمت تفاعلات الازدواج التاكسدي لتقدير العديد من المركبات الدوائية من اهمها تقدير Mesalazine في الصيغ الدوائية بتفاعله مع orcinol ، resorcinol ، cresol وبوجود hydrogen peroxide وhorseradish peroxidase لتعطي معقدات لها اقصى امتصاص عند 490nm ، 470nm ، 480nm على التوالي [17].

اقترحت طريقتين طيفية لتقدير diacerein في الصيغ الدوائية اعتمدت الاولى على اكسدة bezothiazolin-2-one 3-methyl hydrazone (MBTH)

بواسطة كلوريد الحديديك ثم ازدواجه مع الدواء في وسط حامضي فاعطى اقصى امتصاص عند 670nm ، اما الطريقة الثانية فاعتمدت على التفاعل مع Sulphanilic acid ونترات الصوديوم في وسط حامضي لتكوين ايون الديازونيوم الذي يزدوج مع diacerein لتكوين azodyes في وسط قاعدي فاعطى اقصى امتصاص عند 505nm [18].

استخدمت طريقة طيفية اعتمدت على تفاعل الازدواج التاكسدي لتقدير Oxymetazoline hydrochlorid بتفاعله مع 4- امينو انتي بايرين بوجود العامل المؤكسد بيرايودات البوتاسيوم في وسط قاعدي معطيا اقصى امتصاص عند 480nm [19] .

طورت طريقة طيفية طبقت لتفاعل الازدواج التأكسدي لتقدير Sildenafil Citrate اعتمدت على تفاعله مع 4-amino phenazone وبوجود بيرايودات البوتاسيوم معطيا اقصى امتصاص عند 526nm [20]. وصفت طريقة مطيافية الحقن الجرياني لتقدير Sulphonamides في المياه والنماذج البايولوجية اعتمدت الطريقة على تفاعل الازدواج التاكسدي 4-amino–N,N -diethylaniline مع ادوية Sulphonamide بوجود دايكرومات البوتاسيوم كعامل مؤكسد معطيا اقصى امتصاص عند 550nm [21].

الجزء العملي

الاجهزة المستعملة: مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية من النوع Shimadzu UV-Visible Spectrophotometer 1650 - Double beamالمزود بخلايا مصنوعة من السليكا ذات ممر ضوئي 1سم. ميزان حساس نوع Mettler Semimicro Balance Model HL.52

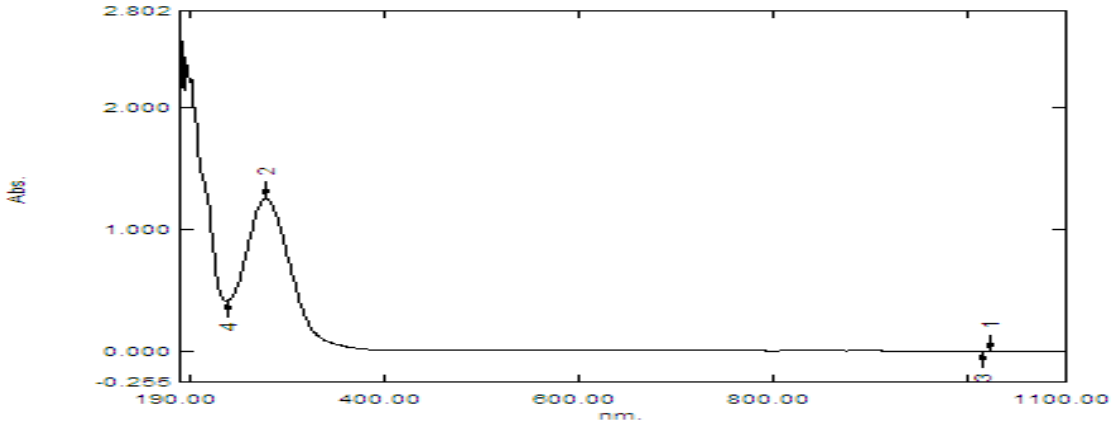
الكواشف والمواد الكيميائية المستعملة وتحضير المحاليل: حامض الهيدروكلوريك المركز(12 عياري)، مسحوق الخارصين(Zn) Poueler. تم الحصول على الادوية ومستحضراتها الصيدلانية من معامل الادوية في سامراء – العراق ومن مصادر تجارية اخرى وهذه المواد هي: **الكلورومفينكول النقي (نقاوة100%) الكبسولات(سامافينكول)** تحتوي الكبسولة الواحدة على 250 ملغم من الكلورومفينكول مع وجود مواد مضافة اخرى مثل سكر اللاكتوز اواي مادة مخففة خاملة مناسبة . **محلول الخزن الكلورومفينكول (1000 مايكروغرام/مل)** حضر باذابة 100 ملغم من الكلورومفنيكول النقي في حجم معين من الماء المقطر مع قليل من التسخين والتحريك ، وبعد تبريد المحلول اكمل الحجم الى100 مل باستعمال المذيب نفسه. **محلول بيرايودات الصوديوم ($NaIO_4$) بتراكيز(0.01- 0.05مولاري)** حضر باذابة وزن معين من $NaIO_4$ في حجم معين من الماء اللايوني وحسب التراكيز المعينة. **محلول 4-امينو انتي بايرين(4-AAP) بتراكيز(0.07،0.06،0.05,0.04,0.02مولاري)** حضر بإذابة وزن معين مـــن4 –امينوانتي بايرين في حجم معين من الماء اللايوني وحسب التراكيز المعينة. **محلول الكلورومفينكول المختزل(100 مايكروغرام/مل)** وضع 10مل من محلول الكلورومفينكول النقي ذو تركيز(1000 مايكروغم/مل) في قنينة حجمية سعة 100 مل واضيف اليه 200 ملغم من مسحوق الخارصين ،10 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ثم رج الخليط لمدة 15 دقيقة لاتمام عملية الاختزال وتم اكمال الحجم الى العلامة بالماء المقطر .

