

Azocoupling Reaction of Cephalosporin Antibiotics with 8-Hydroxyquinoline and Its Application in the Analysis of Medicinal Products

O. Kostiv*, O. Korkuna, M. Ornat

Ivan Franko National University of L'viv, Department of Analytical Chemistry, 6 Kyryla i Mephodia Str., L'viv, Ukraine, 79005; *e-mail: oksana.kostiw@lnu.edu.ua

Received: October 23, 2020; Accepted: January 16, 2021

DOI: 10.17721/moca.2020.144-155

Methods for spectrophotometric determination of cephalosporin antibiotics ceftazidime and ceftriaxone using azocoupling reactions with 8-hydroxyquinoline have been developed. Optimal conditions for the diazotization of antibiotics in hydrochloric acid ($C_{HCl} = 12\text{ M}$) and subsequent azocoupling with 8-hydroxyquinoline in alkaline medium (0.16 M NaOH in the final volume) were established. The of azocoupling products of violet and light red colors are formed, which are characterized by absorption maxima at 553 nm ($\epsilon_{553} = 6.31 \cdot 10^3\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and 550 nm ($\epsilon_{550} = 1.45 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) for ceftazidime and ceftriaxone, respectively. Stoichiometric ratios of the azo compounds components were determined using continuous variations methods and in both cases are 1:1. Sensitive methods of spectrophotometric determination of ceftazidime ($LOD = 1.81 \cdot 10^{-6}\text{ M}$) and ceftriaxone ($LOD = 5.92 \cdot 10^{-7}\text{ M}$) have been developed. The selectivity of cephalosporin antibiotics spectrophotometric determination in the presence of auxiliary substance (sodium carbonate) has been investigated. The elaborated methods has been approved during the analyses of model solutions and the single component drug. The recommended procedure is well suited for the ceftazidime and ceftriaxone assay in medicine to assure high standards of quality control.

Keywords: cephalosporin antibiotics, ceftazidime, ceftriaxone, 8-hydroxyquinoline, diazotization, azocoupling, spectrophotometry, drugs

Реакція азосполучення цефалоспоринових антибіотиків з 8-оксихіноліном та її застосування в аналізі лікарських засобів

О.І. Костів*, О.Я. Коркуна, М.П. Орнат

Львівський національний університет імені Івана Франка, кафедра аналітичної хімії, вул. Кирила і Мефодія, 8, Львів, Україна, 79005; *e-mail: oksana.kostiw@lnu.edu.ua

Надійшла: 23 жовтня 2020 р; Прийнята: 16 січня 2021 р

DOI: 10.17721/moca.2020.144-155

Розроблено методики спектрофотометричного визначення цефалоспоринових антибіотиків цефтазидиму та цефтріаксону із використанням реакції азосполучення з 8-оксихіноліном. Встановлено оптимальні умови діазотування антибіотиків в середовищі хлоридної кислоти ($C_{HCl} = 12\text{ M}$) та наступного азосполучення з 8-оксихіноліном у лужному середовищі (0.16 M NaOH в кінцевому об'ємі). Утворенні продукти азосполучення фіолетового та світло червоного кольорів, які характеризуються максимумами світлопоглинання при 553 nm ($\epsilon_{553} = 6.31 \cdot 10^3\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) та 550 nm ($\epsilon_{550} = 1.45 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) для цефтазидиму та цефтріаксону відповідно. Співвідношення компонентів досліджено методом ізомлярних серій та у двох випадках воно становить 1:1. Розроблено чутливі методики спектрофотометричного визначення цефтазидиму ($C_{min} = 1.81 \cdot 10^{-6}\text{ M}$) та цефтріаксону ($C_{min} = 5.92 \cdot 10^{-7}\text{ M}$). Інтервал визначуваних вмістів охоплює два концентраційних порядки. Правильність методик перевірено на модельних розчинах способом "зведено – знайдено". Методики апробовано при аналізі однокомпонентних лікарських препаратів – порошків для розчину для ін'єкцій.

Ключові слова: цефалоспоринові антибіотики, цефтазидим, цефтріаксон, 8-оксихінолін, діазотування, азосполучення, спектрофотометрія, лікарські препарати

Цефалоспори́ни – ряд природних та напів-синтетичних β -лактамних антибіотиків, які є біциклічними сполуками, що складаються з β -лактамного і дигідротіазинового кілець, які утворюють 7-аміноцефалоспоринову кислоту,

яка в свою чергу, є спільною для молекули всіх цефалоспори́нів. Перші представники цефалоспори́нів з'явилися понад 40 років тому і на сьогоднішній день займають одне з провідних місць у клінічній практиці. Антибіотики

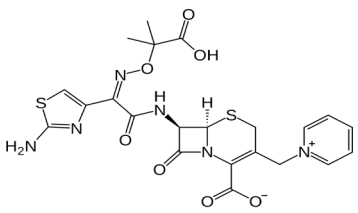
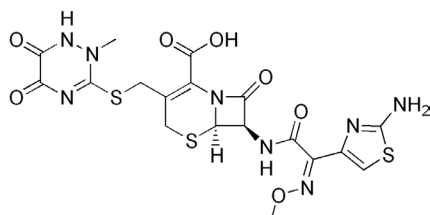
цефалоспоринового ряду застосовуються при найтяжчих формах інфекційних процесів. Із понад 60 існуючих у світі оригінальних цефалоспоринових в Україні зареєстровано лише 16 препаратів. Цефтріаксон (ЦЕФТР) та цефтазидим (ЦЕФТ) (табл. 1) відносяться до напівсинтетичних антибіотиків групи β -лактамів, цефалоспоринових третього покоління, мають бактерицидний ефект, механізм дії пов'язаний з пригніченням активності ферменту транспептидази, порушенням біосинтезу пептидоглікану клітинної стінки мікроорганізмів.

Згідно Державної Фармакопеї України (ДФУ) для оцінки якості лікарських та ветеринарних препаратів на основі цефалоспоринових антибіотиків зокрема цефтріаксону та цефтазидиму рекомендують використовувати високоефективну рідинну хроматографію [3,4]. Однак в літературі більшість наведених методів аналізу цефалоспоринових антибіотиків (ЦА) – спектрофотометричні (СФ). Відомі СФ методики визначення цефтазидиму за власним поглинанням в УФ ділянці спектру при $\lambda_{\max} = 261$ нм [5], $\lambda_{\max} = 255.8$ нм [6], $\lambda_{\max} = 266$ нм [7], коли як розчинники відповідно використовували 0.1 М хлоридну кислоту в першому випадку, воду та суміш метанолу з водою в двох інших. Цефтріаксон визначають в присутності продуктів його лужного гідролізу отримуючи спектр світлопоглинання в діапазоні 230–265 нм [8] чи у присутності фосфатного буферного розчину за рН 7.4 за $\lambda_{\max} = 340$ нм та 360 нм [9]. Для СФ визначення ЦА у видимій ділянці спектру використовують ряд кольорових реакцій, які можна класифікувати наступним чином [8]: комплексоутворення з іонами металів; комплексоутворення з перенесенням заряду; редокс реакції; гідроліз з наступною реакцією з кольоровими реагентами; утворення іонних пар та азосполучення з фенольними сполуками.

