УДК 543.426;546.66;615.07;541.49

Скрипинець Ю.В.[1], к.х.н., с.н.с.; **Єгорова А.В.[1],** д.х.н., проф.;
Леоненко І.І.[1], к.х.н., н.с.; **Войтюк О.Д.[2],** заст. зав. НДАЛ

ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФАВІПІРАВІРУ З ВИКОРИСТАННЯМ КОМПЛЕКСНОЇ СПОЛУКИ ЄВРОПІЮ (III)

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

Комплексні сполуки іонів лантанідів Ln (III) широко застосовують для люмінесцентного визначення лікарських препаратів (ЛП), які виступають як ліганди [1, 2]. Ефективність 4f-люмінесценції таких комплексів визначається наявністю функціональних груп в ЛП, які відповідають за процес комплексоутворення, а також залежить від відповідності енергій триплетних рівнів лігандів і енергій збуджених рівнів іонів лантанідів.

Особливий інтерес в останні роки викликає можливість аналітичного застосування не тільки ефектів сенсибілізації люмінесценції іонів лантанідів, але й її гасіння або збільшення для непрямого визначення ряду лікарських препаратів, що не сенсибілізують люмінесценцію лантанідів [3, 4]. Фавіпіравір – 6-фторо-3-гідроксипіразин-2-карбоксамід – пероральний противірусний засіб, схвалений для лікування грипу в Японії. Цей препарат є аналогом пуринових нуклеозидів, який діє як конкурентний інгібітор РНК-полімерази, необхідної для реплікації вірусу [5]. Він має активність проти грипу А та В, вірусу Ебола та SARS-CoV-2 in vitro [6]. У літературі описано визначення фавіпіравіру (ФАВ) в фармацевтичних препаратах за допомогою ВЕРХ [7, 8].

Метою даної роботи була розробка високочутливої та простої люмінесцентної методики кількісного визначення фавіпіравіру за збільшенням люмінесценції комплексної сполуки європію (III) з сенсибілізатором – батофенантроліном (БФ).

Експериментальна частина

Стандартний розчин хлориду європію (1×10^{-2} моль/л) готували розчиненням відповідного оксиду високої чистоти, який попередньо прожарювали в муфельній печі протягом 1 години при 650-700ºС, в хлоридній кислоті (1:1) з подальшим випаровуванням її надлишку на водяній бані. Сухий залишок розчиняли в дистильованої воді і розбавляли до необхідного об'єму. Концентрацію отриманого розчину контролювали комплексонометрично з індикатором арсеназо I в уротропіновому буферному розчині при pH 7.0±0.2. В роботі використовували реагент – сенсибілізатор батофенантролін виробництва Merck (CAS 1662-01-7). Розчин (1×10^{-2} моль/л) реагенту готували розчиненням точної наважки в етанолі. Фавіпіравір (чистота 99%, Cangzhou Wisdom Pharma Co., Ltd, Китай). Стандартний розчин ФАВ (500 мкг/мл) готували шляхом розчинення 0,050 г речовини в 100,0 мл води. Робочий розчин ФАВ (100 мкг/мл) готували щодня шляхом розведення водою стандартного розчину. Для створення необхідного значення pH 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 570-650 нм із $\lambda_{макс}$= 612, 590 нм (переходи $^5D_0\rightarrow{}^7F_2$, $^5D_0\rightarrow{}^7F_1$, відповідно), а також спектри збудження та криві затухання люмінесценції за допомогою спектрофлуориметру Cary Eclipse (Varian, Австралія) з ксеноновою лампою 150 W.

© Скрипинець Ю.В., Єгорова А.В., Леоненко І.І., Войтюк О.Д.
DOI: 10.24144/2414-0260.2021.1.58-64

Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC (Shimadzu, Японія).

Значення енергії триплетного рівня органічного ліганду визначали реєстрацією спектру фосфоресценції його комплексу з гадолінієм при 77ºК. Час життя збудженого стану комплексу розраховували з кривої затухання його люмінесценції.