طريقة العمل المنتخبة لتحضير معقد الدواء باتباع تفاعل الازدواج التأكسدي: ينقل حجم (10) مل من محلول الكلورومفينكول المختزل (100 مايكروغرام/مل) المحضر في الفقرة السابقة الى قنينة حجمية سعة 250 مل يضاف الية حجم (2) مل من محلول(5×10^{-2} مولاري) من 4- امينوانتي بايرين و(30) مل من محلول (1×10^{-2} مولاري) من بيرايودات الصوديوم ، وتم اكمال الحجم الى العلامة بالماء المقطر حيث يظهر اللون الوردي للمعقد المتكون ويتم رسم طيف المعقد المتكون مقابل المحلول الصوري .

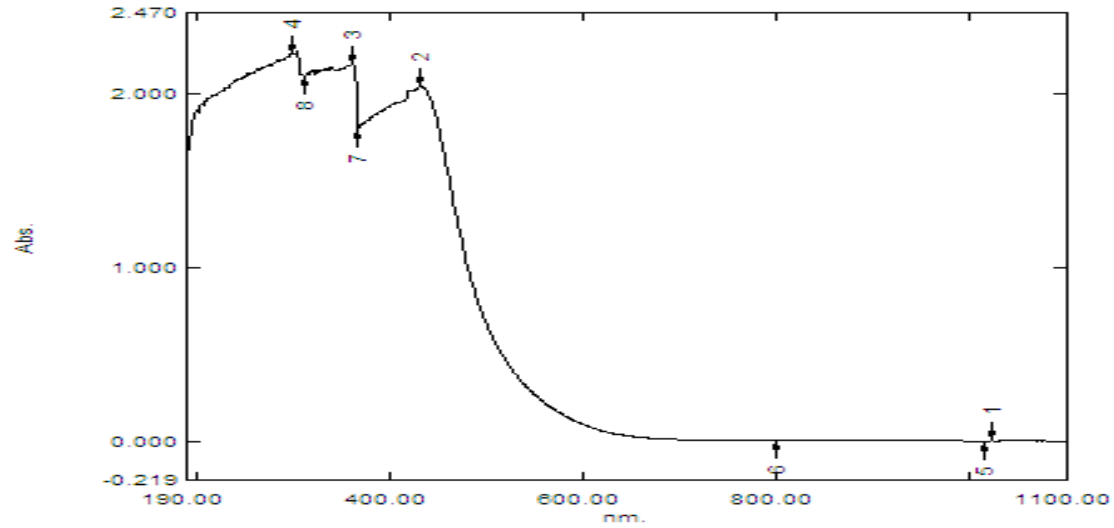
تحضير المحلول الصوري: حضر المحلول الصوري بالطريقة السابقة نفسها فيما عدا احتوائه على محلول الكلورومفينكول حيث يتم اخذ حجم(2) مل من محلول(5×10^{-2} مولاري) من 4- امينوانتي بايرين و(3) مل من محلول (1×10^{-2} مولاري) من بيرايودات الصوديوم ، ويخفف المحلول الى حجم 250 مل بالماء المقطر.