Реакція азосполучення в аналізі ЦА широко використовується для їх СФ визначення. Однак більшість запропонованих на сьогоднішній день методик є суперечливими або пропонують використання малодоступних органічних реагентів і досить часто є довготривалими у виконанні. Зокрема, деякі автори у своїх дослідженнях не враховували здатності цефтріаксону та цефтазидиму вступати у реакцію азосполучення між собою у кислому середовищі [10], а отримані аналітичні сигнали хибно пов'язували з утворенням нових сполук, зокрема азосполуки ЦЕФТР із 2-нафтолом [11]. З іншого боку дослідникам вдалося подолати цю проблему при взаємодії з 1-нафтолом [12] шляхом зміни умов діазотування самого антибіотика цефтазидиму використовуючи середовище концентрованої хлоридної кислоти. Для цефтріаксону таких досліджень не проводилось.

Перспективним реагентом, як азосклада для реакції азосполучення із ЦА є відомий аналітичний реагент 8-оксихінолін, який є фенольною сполукою. Здатність 8-оксихіноліну утворювати з багатьма катіонами металів (біля 40 елементів періодичної системи) малорозчинні у водних розчинах (ацетатної кислоти, аміаку та ін.) кристалічні внутрішньо-комплексні солі (хелати), наприклад $Mg(C_9H_6ON)_2$, $Al(C_9H_6ON)_3$, використовується на практиці для визначення і розділення ряду металів (Al, Zn, Cd, Mg та ін.). 8-оксихінолін використовують для виявлення літію та алюмінію люмінісцентним методом. Комплекси 8-оксихіноліну з Al, B, Be, Ga, In, Li, Mg, Sn, Zn використовуються для виготовлення органічних світлодіодів (OLED). Варіації замісників в хіноліновому циклі дозволяють отримувати матеріали з різними люмінісцентними властивостями [13]. 8-Оксихінолін використовують для дезінфекції рук, обробки ран, виразок,

Таблиця 1. Фізико-хімічні характеристики цефтазидиму [1] та цефтріаксону [2].

Формула	Назва	Характеристики
CAS № 72558-82-8 	Цефтазидим, (піридин 1-[[7-[[2-аміно-4-тіазоліл] [(1-карбокси-1-метилетокси) іміно] ацетил] аміно]-2-карбокси-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло [4.2.0] окт-2-ен-3-ил] метил)-, гідроксид внутрішня сіль пентагідрат [6R-[бальфа, 7бета (Z)]].	Порошок білого кольору із специфічним запахом. $M = 546.58$ г/моль; $pK_{a1} = 1.9$; $pK_{a2} = 2.7$; $pK_{a3} = 4.1$. Розчинність: у воді 5 мг/мл, у етанолі 1 мг/мл, малорозчинний в ацетонітрилі.
CAS · 73384-59-5 	Цефтріаксон, (Z)-(6R,7R)-7-[2-2-аміно-1,3-тіазол-4-іл]-2-(метоксиіміно) ацетамідо]-8-оксо-3-[(2,5-дигідро-2-метил-6-оксидо-5-оксо-1,2,4-триазин-3-іл) тіометил]-5-тіа-1-азабі-цикло[4.2.0]окт -2-ене-2-карбо-кислату динатрієва сіль.	Білий або світло-жовтий кристалічний порошок, без запаху. $M = 554.53$ г/моль; $pK_{a1} = 3.0$; $pK_{a2} = 3.2$; $pK_{a3} = 4.1$. Розчинність: у воді 40 мг/мл, у етанолі 1 мг/мл.

мікозів. Для обробки хірургічного інструменту непридатний, тому що взаємодіє з металом. Активний відносно різних видів дерматофітів (роду трихофітон, мікроспорум, дріжджоподібних грибів, грибів роду пеніциліум і аспергілюс та ін.). Відносно малотоксичний, не проявляє місцевої подразнюючої дії і не інактивується білками тканин [14]. Детальніша інформація про 8-оксихінолін наведена в табл. 2.

Експериментально частина

Розчин цефтазидиму фірми Sigma-Aldrich (вміст в перерахунку на безводний 88.2%) та цефтріаксону (USP Reference Standards, Швейцарія, вміст основної речовини не менше 99%) готували розчиненням точної наважки відповідних реактивів у дистильованій воді. Розчини зберігали при кімнатній температурі в захищеному від світла місці.

Вихідний стандартний розчин 8-оксихіноліну готували розчиненням точної наважки реагенту фірми Sigma-Aldrich кваліфікації «ч.д.а.» (не менше 99%) у 5 М чи 4 М розчині натрій гідроксиду безпосередньо перед виконанням експерименту та зберігали в темному прохолодному місці, оскільки розчини 8-Окс окиснюються і темніють на світлі.

Розчин натрій нітриту та сульфамінової кислоти, готували розчиненням точної наважки реактивів кваліфікації «ч.д.а.» у дистильованій воді. Робочі розчини хлоридної кислоти готували розведенням концентрованої кислоти кваліфікації «х.ч.» у дистильованій воді. Розчини натрій гідроксиду готували розчиненням реактиву кваліфікації «х.ч.» у дистильованій воді.

Вимірювання світлопоглинання проводили на скануючому спектрофотометрі SPECORD M-40 (Carl ZeissJena, Німеччина) в кюветках $l = 1$ см.

Методика визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-оксихіноліном. До мірної колби об'ємом 25 мл додають аліквоту досліджуваного

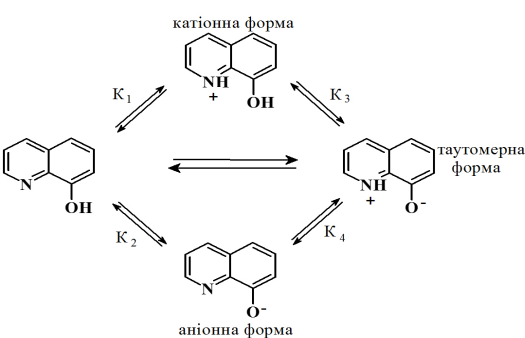
розчину відповідного цефалоспорино в межах 3.8–191.3 мкг/мл (ЦЕФТ); 0.35–94.28 мкг/мл (ЦЕФТР), вносять 1.0 мл 12.0 М НСІ та 1.5 мл 0.06 М розчину NaNO_2 , додають 1.5 мл 0.09 М розчину сульфамінової кислоти (у випадку ЦЕФТ), додають 5 мл розчину 8-оксихіноліну приготованого на 4.0 М натрій гідроксиді $C_{8\text{-Окс}} = 1.25 \cdot 10^{-2}$ М (ЦЕФТ); $C_{8\text{-Окс}} = 3.0 \cdot 10^{-2}$ М (ЦЕФТР). Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять при $\lambda_{\text{ЦЕФТ}} = 553$ нм, $\lambda_{\text{ЦЕФТР}} = 550$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефалоспоринів знаходять способом порівняння, або за допомогою градувального графіка.

Методика прободіготовки порошку для визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР. Наважку порошку, що містить 1000 мг ЦЕФТ (ЦЕФТР) згідно з номінальним вмістом у препараті вносять до мірної колби об'ємом 100 мл, додають 50 мл дистильованої води, перемішують впродовж 10 хв та доводять вміст колби до мітки тим же розчинником (вихідний розчин). Робочий розчин ЦЕФТ (ЦЕФТР) готують розведенням вихідного розчину в 10 разів, для чого 5 мл отриманого розчину вносять у мірну колбу місткістю 50 мл, об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою і перемішують. Робочий розчин містить номінально 100 мг/мл цефтазидиму (цефтріаксону).