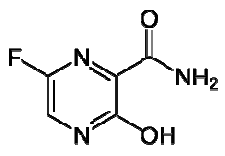
Значення pH розчинів вимірювали за допомогою pH-метру Seven Easy (Mettler Toledo, Китай) із скляним електродом, калібрування якого проводили за допомогою стандартних буферних розчинів (Hamilton, Швейцарія). Аналітичні електронні ваги серії ED 124 S (Sartorius, Німеччина). Усі вимірювання проводили при кімнатній температурі (22±2)°С.

Результати та їх обговорення

Спектр поглинання розчину фавіпіравіру характеризується наявністю в ультрафіолетовій області спектра смуг поглинання (228 нм, 323 нм, 363 нм) з високими молярними коефіцієнтами екстинкції, що обумовлює ефективне поглинання енергії збудження.

Триплетний рівень фавіпіравіру, розрахований зі спектру фосфоресценції комплексу з Gd (III) при 77°К, становить 24390 $см^{-1}$, та перевищують енергію рівня першого збудженого стану іонів Eu (III) 17300 $см^{-1}$, що визначає можливість внутрішньомолекулярної передачі поглиненої лігандом енергії на рівень іонів європію і призводить до сенсибілізації люмінесценції.

Також фавіпіравір є здатним до утворення з іонами Eu (III) комплексної сполуки, в якій за рахунок внутрішньомолекулярного переносу енергії збудження від органічного ліганда на іон Eu (III) спостерігається досить незначна сенсибілізована люмінесценція останнього за рахунок дисіпаціїї енергії збудження з триплетного рівня, яка не може бути використана для аналітичних цілей.



Фавіпіравір (ФАВ)

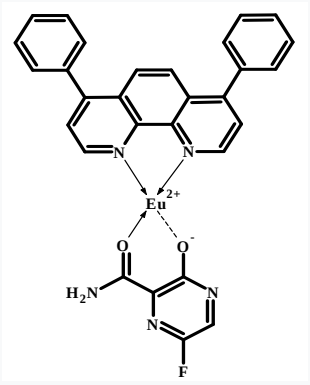
Розглянуто вплив деяких поверхнево-активних та донорно-активних речовин (лаурілсульфат натрію, тергітол, тритон Х-100, твін 80, децилпіридинію хлорид, октадецилпіридинію хлорид, бридж, ТОФО, 2,2-дипіридил, 1,10-фенантролін, неокупроїн, 4,7-діметокси-1,10-фенантролін, батофенантролін) на $I_{люм}$ комплексу Eu (III)–ФАВ. Встановлено, що їх введення у розчин не впливає або навіть незначно гасить $I_{люм}$. Тільки батофенантролін значно збільшує $I_{люм}$ комплексу Eu (III)–ФАВ, приблизно у 10 разів.

Як сенсибілізатор 4f-люмінесценції європію обраний батофенантролін, комплекс Eu (III)–БФ використаний в подальшій роботі як люмінесцентний зонд для визначення фавіпіравіру.

Можливість внутрішньомолекулярної передачі поглиненої батофенантроліном енергії на рівень іонів європію, що призводить до сенсибілізації люмінесценції, обумовлено поглинанням в УФ-області спектра та величиною триплетного рівня 18100 $см^{-1}$.

Взаємодія фавіпіравіру з люмінесцентним зондом Eu (III)-БФ спостерігається в широкому інтервалі кислотності (pH 4,0-9,5), максимальне збільшення інтенсивності люмінесценції спостерігається при pH 7,5, яке досягається додаванням 1,0 мл 40% розчину уротропіну.

Встановлено, що оптимальними є концентрації компонентів: $C_{Eu}= 1\times10^{-4}$ моль/л, $C_{БФ}=2\times10^{-4}$ моль/л. Методом обмеженого логарифмування встановлено, що утворюється змішаний комплекс Eu(III)–БФ–ФАВ (1:1:1):



Відомо, що до збільшення інтенсивності люмінесценції може приводити безліч

процесів, у тому числі реакції в збудженому стані, перенесення енергії, утворення комплексів. Встановлено синергетичний ефект, який проявляється в комбінованій дії двох комплексів (Eu (III)–БФ і Eu (III)–ФАВ) і перевищує суму інтенсивності люмінесценції ($I_{люм}$) кожного з них окремо. Виявлений синергізм обумовлений утворенням різнолігандного комплексу.