النتائج والمناقشة

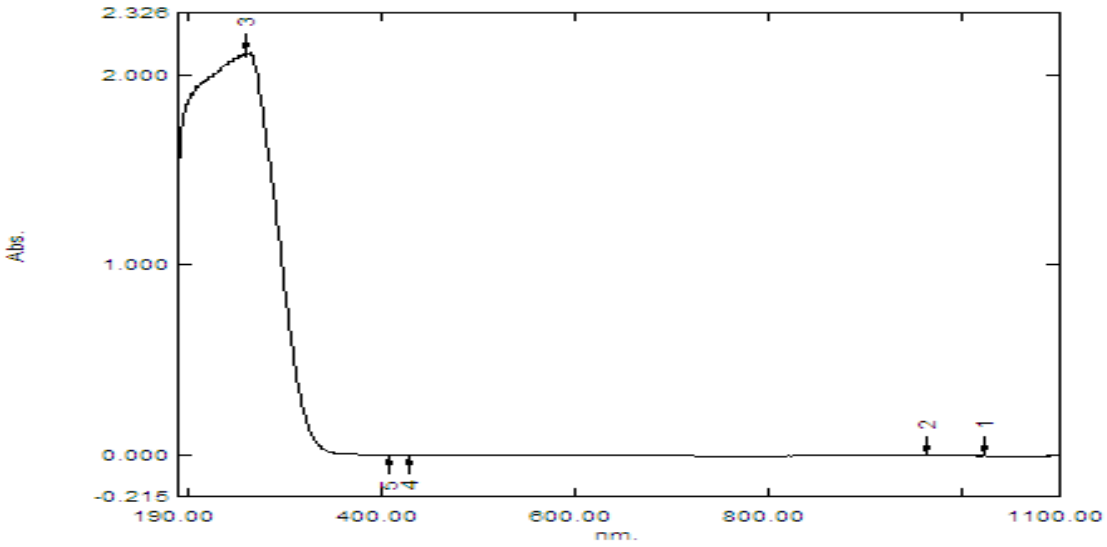
تم في هذا البحث تقدير عقارالكلورومفينكول عن طريق تكوين معقد الازدواج التاكسدي اذ وجد عند تخفيف المحلول المائي للكلورومفينكول بمحلول4- امينو انتي بايرين وبوجود العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم تكون صبغة وردية لها اقصى امتصاص عند 531 = λmax و لذا تم استغلال هذا التفاعل من الناحية التحليلية باستعمال مطيافية الامتصاص الجزيئي.يبين **الشكل 1** طيف المركب الدوائي الكلورومفينكول ضمن المدى(190- 1100)نانومترا.



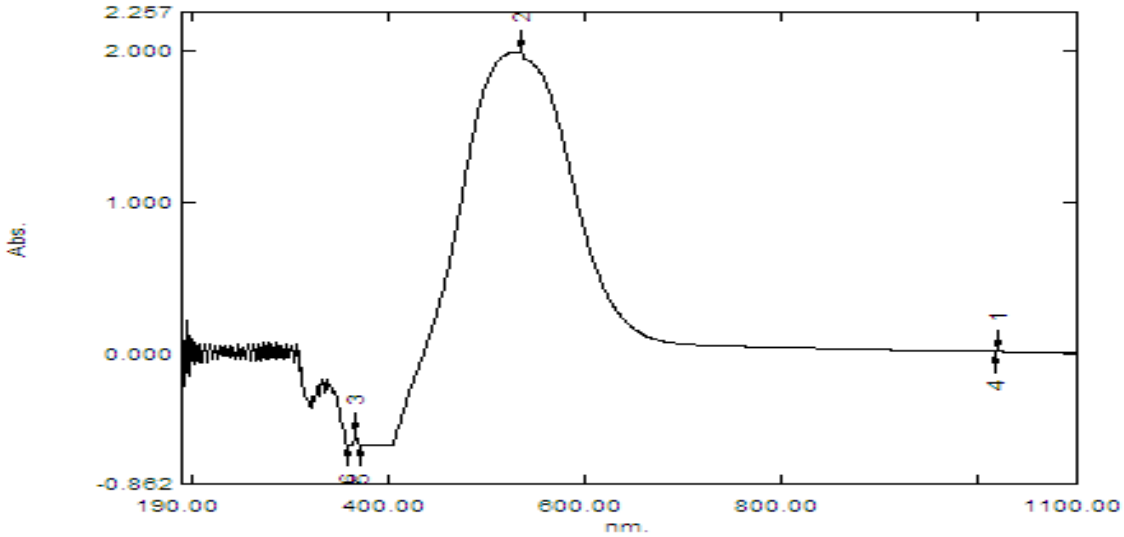
شكل 1: طيف المركب الدوائي للكلورومفينكول (تركيز 100 جزء بالمليون)



شكل 2: طيف محلول 4-امينو انتي بايرين (تركيز 5×10^{-2} مولاري)