Результати та їх обговорення

У роботі вивчено умови діазотування двох цефалоспоринових антибіотиків цефтазидиму і цефтріаксону та досліджено умови подальшого їх азосполучення з фенольним реагентом 8-оксихіноліном. Оскільки із літератури відомо, що діазосоли ЦА здатні азосполучатися між собою [10, 16], то важливим було дослідити, як виглядуть спектри світлопоглинання розчинів цефалоспоринів та їх діазосолей у кислому та лужному середовищі в умовах експерименту.

Таблиця 2. Деякі характеристики та рівноваги таутомерних форм 8-оксихіноліну викликаних переміщенням протону у водних розчинах [15].

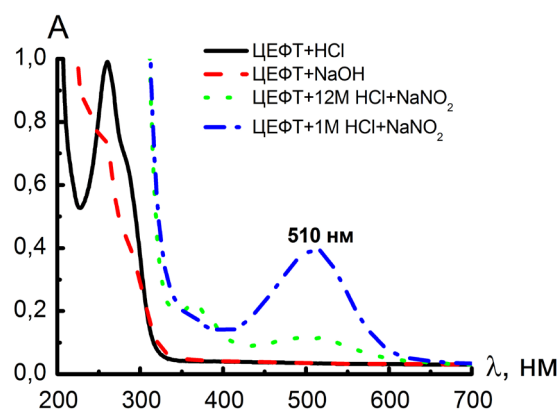
Реагент	Деякі характеристики
8-оксихінолін, CAS № 148-24-3  катионна форма таутомерна форма аніонна форма	Світло-жовті кристали, погано розчинні у воді (мінімальна розчинність 0.53 г/л), добре розчинні в лугах, кислотах, органічних розчинниках (в хлороформі 382 г/л, в бензені 319 г/л, в ізоамілацетаті 174 г/л, етиловому етері 96 г/л, ізоаміловому спирті 56.6 г/л). $T_{\text{пл.}} = 75-76^\circ\text{C}$, $T_{\text{кип.}} = 267^\circ\text{C}$, $M = 145.16$ г/моль; $\text{p}K_{\text{a1}}(\text{H}_2\text{R}^+) = 5.1$, $\text{p}K_{\text{a2}}(\text{HR}^-) = 9.9$, $\text{p}K_{\text{a3}} = 6.8$, $\text{p}K_{\text{a4}} = 8.2$

На спектрах водних розчинів цефтазидиму та цефтріаксону (рис.1а,в) не простежується максимумів світлопоглинання у видимій ділянці спектру, а характер спектрів є подібним як в кислому так і лужному середовищах. Як видно зі спектрів (рис.1а,в) при діазотуванні цефалоспоринів в середовищі 1 М НСІ утворюється азосполука із $\lambda_{\max} = 510$ нм (ЦЕФТ) та $\lambda_{\max} = 506$ нм (ЦЕФТР). Проте використання концентрованої хлоридної кислоти для діазотування обох цефалоспоринів перешкоджає утворенню цих продуктів. Водний розчин натрій нітриту в цих умовах не поглинає світла.

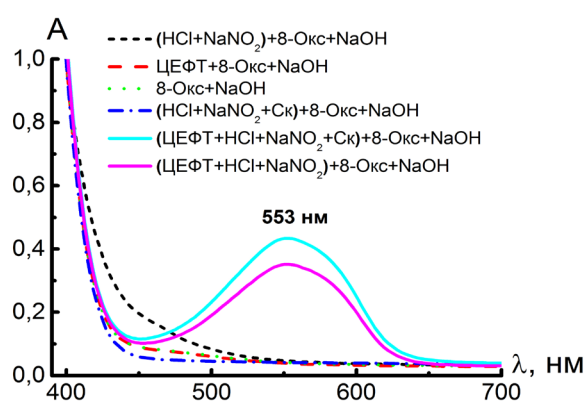
В процесі досліджень було встановлено, що при взаємодії діазосолі цефтазидиму і цефтріаксону з лужним розчином 8-Окс утворюються забарвлені сполуки, які характеризуються появою нових максимумів світлопоглинання при $\lambda_{\text{ЦЕФТ}} = 553$ нм, $\lambda_{\text{ЦЕФТР}} = 550$ нм відповідно (рис.1б,г). Усунення непрореагованого надлишку натрій нітриту за допомогою сульфамінової кислоти у випадку

продукту взаємодії 8-Оксихіноліну з цефтазидимом призводить до збільшення інтенсивності максимуму світлопоглинання у порівнянні, коли цього не робити. Для реакції азосполучення діазотованого ЦЕФТР з 8-Окс непрореагований при діазотуванні надлишок натрій нітриту усувати сульфаміновою кислотою недоцільно, оскільки за його наявності величина максимуму світлопоглинання отриманого продукту взаємодії є дещо вищою. Такі ефекти можливо пов'язані із окиснювальною дією нітрит-іонів на молекули антибіотиків, які мають різну будову.

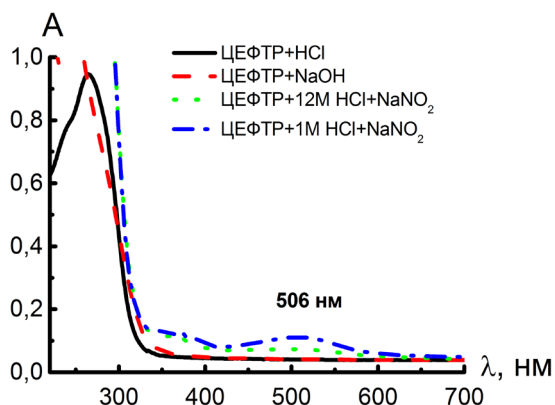
Оскільки кислотність середовища в якому проводять діазотування істотно впливає на утворення продуктів азосполучення важливим було встановити оптимальну концентрацію хлоридної кислоти за якої слід діазотувати ЦА для утворення продукту азосполучення із 8-Окс та не допустити утворення продукту азосполучення діазосолей ЦА між собою.



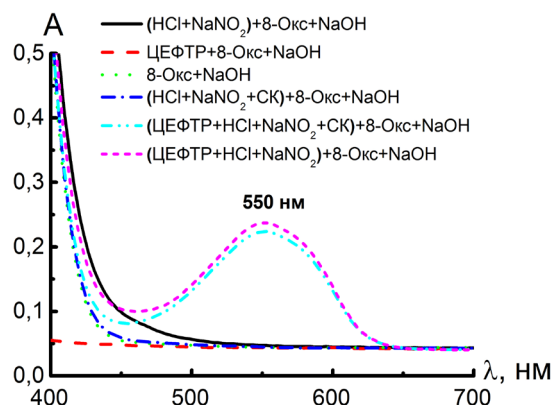
а)



б)



в)



г)

Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання розчинів ЦЕФТ і ЦЕФТР та їхніх діазосолей, 8-оксихіноліну, та продуктів їхньої взаємодії. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3.7 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{ЦЕФТР}} = 3.7 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{НСІ}} = 12.0$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{СК}} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{8-Окс}} = 1.4 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.26$ М, $l = 1$ см.