З метою оптимізації умов комплексоутворення та виявлення придатності комплексу Eu (III)–БФ–ФАВ для визначення фавіпіравіру було вивчено його люмінесцентні властивості.

Спектр збудження комплексу Eu (III)–БФ–ФАВ, представлений на рис. 1, має два максимуми за довжинами хвиль 263 нм та 315 нм. Для аналітичних цілей було вибрано смугу збудження 315 нм.

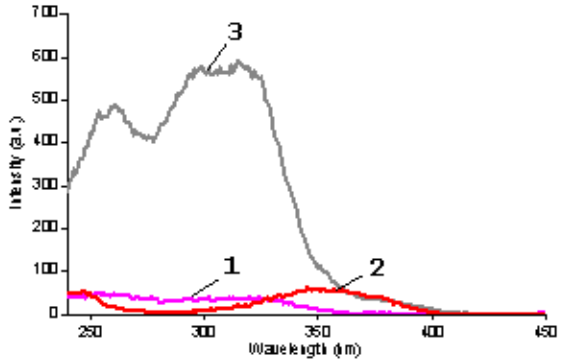


Рис. 1. Спектри збудження комплексу Eu (III)–БФ (1), Eu (III)–ФАВ (2), Eu (III)–БФ–ФАВ (3), (C_{Eu} = 1×10^{-4} моль/л; $C_{БФ}$ = 2×10^{-4} моль/л, $C_{ФАВ}$ = 10 мкг/мл; $\lambda_{еміс}$ = 615 нм).

Час життя (τ) збудженого стану комплексів Eu(III)–ФАВ (τ = 146 мкс), Eu(III)–БФ (τ = 356 мкс) та Eu (III)–БФ–ФАВ (τ = 635 мкс) розраховано з кривих затухання сенсибілізованої люмінесценції (рис. 2).

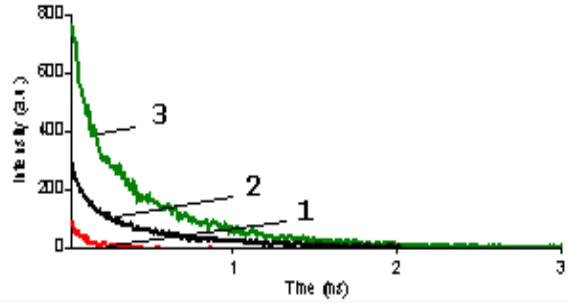


Рис. 2. Криві затухання люмінесценції комплексів Eu(III)–ФАВ (1), Eu(III)–БФ (2), Eu(III)–БФ–ФАВ (3) (C_{Eu} = 1×10^{-4} моль/л; $C_{БФ}$ = 2×10^{-4} моль/л, $C_{ФАВ}$ =10 мкг/мл, $\lambda_{еміс}$ = 615 нм; $\lambda_{збуд}$ = 315 нм).

При додаванні фавіпіравіру до зонду Eu (III)–БФ час життя його збудженого стану змінюється у 2 рази.

Виявлено, що введення різних кількостей фавіпіравіру в водні розчини комплексу Eu (III)–БФ викликає збільшення 4f-люмінесценції європію (III) ($\lambda_{макс}$ = 615 нм; перехід $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$) (рис. 3).