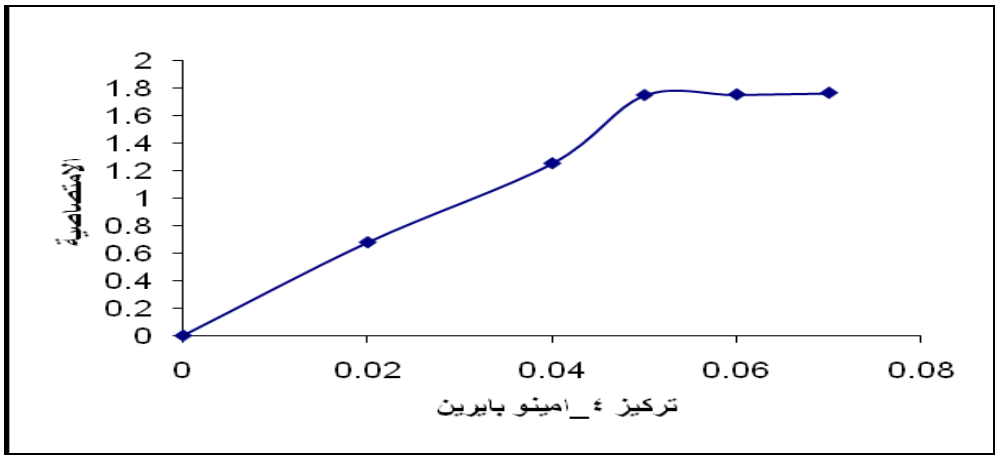
شكل3: طيف محلول العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم (تركيز 1×10^{-2} مولاري)



شكل 4 :طيف معقد الازدواج التاكسدي للكلورومفينكول المكون من (10) مل من محلول الكلورومفينكول المختزل (100 مايكروغرام/مل) + 2 مل من محلول(5×10^{-2} مولاري) 4- امينوانتي بايرين+3مل من محلول (1×10^{-2} مولاري) بيرايودات الصوديوم

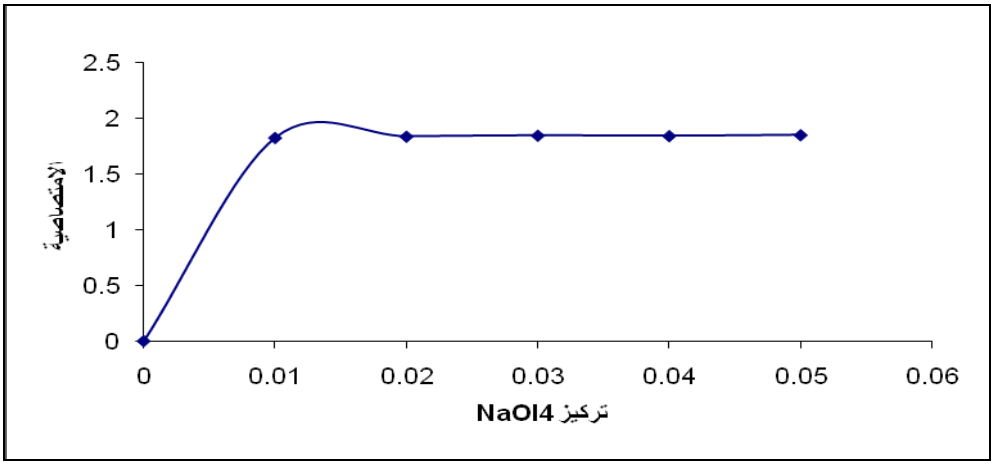
دراسة ظروف التفاعل لمعقد الازدواج التاكسدي لمركب Chloramphenicol: تم دراسة تاثير الظروف المختلفة على شدة الامتصاص للصبغة المتكونة وتم ايجاد الظروف المثلى للتفاعل .

دراسة تأثير تغير تركيز المادة الكاشفة 4- أمينو انتي بايرين: عندما اضيفت تراكيز مختلفة من المادة الكاشفة 4- امينو انتي بايرين(0.02,0.04,0.05,0.06,0.07) مولاري الى عقار الكلورومفينكول واضيف اليه العامل المؤكسد $NaIO_4$ ومن ثم الماء المقطر ، اعطى افضل شدة امتصاص عند التركيز(5×10^{-2} مولاري) كما مبين في **الشكل5**.



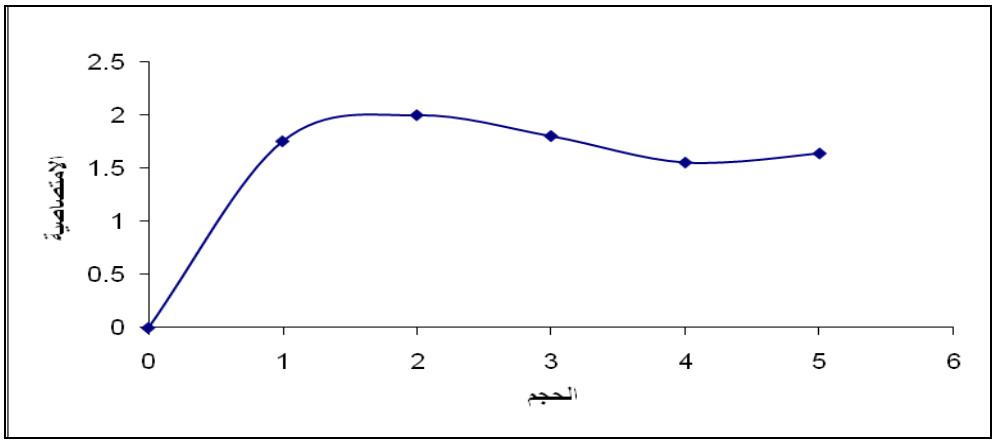
شكل 5: تأثير تغير تركيز 4- أمينو انتي بايرين