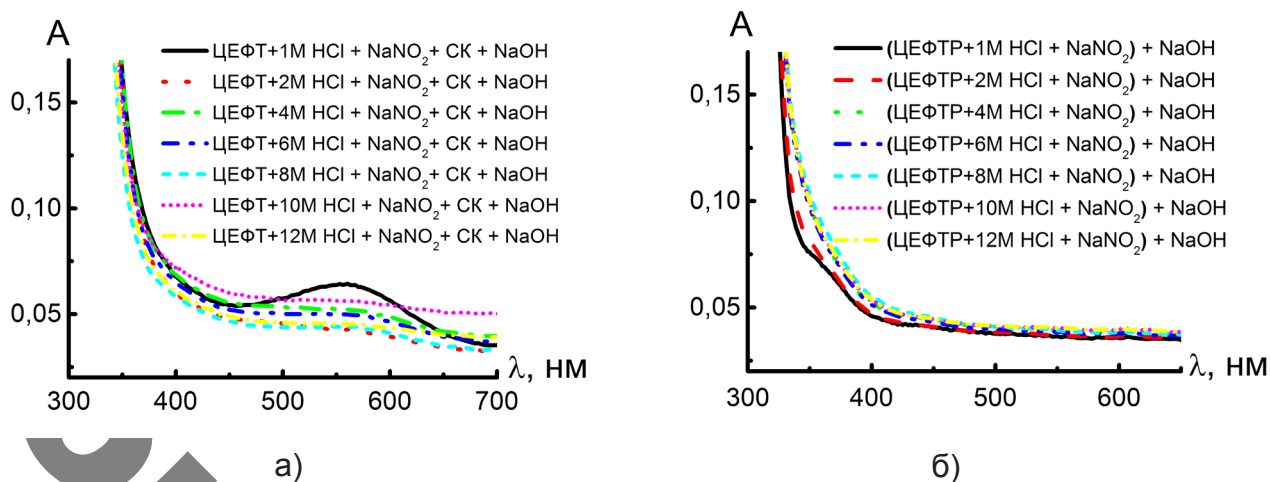


Рис. 2. Вплив концентрації хлоридної кислоти на взаємодію діазотованого а) ЦЕФТ із молекулою самого ЦЕФТ: б) ЦЕФТР із молекулою самого ЦЕФТР. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3.7 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7.4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{СК}} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.26$ М; $l = 1$ см.

Як видно з рис.2а лише при використанні 1 М хлоридної кислоти для діазотування ЦЕФТ спостерігається максимум при 510 нм з невеликою інтенсивністю, який очевидно відповідає азосполуці утвореній внаслідок взаємодії діазосоли ЦЕФТ із молекулою непродіазотованого ЦЕФТ, однак використання більш концентрованої кислоти запобігає утворенню даної азосполуки. Наявність великого надлишку протонів призводить до того, що первинна ароматична аміногрупа цефтазидиму є протонувана і має позитивний заряд, що перешкоджає її азосполученню із позитивно зарядженою діазогрупою. У випадку діазотування ЦЕФТР небажаний продукт власного азосполучення не утворюється впродовж 5 хв при використанні для діазотування 1 М HCl (рис.2б). Однак, як свідчать спектри світлопоглинання зображені на рис.3 з часом (> 5хв.) продукт власного азосполучення антибіотиків із їхніми діазосолями таки утворюється навіть коли проводити

діазотування в середовищі концентрованої хлоридної кислоти, оскільки розчин діазосоли жовтіє. На спектрах це проявляється утворенням максимуму при 455 нм (ЦЕФТ) та 460 нм (ЦЕФТР) і зростанням світлопоглинання розчинів діазосоли в подальшому.

Наступним кроком було дослідження утворення продукту азосполучення 8-оксихіноліну із солями діазонію ЦА отриманих за різної концентрації хлоридної кислоти. Результати досліджень представлені на рис.4 показують, що утворення максимальної кількості продукту взаємодії діазотованих антибіотиків з 8-Окс відбувається коли їх діазотування проводили в середовищі 12 М хлоридної кислоти. Такі умови кислотності при діазотуванні ЦА дозволяють одночасно вирішити два завдання: усунути конкуруючу реакцію азосполучення ЦА між собою та забезпечити максимальний вихід продуктів азосполучення із 8-Окс.

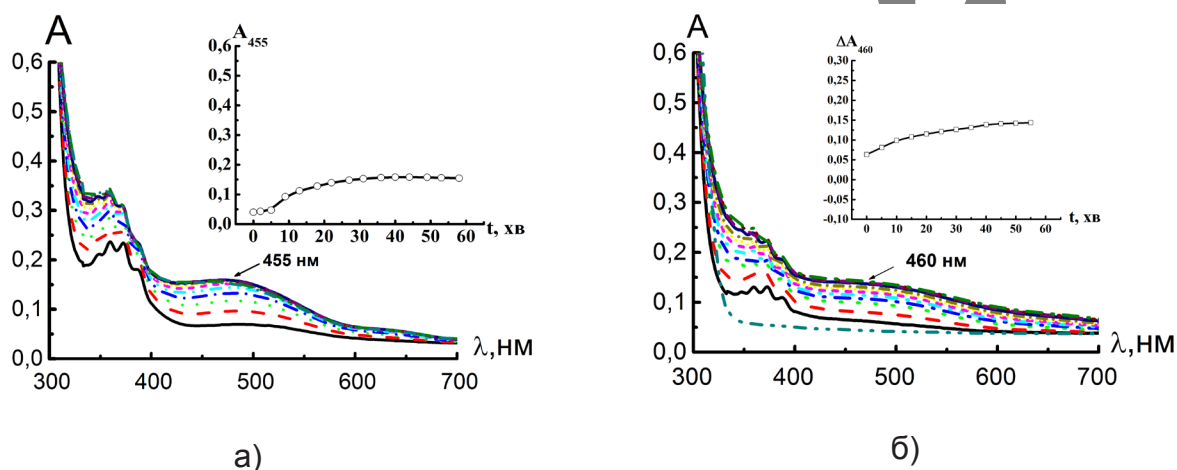


Рис. 3. Спектри світлопоглинання солі діазонію а) цефтазидиму та б) цефтріаксону залежно від часу зберігання. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1.5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.5 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7.4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.4 \cdot 10^{-4}$ М; $l = 1$ см.

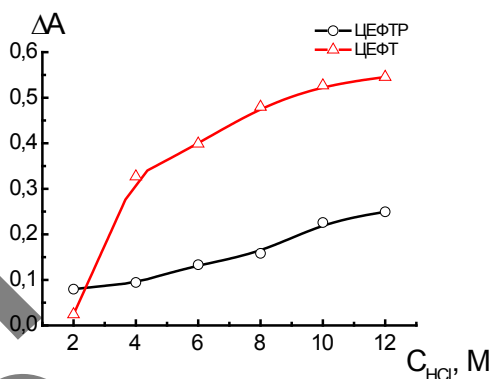


Рис. 4. Вплив концентрації хлоридної кислоти на діазотування ЦЕФТ і ЦЕФТР та їх подальше азосполучення з 8-оксихіноліном. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3.7 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{СК}} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 1.4 \cdot 10^{-3}$ М; $\lambda_{\text{ЦЕФТ}} = 553$ нм. $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7.4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.4 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.26$ М; $\lambda_{\text{ЦЕФТР}} = 550$ нм; $l = 1$ см.