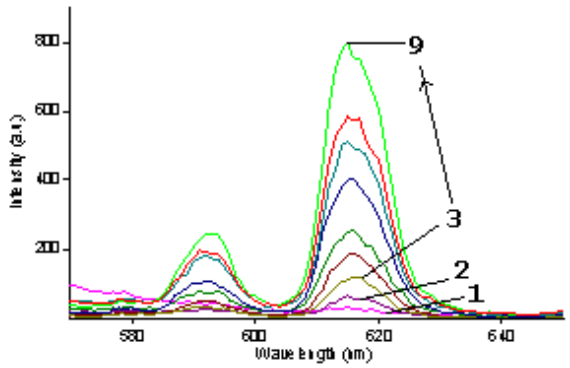


Рис. 3. Спектри люмінесценції комплексів Eu(III)–ФАВ (1), Eu(III)–БФ (2), Eu(III)–БФ–ФАВ (3-9), концентрації ФАВ 0,5–10,0 мкг/мл (C_{Eu} = 1×10^{-4} моль/л, $C_{БФ}$ = 2×10^{-4} моль/л, $\lambda_{збуд}$ = 315 нм, $\lambda_{еміс}$ = 615 нм).

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

Люмінесцентні властивості комплексу Eu(III)–БФ з фавіпіравіром були використані для кількісного визначення ФАВ в таблетованій формі (200 мг) препарату "Favmac" (MACLEODS PHARMACEUTICALS LTD, Індія).

Побудова градуювального графіку

У мірні колби місткістю 10,0 мл вносили 0,05; 0,1; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0 мл робочого розчину ФАВ (100 мкг/мл). У кожну пробірку додавали по 1,0 мл 1×10^{-3} моль/л стандартного розчину хлориду Eu (III); 0,2 мл 1×10^{-3} розчину БФ, 1,0 мл 40% уротропінового буферного розчину. Об'єм розчину в кожній колбі доводили дистильованою водою до позначки, перемішували і вимірювали $I_{люм}$ за довжини хвилі $\lambda_{еміс}$= 615 нм.

За отриманими результатами будували градуювальний графік залежності $I_{люм}$ від концентрації фавіпіравіру: $I_{люм}$ = 89,45 + 61,89×$C_{ФАВ}$ (коефіцієнт кореляції R= 0,99765), де $C_{ФАВ}$ – концентрація

фавіпіравіру, мкг/мл (рис. 4). Лінійність спостерігається в інтервалі концентрацій фавіпіравіру 0,5–10,0 мкг/мл з межею кількісного визначення 0,35 мкг/мл (3σ-критерій).

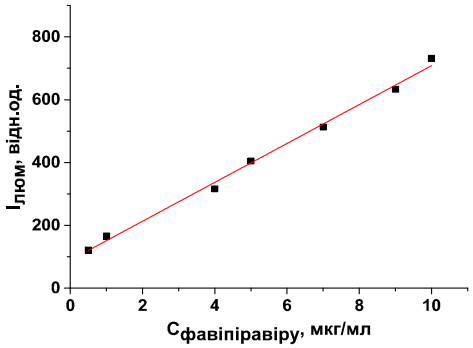


Рис. 4. Градуювальний графік для визначення фавіпіравіру (C_{Eu} = 1×10^{-4} моль/л, $C_{БФ}$ = 2×10^{-4} моль/л, $\lambda_{еміс}$ = 615 нм, $\lambda_{збуд}$ = 315 нм).

Методика кількісного визначення фавіпіравіру в таблетованій формі

Для кількісного визначення беруть наважку з порошку 10 розтертих таблеток.

Випробовуваний розчин. Точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 200 мг фавіпіравіру, поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 150 мл води, ретельно перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв (50ºС), охолоджують. Доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. Одержаний розчин фільтрують крізь мембранний фільтр (0,20 мкм; RC 15).

5,0 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу місткістю 50,0 мл, об'єм розчину доводять водою до позначки, перемішують.

0,5 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу місткістю 10,0 мл, додають по 1,0 мл 1×10^{-3} моль/л стандартного розчину хлориду Eu (III); 0,2 мл 1×10^{-3} моль/л розчину БФ; 1,0 мл 40% уротропінового буферного розчину, об'єм розчину доводять водою до позначки, перемішують.