دراسة تأثير تغير تركيز المادة المؤكسدة بيرايودات الصوديوم: عندما اضيفت تراكيز مختلفة(0.01,0.02,0.04,0.05) مولاري من المادة المؤكسد بيرايودات الصوديوم $NaIO_4$ وجد ان افضل شدة امتصاص تعطى عند تركيز(1×10^{-2} مولاري) كما مبين **بالشكل 6**.



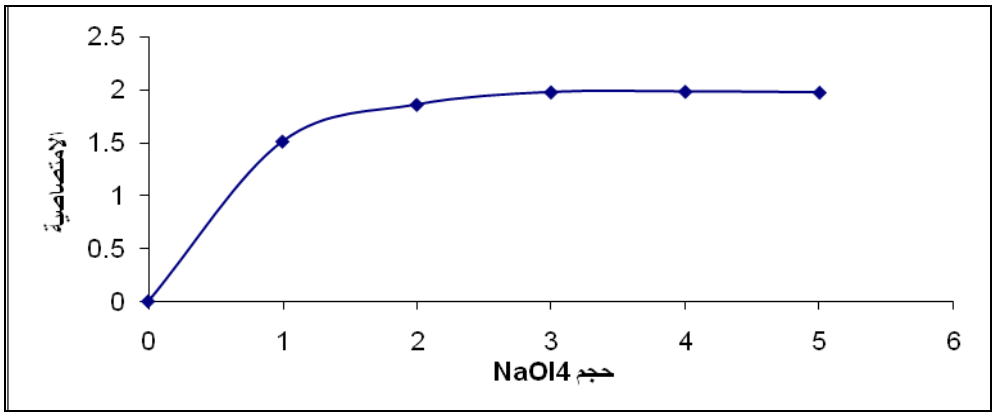
شكل 6: تأثير تغير تركيز المادة المؤكسدة بيرايودات الصوديوم

دراسة تأثير تغير حجم محلول 4-امينو انتي بايرين: يبين **الشكل7** قيم ممتصية المعقد الناتج من تفاعل الدواء مع 4- امينو انتي بايرين بوجود العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم مع تغيير حجم محلول 4- امينو انتي بايرين من (1-5) مل ذي التركيز(0.05) مولاري، وجد ان افضل حجم هو 2 مل .



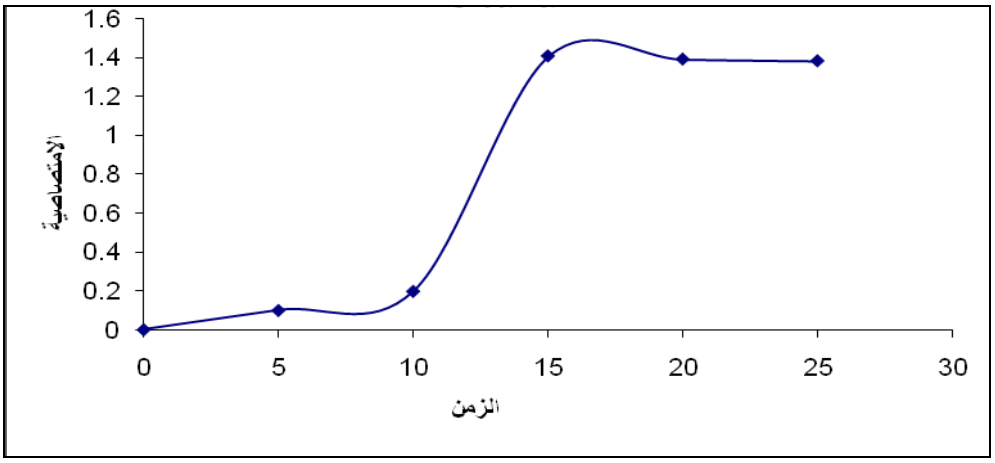
شكل 7 :تأثير تغير حجم محلول 4-امينو انتي بايرين

درسة تأثير تغير حجم محلول بيرأيودات الصوديوم: يبين **الشكل8** قيم ممتصية المعقد الناتج من تفاعل الدواء مع 4- امينو انتي بايرين بوجود العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم مع تغيير حجم محلول بيرايودات الصوديوم بين(5-1) مل ذي التركيز(0.01) مولاري ، وجد ان افضل حجم هو3 مل.