Як видно з рис. 3 на відміну від ЦЕФТР у випадку діазотування ЦЕФТ в середовищі концентрованої хлоридної кислоти продукт власного азосполучення утворюється швидше, а отже і сама швидкість утворення солі діазонію ЦЕФТ є великою. Тому для запобігання реакції власного азосполучення ЦЕФТ нема потреби чекати і лужний розчин реагенту 8-Окс до реакційної суміші слід додавати відразу, щоб отримати очікуваний продукт практично миттєво. У випадку взаємодії ЦЕФТР з 8-Окс вивчено вплив тривалості діазотування на утворення аналітичної форми ЦЕФТР, адже попередньо було з'ясовано, що в кислому середовищі діазосіль цефтріасону азосполучається між собою за час > 5 хв.

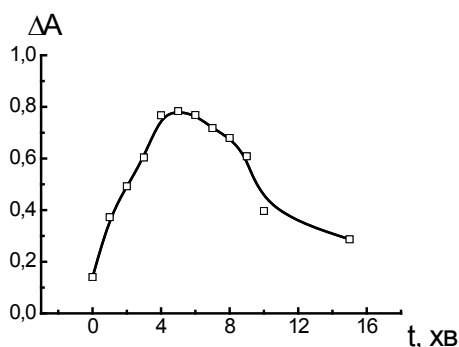


Рис. 5. Вплив тривалості реакції діазотування антибіотика на вихід кінцевого продукту азосполучення солі діазонію ЦЕФТР із 8-оксихіноліном. $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7.4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.4 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.26$ М; $l = 1$ см.

Як видно з рис. 5 оптимальним часом для проходження реакції діазотування є 4–6 хв, де аналітичний сигнал є найбільшим. Відповідно цього часового інтервалу є достатньо щоб додати лужний розчин реагенту і отримати очікуваний продукт. В подальших дослідженнях діазотування

ЦЕФТР проводили впродовж 5 хв.

Для проведення азосполучення діазотованого ЦЕФТ та ЦЕФТР із 8-оксихіноліном в лужному середовищі досліджено вплив концентрації NaOH (рис. 6). Для цього ми розчиняли 8-Окс у розчині NaOH різної концентрації. Як показали результати досліджень максимальний вихід продуктів взаємодії діазотованих антибіотиків із реагентом спостерігається при концентрації лугу в реакційному середовищі 0.16 М (кінцева концентрація). Для її досягнення в умовах нашого експерименту ми використовували розчини 8-Окс приготований на 4.0 М натрій гідроксиді.

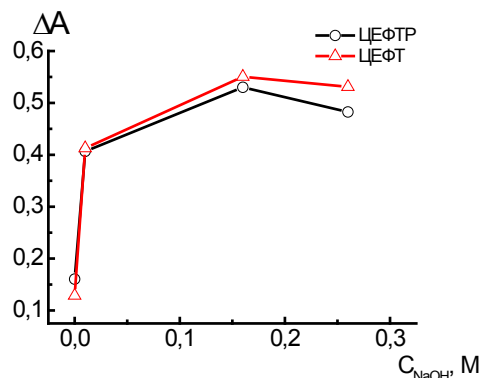


Рис. 6. Вплив концентрації натрій гідроксиду на світлопоглинання продуктів азосполучення солей діазонію ЦЕФТ і ЦЕФТР із 8-оксихіноліном. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3.7 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{СК}} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 1.4 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7.4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.4 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М; $l = 1$ см.

Досліджено вплив концентрації натрій нітриту на утворення діазосолі цефтазидиму та цефтріасону (рис. 7) та показано, що оптимальним є використання натрій нітриту з концентрацією $1.0 \cdot 10^{-3}$ М, тобто його 10-кратний надлишок відносно концентрації антибіотиків, що узгоджується із літературними даними щодо умов реакції діазотування [17].

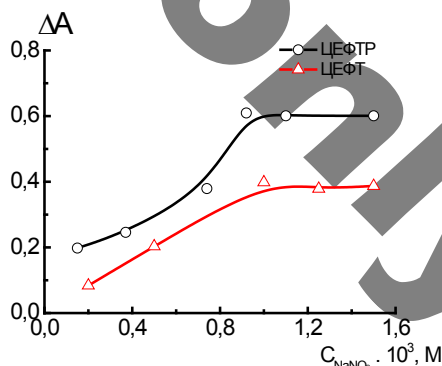


Рис. 7. Залежність оптичної густини розчину продуктів взаємодії діазотованих ЦЕФТ і ЦЕФТР від концентрації натрій нітриту, який використовували для діазотування. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{ЦЕФТР}} = 1.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ М; $l = 1$ см.

Оскільки попередньо встановлено, що для усунення надлишку натрій нітриту доцільно використовувати сульфамінову кислоту лише у випадку взаємодії діазосолей ЦЕФТ із 8-оксихіноліном, тому досліджено вплив її концентрації на вихід продукту реакції. З отриманих результатів (рис. 8) видно, що оптимальним є використання сульфамінової кислоти з концентрацією $1.5 \cdot 10^{-4}$ М, тобто її 1.5-кратний надлишок відносно концентрації діазотуючого реагенту натрій нітриту.

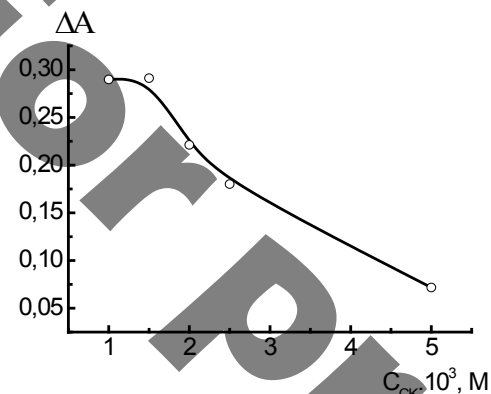


Рис. 8. Вплив концентрації сульфамінової кислоти на світлопоглинання продукту взаємодії ЦЕФТ з 8-Окс. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ М; $\lambda_{\text{max}} = 553$ нм; $l = 1$ см.

Для встановлення оптимальних умов азосполучення ми проводили пошук надлишку реагенту для максимального виходу продукту реакції. Нами було використано різний надлишок лужного розчину 8-Оксихіноліну стосовно кількості діазотованих цефтазидиму та цефтріаксону у реакційній суміші. Як видно з результатів представлених на рис. 9 максимальний вихід забарвлених аналітичних форм досягається при таких концентраціях реагентів, що відповідають 7-кратному надлишку 8-Окс стосовно ЦЕФТ та ЦЕФТР.

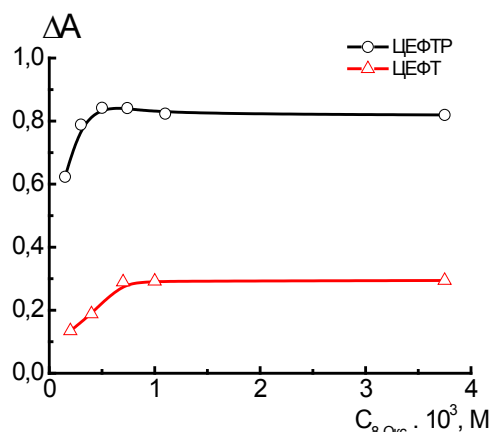


Рис. 9. Залежність величини світлопоглинання продуктів азосполучення діазосолей ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс від його концентрації. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{СК}} = 1.5 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ М. $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7.4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 9.25 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ М; $l = 1$ см.