Розчин порівняння. 200,0 мг РСЗ фавіпіравіру поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 150 мл води, ретельно перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв (50ºС), охолоджують. Доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

5,0 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу місткістю 50,0 мл, об'єм розчину доводять водою до позначки, перемішують.

0,5 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу місткістю 10,0 мл, додають по 1,0 мл 1×10^{-3} моль/л стандартного розчину хлориду Eu (III); 0,2 мл 1×10^{-3} моль/л розчину БФ; 1,0 мл 40% уротропінового буферного розчину, об'єм розчину доводять водою до позначки, перемішують.

Через 5 хвилин вимірюють $I_{люм}$ випробовуваного розчину та розчину порівняння за довжини хвилі $\lambda_{еміс}$= 615 нм ($\lambda_{збуд}$= 315 нм).

Запропонована методика характеризується задовільними метрологічними характеристиками та простотою виконання.

Вміст $\mathbf{C_5H_4FN_3O_2}$ (фавіпіравіру) в таблетці має бути від 190,0 мг до 210,0 мг, у перерахунку на середню масу таблетки.

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

$$X = \frac{I_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot 200 \cdot 5 \cdot 0{,}5 \cdot 50 \cdot 10}{I_0 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 0{,}5 \cdot 200 \cdot 50 \cdot 10} = \frac{I_1 \cdot m_0 \cdot b}{I_0 \cdot m_1},$$

де: I_1 – інтенсивність люмінесценції випробовуваного розчину, відн. од.; I_0 – інтенсивність люмінесценції розчину РСЗ фавіпіравіру, відн. од.; m_0 – маса наважки РСЗ фавіпіравіру, мг; m_1 – наважка порошку розтертих таблеток, мг; b – середня маса таблетки, мг.

Результати кількісного визначення вмісту фавіпіравіру в таблетках наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Результати визначення вмісту фавіпіравіру в таблетках (n = 5; P = 0,95)

Знайдено, мг	Метрологічні параметри
197,56 201,47 203,23 198,03 199,61	$X_{ср}$ = 199,98 S = 2,38 ΔX = 2,95 s_r = 1,19 %

З урахуванням припустимих меж кількісного визначення вмісту фавіпіравіру в таблетках (±5%), застосування запропонованої методики люмінесцентного визначення ФАВ з відносною похибкою до 2% є

припустимим для контролю якості цього лікарського засобу.

Правильність визначення фавіпіравіру в таблетованій лікарській формі перевірено методом "введено-знайдено" на модельних розчинах у присутності допоміжних речовин: целюлоза мікрокристалічна, повідон К-30, натрію кроскармелоза, магнію стеарат, кремнію діоксид колоїдний, Opadry II жовтий 85F38183.

Вміст фавіпіравіру, у міліграмах, досягали введенням в модельні суміші різних аліквот (0,1 мл, 0,5 мл, 1,0 мл) розчину порівняння. Одержані результати наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Результати визначення фавіпіравіру в модельних розчинах методом «введено-знайдено» (n = 5, P = 0,95)

№ з/п	Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	s_r, %
1	1,0	1,05 ± 0,03	1,95
2	5,0	4,98 ± 0,09	1,47
3	10,0	10,12 ± 0,15	1,22

Висновки

Показана можливість використання комплексної сполуки європію (III) з бато-фенантроліном як нового люмінесцентного зонду для визначення фавіпіравіру. Запропонована методика характеризується задовільними метрологічними характеристиками та простотою виконання.

Встановлено оптимальні умови взаємодії люмінесцентного зонду Eu III)-БФ з фавіпіравіром (ФАВ), вивчено спектрально-люмінесцентні властивості різнолігандного комплексу Eu (III)–БФ–ФАВ. Розроблена аналітична форма запропонована для люмінесцентного визначення фавіпіравіру в таблетках. Розроблена методика валідована за наступними показниками: специфічність, лінійність, точність, межа кількісного визначення.