شكل 8: تاثير تغير حجم محلول بيرايودات الصوديوم

دراسة تأثير زمن التفاعل:تصل اعلى شدة امتصاص للمعقد المتكون بعد مضي(15) دقيقة كما مبين **بالشكل 9** .



شكل 9: تأثير زمن التفاعل على امتصاصية المعقد المتكون

دراسة تأثير تسلسل الإضافات: ان لتسلسل الاضافات للمحاليل المستعملة تاثير كبير على شدة الامتصاص واستقرارية المعقد الملون يبين **الجدول 1** تاثيرتسلسل الاضافات في شدة الامتصاص اذ وجد ان الترتيب التالي الذي اتبع في التجارب اللاحقة هو الافضل محلول الكلورومفينكول المختزل + ٤- امينو انتي بايرين + العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم .

الجدول 1: تأثير تسلسل الإضافات في شدة امتصاص المعقد المتكون

تسلسل الاضافات	امتصاصية المعقد المتكون
A+B+C	1.463
A+C+B	0.657
B+A+C	0.439

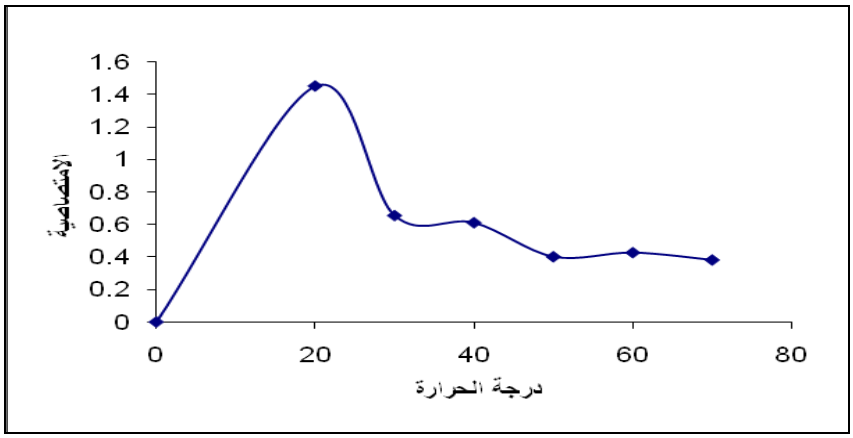
حيث يمثل :

A = محلول الكلورومفينكول المختزل

B = محلول ٤-امينو انتي بايرين

C= محلول بيرايودات الصوديوم

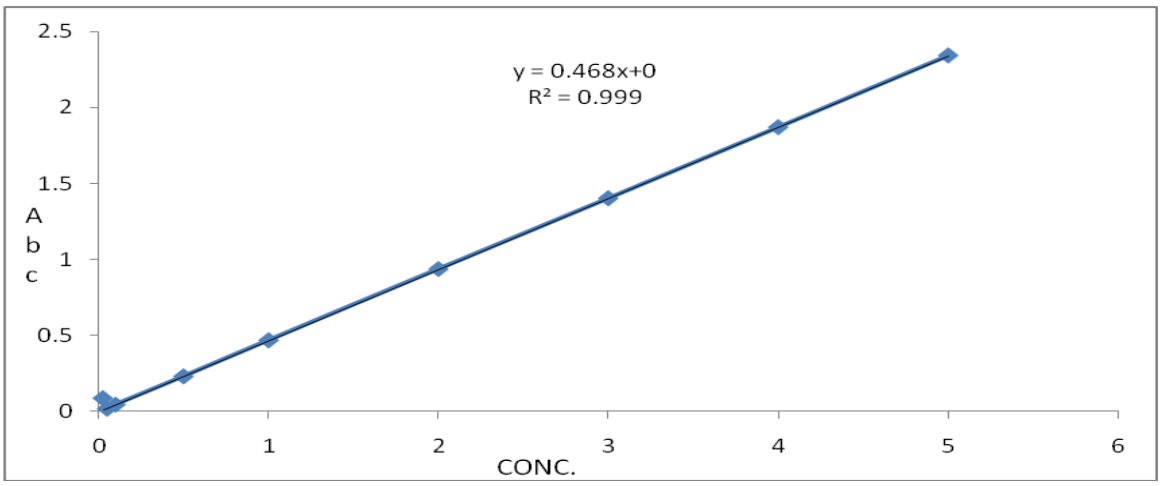
تأثير درجة الحرارة على امتصاص المعقد المتكون: تم دراسة تاثير درجة الحرارة على تفاعل الاختزال باوقات زمنية مختلفة واستخدمت ظروف التجربة السابقة في هذه الدراسة ، تم الحصول على النتائج المبينة في **الشكل 10** والتي يتضح منها ان الامتصاص بلغ اقصاه عند درجة حرارة الغرفة 20 °م ويقل بازدياد درجة الحرارة .