Утворення азосполук досліджуваних цефалоспоринових із 8-оксихіноліном є двостадійним процесом, який відбувається за різної кислотності, що може впливати на самі реагенти, тому досліджено порядок додавання компонентів у суміш. Встановлено, що максимальний вихід продукту реакції спостерігається, якщо діазотування та подальше азосполучення усіх реагентів проводити у такій послідовності: у аліквоту розчину відповідного цефалоспориноу вносити розчин кислоти, тоді додавати розчин натрій нітриту та сульфамінової кислоти (ЦЕФТ), а після цього проводити азосполучення з лужним розчином 8-оксихіноліну (табл. 3).

Для спектрофотометричної методики важливе значення має стійкість у часі аналітичної форми. Встановлено, що аналітичний сигнал характерний для продуктів взаємодії діазотованих ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс (рис. 10) залишається стабільним впродовж тривалого часу (більше 50 хвилин).

Таблиця 3. Порядок додавання реагентів при взаємодії. $C_{\text{ЦЕФТ, ЦЕФТР}} = 1.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{HCl}} = 12$ М; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{СК}} = 1.5 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 0.16$ М; $l = 1$ см.

Порядок додавання реагентів	ΔA_{553} ЦЕФТ	ΔA_{550} ЦЕФТР
$[\text{ЦА} + \text{HCl} + \text{NaNO}_2] + \text{СК}_{\text{ЦЕФТ}} + 8\text{-Окс (NaOH)}$	0.540	0.911
$[\text{HCl} + \text{NaNO}_2 + \text{ЦА}] + \text{СК}_{\text{ЦЕФТ}} + 8\text{-Окс (NaOH)}$	0.421	0.898
$[\text{NaNO}_2 + \text{ЦА} + \text{HCl}] + \text{СК}_{\text{ЦЕФТ}} + 8\text{-Окс (NaOH)}$	0.518	0.899

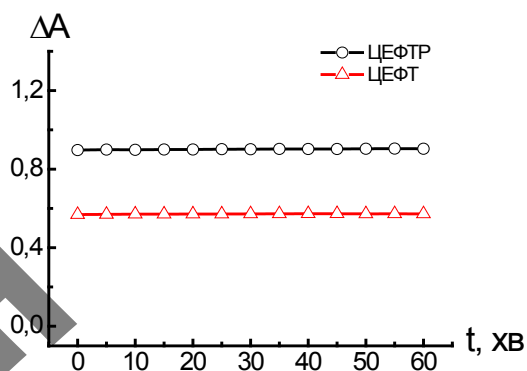


Рис. 10. Стабільність світлопоглинання продуктів азосполучення діазотованих ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{ЦЕФТР}} = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}} = 12 \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{8-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{СК}} = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Методом ізомольярних серій з'ясовано співвідношення компонентів у досліджуваних сполуках. З результатів представлених на рис. 11 можна зробити висновок, що при взаємодії діазотованих цефалоспоринів з 8-Окс утворюється продукт азосполучення із співвідношенням компонентів 1:1.

На основі проведених досліджень ми пропонуємо таку імовірну схему взаємодії

діазотованих цефтидиму та цефтріасону з 8-оксихіноліном (рис. 12), в кислому середовищі нітрит-іони діазотують первинну ароматичну аміногрупу цефалоспоринів з утворенням діазосолі відповідного антибіотика, яка у лужному середовищі взаємодіє з реагентом, утворюючи забарвлений продукт.

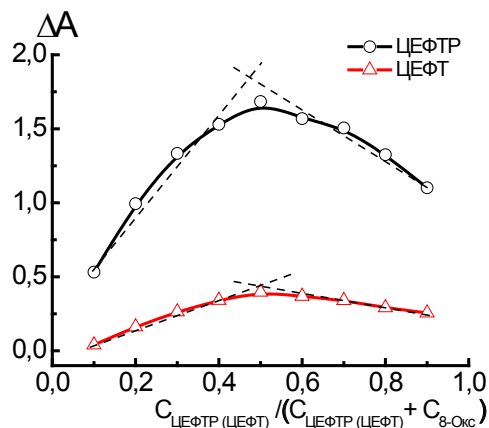


Рис. 11. Встановлення співвідношення компонентів у системах ЦЕФТ–8-Окс, ЦЕФТР–8-Окс методом ізомольярних серій. $C_{\text{ЦЕФТ, ЦЕФТР}} + C_{\text{8-Окс}} = 3.7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}} = 12 \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

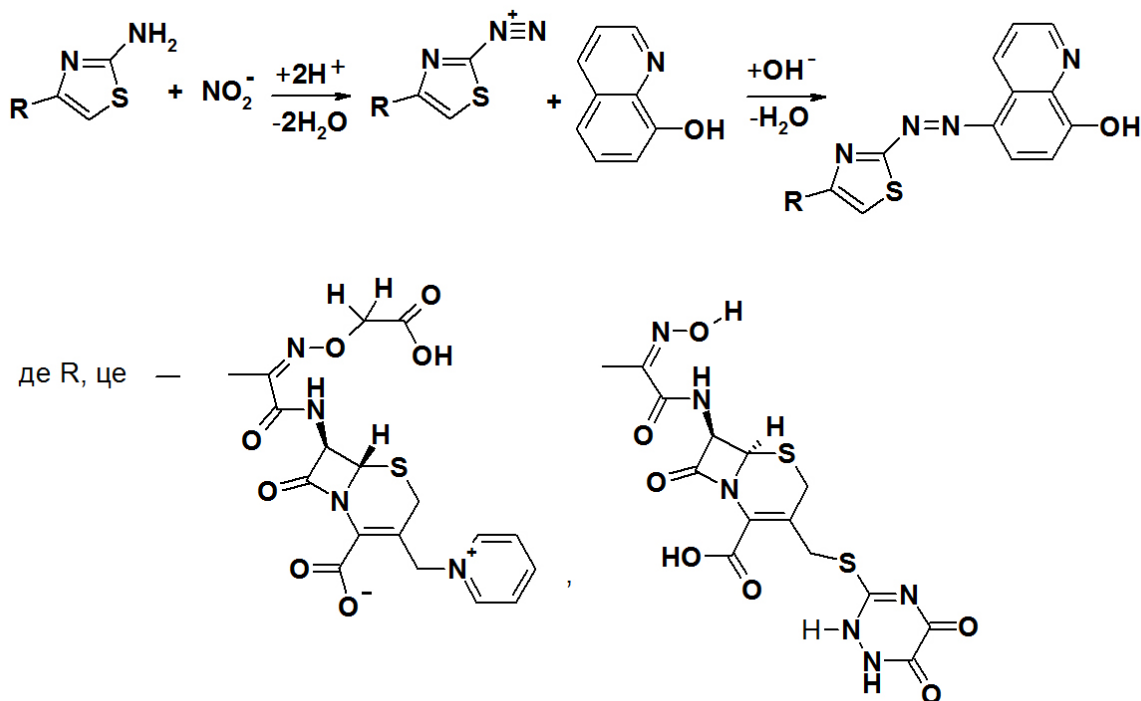


Рис. 12. Імовірна схема взаємодії діазосолей цефтидиму та цефтріасону з 8-оксихіноліном.

В таблиці 4 наведено характеристики спектрофотометричних методик визначення цефалоспоринових антибіотиків, а також підсумовано оптимальні умови отримання аналітів цефтріаксону та цефтазидиму з різними реагентами. Як видно з даних табл.4, розроблені нами методики визначення ЦА з 8-оксихіноліном характеризуються вищою чутливістю у порівнянні із іншими запропонованими у літературі і можуть бути використані для аналізу цих антибіотиків у ліках.

Встановлено, що величина аналітичного сигналу забарвленого продукту у системах ЦЕФТ–8-Окс та

ЦЕФТР–8-Окс лінійно залежить від концентрації цефтазидиму в розчині. Як видно з табл.5 при визначенні цефтазидиму з 8-Окс лінійність сигналу світлопоглинання продукту зберігається в межах 2 порядків конценцентрацій ЦЕФТ. Варто зауважити, що система ЦЕФТР–8-Окс характеризується двома інтервалами лінійності.

Правильність спектрофотометричних методик визначення цефтазидиму та цефтріаксону з 8-оксихіноліном перевірено методом “введено-знайдено” на модельних розчинах методом градуированого графіка (табл.6).

Таблиця 4. Спектрофотометричні методики визначення ЦЕФТ з використанням реакції азосполучення.

Реагент	Умови визначення		Межі визначуваних концентрацій, C_{min} , мкг/мл;
	Середовище	λ , нм, ϵ , $л \cdot моль^{-1} \cdot см^{-1}$	
натрій нітрит [10]	Водний розчин цефтріаксону або цефтазидиму + 1% цитратної кислоти + 0.5% розчину $NaNO_2$ при кімнатній температурі	500 –	12.5-200 10
2-нафтол [11]	Водний розчин цефтріаксону + 0.1 М розчину HCl + розчину 1 мг/мл $NaNO_2 \rightarrow$ витримують протягом 5 хв, розчин 1 мг/мл 2-нафтолу	510 $4.045 \cdot 10^3$	1-20 мкг 0.726 мкг
1-нафтол [12]	Водний розчин цефтазидиму, $HCl_{конц}$ 0.1% $NaNO_2 \rightarrow$ 0.2% розчин сульфамінової кислоти $\rightarrow$ 0.2% розчин реагенту приготований на 20 % $NaOH$	562 $9.851 \cdot 10^3$	10–50
8-оксихінолін	Водний розчин цефтазидиму, $HCl_{конц}$ 0.06 М $NaNO_2 \rightarrow$ 0.09 М розчин сульфамінової кислоти $\rightarrow$ $1.25 \cdot 10^{-2}$ М розчин реагенту приготований на 4 М $NaOH$	553 $6.31 \cdot 10^3$	3.8 – 191.3 0.65
8-оксихінолін	Водний розчин цефтріаксону, $HCl_{конц}$ 0.06 М $NaNO_2 \rightarrow$ $3.0 \cdot 10^{-2}$ М розчин реагенту приготований на 4 М $NaOH$	550 $1.45 \cdot 10^4$	0.33 – 94.3 0.28

Таблиця 5. Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР з використанням 8-Окс. $n = 5$, $P = 0.95$, $C_{HCl} = 12$ М; $C_{8-Окс} = 7.0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2} = 1.0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{ок} = 1.5 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{NaOH} = 0.16$ М, $l = 1$ см.

Антибіотик	Лінійність, М	Рівняння графіка $C_{антибіотика}$, М	C_{min} , М	C_H , М	R
ЦЕФТ	$(0.69 - 33.6) \cdot 10^{-5}$	$\Delta A_{553} = 0.052 + 5.25 \cdot 10^3 \cdot C$	$1.81 \cdot 10^{-6}$	$5.43 \cdot 10^{-6}$	0.9983
ЦЕФТР	$(0.06 - 5.6) \cdot 10^{-5}$	$\Delta A_{550} = 0.8458 + 1.55 \cdot 10^4 \cdot C$	$5.92 \cdot 10^{-7}$	$1.79 \cdot 10^{-6}$	0.9993
	$(0.56 - 1.7) \cdot 10^{-4}$	$\Delta A_{550} = 0.0828 + 6.43 \cdot 10^3 \cdot C$			0.9993

Таблиця 6. Результати спектрофотометричного визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс та у модельних розчинах. $n=5$; $P=0.95$; $C_{\text{HCl}} = 12 \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{CK}} = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Антибіотик	Внесено, мкг/мл	Знайдено, $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$, мкг/мл	S_r
ЦЕФТ	66.00	66.01 ± 0.19	0.02
ЦЕФТР	66.00	65.57 ± 0.28	0.01

Отримані результати вказують на те, що похибка визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР за розробленими методиками не перевищує похибки спектрофотометричного методу, а отже, розроблені методики можуть бути застосовані для аналізу реальних об'єктів.

Ліки на основі цефтазидиму і цефтріаксону випускають у формі порошку для приготування розчину для ін'єкцій. Для отримання зазначених лікарських форм як допоміжну речовину використовують безводний натрій карбонат. Допоміжні речовини як правило, не впливають на діючі речовини, однак можуть заважати визначення їх вмісту за допомогою окремих реакцій.

Згідно методу контролю якості в досліджуваних лікарських препаратах «Цефтазидим» та «Денізид» виробництва Свісс Перентерале Пвт. Лтд, Індія співвідношення цефтазидиму до натрій карбонату є 1:0.6. Проведено дослідження впливу різних надлишків допоміжної речовини на кількісне визначення цефалоспоринів з 8-оксихіноліном. Як показали результати експерименту (рис. 13) навіть 18-кратний надлишок натрій карбонату не заважає кількісному визначенню даних антибіотиків. Критерієм селективності визначення було обрано незмінність величини світлопоглинання розчинів отриманих продуктів реакції у межах 10%.

На основі розроблених методик визначення цефалоспоринів з 8-оксихіноліном було визначено

вміст ЦЕФТ та ЦЕФТР в однокомпонентних лікарських препаратах, які випускають у формі порошку для розчину для ін'єкцій (табл. 7). Згідно методів контролю якості фірм виробників, вміст цефтазидиму у препаратах даних лікарських препаратах впродовж терміну придатності має знаходитись у межах 90–120 % від номінального вмісту.