شكل10: تأثير درجة الحرارة على امتصاص المعقد المتكون

طريقة العمل والمنحني القياسي: تم اعداد المنحني من رسم قيم الامنصاص مقابل تراكيز المحاليل القياسية للكلورومفينكول الخام النقي ويمكن جعله مرجعا لايجاد تراكيز مجهولة من الكلورومفينكول النقي والموجود بشكل مستحضرات صيدلانية وقد حضر بالطريقة الآتية:

وضع 10 مل من تركيز (1000 مايكروغرام/مل) من محلول الكلورومفينكول النقي في قنينة حجمية سعة 100 مل واضيف اليه 2000 ملغم من مسحوق الخارصين ، 10مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ورج الخليط لمدة 15 دقيقة لكي يتم الاختزال وتم اكمال الحجم الى العلامة بالماء المقطر، ومنه حضرت تراكيز متدرجة(5- 0.02) مايكروغم/مل لعمل المنحني القياسي ثم اضيفت لها حجوم 3 مل من(0.01 مولاري) من المادة المؤكسدة بيرايودات الصوديوم و2 مل من4- امينو انتي بايرين (0.05 مولاري) واكمل الحجم الى 10 مل بالماء اللايوني ورسمت قيم الامتصاص مقابل التركيز كما في **الشكل11** .



الشكل11: منحني المعايرة المباشر للكلورومفينكول النقي

المعطيات التحليلية الاحصائية: يبين **الجدول 2** مدى التراكيز التي ينطبق عليها قانون بيير على وفق منحني المعايرة المباشروحد الكشف لتعيين المركب بعد تكوين معقد الازدواج التأكسدي .

الجدول 2: خطية التركيز وحدود الكشف ومعادلة الخط المستقيم ومعامل الارتباط لتعيين الكلورومفينكول بعد تكوين معقد الازدواج التاكسدي .

Name of drug	Linearity (µg/ml)	D.L (µg/ml)	Regr.eq Y=Bx+A	Corr.coef. (r)
chloramphenicol	**0.025-5**	**0.02**	**Y=0.468X+0**	**0.999**

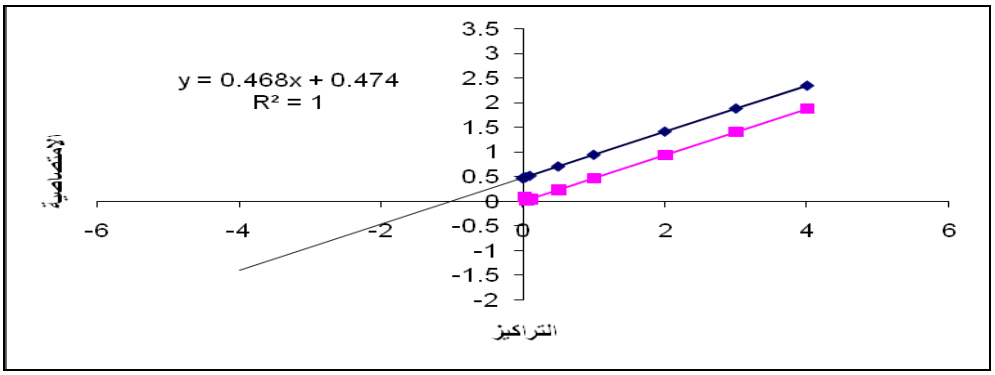
يبين **الجدول 3** الانحراف القياسي النسبي المئوي لتعيين المركب والاسترادادية والخطا النسبي المئوي.

الجدول 3: الانحراف القياسي النسبي المئوي والاسترادادية للدواء

Name of drug	Amount Taken (µg/ml)	Amount found (µg/ml)	%Reco.	%Erel.	%RSD (n=3)
	1	1.01	101	1	1.03
chloramphenicol	2	2.05	102.5	2.5	0.24
	3	3.06	102	2	0.15

تعيين المركب الدوائي في بعض مستحضراته الصيدلانية:

تقدير الكلورومفينكول في الكبسولات (سامافينكول): تم اتباع اسلوبين لتعيين المركب في مستحضره الصيدلاني سامافينكول ، الاسلوب الاول قياس الامتصاصية للمحلول الناتج بتراكيز عدة من المستحضر واستخراج التركيز من منحني المعايرة المباشر. اما الاسلوب الاخر فهو اضافات القياس ويتضمن قياس الامتصاصية للمعقد الناتج بتراكيزعديدة من الدواء بعد اضافة تركيز معين من المستحضر واستخراج التركيز ويبين **الشكل 12** منحني المعايرة لتقدير الدواء في بعض مستحضراته الصيدلانية بالطريقة المباشرة وبطريقة اضافات القياس بعد تفاعلها لتكوين المعقد وتقديرها بمطيافية الامتصاص الجزيئي .