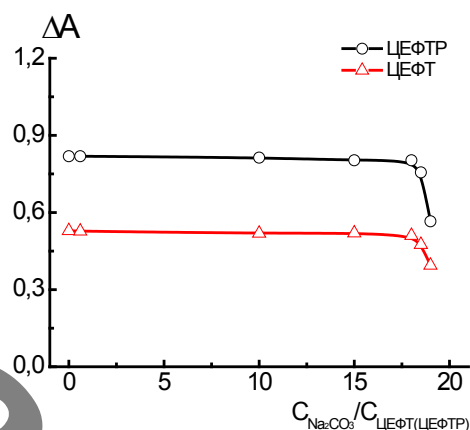


Рис. 13. Вплив надлишків натрій карбонату на світлопоглинання продуктів азосполучення діазотованих цефтазидиму та цефтріаксону із 8-оксихіноліном. $C_{\text{HCl}} = 12 \text{ M}$; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{CK}} = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 0.16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Таблиця 7. Результати спектрофотометричного визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс у лікарських препаратах. $n=5$; $P=0.95$; $C_{\text{HCl}} = 12 \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{CK}} = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{8\text{-Окс}} = 7.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\lambda_{\text{max(ЦЕФТ)}} = 553 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{max(ЦЕФТР)}} = 550 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Антибіотик (регламентований вміст у препараті – 1г/флакон)	Встановлений вміст $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ (S_r)	
	Хроматографічно згідно ДФУ [3, 4]	Спектрофотометрично з 8-Окс
«Цефтазидим» Свісс Перентерале Пвт. Лтд, Індія (допоміжні речовини – натрій карбонат безводний)		
Цефтазидим	99.38 ± 0.37	99.00 ± 1.48
90 – 120 %	(0.994 ± 0.0037)	(0.990 ± 0.015)
(0.90 – 1.20 г/флакон)	(0.003)	(0.012)

Таблиця 7. (продовження).

Антибіотик (регламентований вміст у препараті – 1г/флакон)	Встановлений вміст $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ (S _r)	
	Хроматографічно згідно ДФУ [3, 4]	Спектрофотометрично з 8-Окс
«Денізид» Свісс Перентерале Пвт. Лтд, Індія (допоміжні речовини – натрій карбонат безводний)		
Цефтазидим 90 – 120 % (0.90 – 1.20 г/флакон)	100.77±0.25 (1.008±0.0025) (0.001)	100.20±2.24 (1.002±0.022) (0.018)
«Цефтріаксон», НСПС Хебейн Хуамін Фармасьютикал Компані Лімітед № 98 Хуан Род, Китай		
Цефтріаксон 90 – 120 % (0.90 – 1.20 г/флакон)	102.50±0.76 (1.025±0.0076) (0.006)	101.01±4.65 (1.010±0.046) (0.037)
«ЕМСЕФ 1000», Нектар Лафсайнсіз Лімітед, Індія		
Цефтріаксон 90 – 120 % (0.90 – 1.20 г/флакон)	106.10±0.79 (1.061±0.0079) (0.006)	112.10±3.2 (1.12±0.032) (0.023)

Як видно з даних табл. 7 результати одержані за розробленими методиками визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс у аналізованих лікарських препаратах є в межах допустимих вмістів та добре корелюють із результатами отриманими фармакопейним метом ВЕРХ. Це дозволяє використовувати дані методики для контролю вмістів ЦЕФТ та ЦЕФТР у порошках для приготування ін'єкційних розчинів.

Висновки

Розроблено нові спектофотометричні методики визначення антибіотиків цефалоспоринового ряду цефтазидиму та цефтріаксону. Методики кількісного визначення антибіотиків ґрунтуються на попередньому діазотуванні цефалоспоринів

у середовищі концентрованої хлоридної кислоти та подольшому азосполученні з 8-оксихіноліном. Спектрофотометричному визначенню цафтазидиму та цефтріаксону не заважають значні концентраційні надлишки допоміжної речовини натрій карбонату, яка використовується при виготовленні ліків. Розроблені методики володіють рядом значних переваг у порівнянні з іншими відомими спектрофотометричними, зокрема, не потребують використання органічних розчинників, а також є швидкими у виконанні, експресними та чутливими. Правильність розроблених методик успішно апробовано на модельних розчинах способом «введено-знайдено», а також при аналізі ліків.

Література

1. Abounassif, M.A.; Mian, N.A.; Mian, M.S. Analytical profile of ceftazidime. *Anal Profiles Drug Subst.* **1990**, 19, 95-121. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60365-2](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60365-2)
2. Owens, H.M.; Dash, A.K.; Ceftriaxone so-dium: comprehensive profil. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2003**, 30, 21–57. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(03\)30002-4](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(03)30002-4)
3. Derzhavna Farmakopeya Ukrainy v 3 t., 2-e vyd., Kharkiv: Derzhavne pidpryemstvo «Ukrayins'kyi naukovy farmakopeyny tsentr yakosti likars'kykh zasobiv», **2014**, T. 3., 732 s.
4. Derzhavna Farmakopeya Ukrainy, 2-e vyd., Dopovnennya 2., Kharkiv: Derzhavne pidpryemstvo

«Ukrayins'kyi naukovy farmakopeyny tsentr yakosti likars'kykh zasobiv», **2018**, 336 s.

5. Arun, K.C.; Saravanan, R.; Balachandar, M.V.; et al. UV-Spectrophotometric determination of ceftazidime in pure and pharmaceutical formulation. *J Chem. Pharm. Res.* **2010**, 2 (1), 424-431.
6. Shah, H.B.; Sen, A.K.; Zanwar, A.; et al. Method development and validation for ceftazidime injection by UV-vis spectrophotometer. *Pharm. Sci. Monitor.* **2013**, 4 (3), 333–342.
7. Buchra, M.U.; Rahman, F.; Huda, N.; et al. Development and validation of UF spectrophotometric method for determination of ceftazidime in bulk and pharmaceutical formulation. *Int. Res. J. Pharm.* **2013**, 4, (11), 26-29.

8. El-Shaboury, S.R.; Saleh G. A., Mohamed, F. A.; et al. Analysis of cephalosporin antibiotics. Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 45 (1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.002>
9. Bhaskar Reddy, C.M.; Subbareddy, G.V. Development and validation of UV–Spectrophotometric methods for estimation of ceftriaxone in bulk and tablet dosage form. *Int. J. Chem. Tech Res.* **2013**, 5 (1), 472–477.
10. Uri, V.J.; Jain, T.C. Colorimetric detection and spectrophotometric determination of the aminothiazolylalkoxyimino β -lactams. *J. Antibiot.* **1985**, 39 (5), 669–675. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.669>
11. Ilyas, S.A.; Imran, M.; Kumar, N. Development of spectrophotometric method for determination of ceftriaxone sodium in different brands of pharmaceutical preparation involving diazotation. *IJPSR.* **2015**, 6 (12), 5164 – 5173. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(12\).5164-73](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(12).5164-73)
12. Mruthyunjayaswamy, B.H.M.; Hiremath, B.; Malipatail, S.M.; et al. Spectrophotometric estimation of ceftazidime in pure and pharmaceutical forms. *Asian J. Chem.* **2007**, 19 (5) 3770–3774.
13. Singh, D.; Nishal, V.; Bhagwan, S.; et al. Electroluminescent materials: metal complexes of 8-hydroxyquinoline. *Mater. Des.* **2018**, 156, 215–228.
14. Oliveri, V.; Vecchio, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 120, 252–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>.
15. Park, S.-Yo.; Ghosh, P.; Park, S. O.; et al. Origin of ultraweak fluorescence of 8-hydroxyquinoline in water: photoinduced ultrafast proton transfer. *RSC Adv.* **2016**, 6(12) 9812 –9821.
16. Kostiv, O.; Rydchuk, P.; Korkuna, O. Voltammetric determination of ceftriaxon in pharmaceuticals. *Visnyk Lviv Univ. Ser. Chem.* **2019**, 60 (1), 200–209.
17. Zollinger H., Diazo chemistry I: Aromatic and heteroaromatic compounds. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.; **1994**. 457 p.