شكل 12: منحني المعايرة واضافات القياس لتعيينchloramphenicol في مستحضره الكبسول لتكوين معقد الازدواج التاكسدي

ويلاحظ ان ميل منحني اضافات القياس للدواء موازٍ لمنحني المعايرة المباشر وهذه اشارة الى عدم وجود تداخلات منشا .

ويبين **الجدول4** نتائج تعيين المركب طيفيا في مستحضره الصيدلاني بتفاعل الازدواج التاكسدي بالأسلوب المباشر وإضافات القياس .ومن خلال **الجدول5** نلاحظ معادلة الخط المستقيم ومعامل الارتباط وحد الكشف والاستعادية.

الجدول4: نتائج تعيين الدواء طيفيا في مستحضره الصيدلاني بتفاعل الازدواج التاكسدي بالاسلوب المباشرواضافات القياس

Name of drug	Type preparation	Stated Concentration (µg/ml)	Found Direct calb.(µg/ml)	%Eerl	Found st.add.calb (µg/ml)	%Erel
chloramphenicol	**capsule**	**1**	**1.03**	**3**	**1.02**	**2**

الجدول5: معادلة الخط المستقيم ومعامل الارتباط وحد الكشف والاستعادية

Name of drug	Reger.eq Y=Bx+A	Corr. coef. (r)	%Recov.
chloramphenicol	**Y=0.468X+0.474**	**1**	**102**

الاستنتاجات

تم استثمار تفاعل الازدواج التاكسدي بطريقة تتصف بالدقة والحساسية العالية والسرعة وحدود الكشف الواطئة وبمديات عالية من الاطوال الموجية ومدى واسع من التراكيز بمطيافية الامتصاص الجزيئي (مطيافية الاشعة فوق البنفسجية والمرئية) . كما تم تطبيقه على المستحضرات الصيدلانية وكانت النتائج جيدة وذات حساسية عالية ومطابقة للتركيز المثبت على عبوة المستحضر .

Reference

1) Brjtjsh pharmacopoeia on CD-Rom.,srdEd. Copyright by system Sjmulation**.(2000).**

2) AI-Rimawi F and Kharoaf M. [2011]. *Chromatography Research* .

3) Abd EI-Maboud I, Mohamed Hesham S, and Maher E. [2006]. *Thai J. Pharm. Sci.*30, 63-81.

4) Urszula Kuchrska and Joanna Leszczynska.Chem.Listy, **(2000)**, 94,190-194.

5) Linling Wg, Hai Y, Chunwei Z, Yulin M, and Xiaohua L. [2008]. *J. Analytica Acta*. 619, 54-58.

6) Sorensen L K, Elbek T H, Hansen H. [2003]. *J. Assoc. Anal. Chem.* 86, 703–706.

7) Park I S and Kim N.[2006]. *J. Anal. Chem. Acta*. 578, 19-24.

8) Shakila R J, Vyla S A, Kumar S, Jeyasekaran G, and Jasmine G I. [2006]. *Food Microbiol.* 23, 47–51.

9) A.P. Pfenning, J.E. Roybal, H.S. Rupp, S.B. Turnipseed, S.A. Gonzales, J.A.Hurlbut; *J. AOAC Int.,(* 2000), 83, 26-30.

10) Arnold L S, Alice L E, Toni K, William C T, Kevin N, Allan W, and William N H. [2007]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51, 8, 2820.

11) Agui A G, Yanez-Sedno P, and Pingarron J M. [2002]. *J. Analytica Chimica Acta*. 461, 65-73.

12) Nia K and Mia R. [2012]. *J. International Current Pharmaceutical.* 2, 1, 7-10.

13) Abd El-Maboud I, Mohamed Hesham S, and Maher E. [2006]. *Thai J. Pharm. Sci.* 3063,81.

14) Syed G M, Urooj F, and Rahat S. [2012]. *J. Chemistry Central.* 6,7.

15) Yuan G and Yao Y. [1994]. *J. Am. Chem. Soc.* 116,8384 .

16) Kimihisa Y and Shintaro K. [1996]. *J. Org. Chem.* 61.

17) Shaik S, Bandakavisita R, Chandra B S, and Chiang M. [2011]. *J. Sci.* 38, 4, 551-559.

18) Vijaya G R, Triveni K, Divya K, Lakshmi N, and Venu Gopal G. [2009]. *J. Pharma Chemical.* 1, 2, 285-291.

19) Safaa A Z. [2011]. *J. Sci.* 22, 4, 97-108.

20) Safwan A, Khalil A. [2008]. *Arabian J. Chem.* 1, 2, 137-144.

21) Yousif J A. [2009]. *J. Zankoy Sulaimani.* 12, 1, 67-76.