Список використаних джерел

1. Goèmez-Hens A., Aguilar-Caballos M. Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends Anal. Chem.* 2002, 21(2), 131–141. Doi: 10.1016/S0165-9936(01)00139-X.
2. Егорова А.В., Скрипинец Ю.В., Александрова Д.И., Антонович В.П. Сенсибилизированная люминесценция ионов лантанидов и ее применение в биоанализе (обзор). *Методы и объекты химического анализа*, 2010, 5(3), 106–130.
3. Gok E., Ates S. Fluorimetric determination of thyroxine hormone with Eu(III)-(pyridine-2,6-dicarboxylate) tris complex. *J. Fluorescence.* 2003, 13(3), 221–225. Doi: 10.1023/A:1025085715447.
4. Shaghaghi M., Manzoori J.L., Jouyban A. Indirect spectrofluorimetric determination of omeprazole by its quenching effect on the fluorescence of Tb^{3+}-1,10-phenanthroline complex in presence of bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium in caps. *DARU.* 2008, 16(4), 256–262.
5. Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K. et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 2013, 100, 446–454 Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
6. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacol Ther*. 2020, 209, 107512. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107512.
7. Bulduk I. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica.* 2021, 33(3), 209–215. Doi: 10.1556/1326.2020.00828.
8. Liu Cuiyan; Zhang Yuanyuan; Bu Lichao; Liu Yongjin; Liu Lei. Content determination of favipiravir tablets by HPLC. *China Pharmacist.* 2015, 18(7), 1231–1233.

Стаття надійшла до редакції: 05.02.2021.

LUMINESCENT DETERMINATION OF FAVIPIRAVIR USING THE EUROPIUM (III) COMPLEX

Scrypynets Yu.V.[1], Yegorova A.V.[1], Leonenko I.I.[1], Voitiuk O.D.[2]

[1]A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine
[2]"INTERCHEM", Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

Of particular interest in recent years is the possibility of analytical application not only of the effects of sensitizing the luminescence of lanthanide ions, but also its quenching or increase for the indirect determination of a number of drugs. Favipiravir (FAV) - 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide - is an oral antiviral drug approved for the treatment of influenza in Japan. This drug is an analogue of purine nucleosides, which acts as a competitive inhibitor of RNA polymerase required for virus replication.

Favipiravir is capable of forming a complex compound with Eu(III) ions, in which due to intramolecular transfer of excitation energy from the organic ligand to the Eu(III) ion there is a very slight sensitized luminescence of the latter due to dissipation of excitation energy from the triplet level (24390 cm^{-1}), which cannot be used for analytical purposes.

The influence of some surfactants and donor-active substances on the I_{lum} of the Eu(III) –FAV complex is considered. It was found that only batophenanthroline (BPh) significantly increases the luminescence intensity (I_{lum}) of the Eu(III)–FAV complex, approximately 10 times, due to more efficient intramolecular energy transfer from batophenanthroline (18100 cm^{-1}) to the level of europium ions (17300 cm^{-1}). A synergistic effect has been established, which is manifested in the combined action of two complexes (Eu(III)–BPh and Eu(III)–FAV) and exceeds the sum of the I_{lum} of each of them separately. The synergism is caused by formation of a multiligand complex. It was established that a mixed ligand complex Eu(III)–BPh–FAV (1:1:1) is formed.

The possibility of using the complex compound Eu(III)-BPh as a new luminescent probe for the determination of favipivir has been shown. The luminescence intensity is maximum at pH 7.5 (urotropin buffer). The excitation band λ_{exc} = 315 nm was chosen for analytical purposes. It was found that the introduction of different amounts of favipiravir into aqueous solutions of the Eu(III)-BPh complex causes an increase in 4f-luminescence of europium (III) (transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$, λ_{emis} = 615 nm) and the lifetime of its excited state.

Calibration curve was linear over the concentration range of favipivir 0.5-10.0 μg/ml. The developed method is validated by the following parameters: specificity, linearity, accuracy, limit of quantitative determination. The proposed method is characterized by satisfactory metrological characteristics and ease of implementation and can be recommended for the determination of FAV in tablets.

Keywords: sensitized luminescence; europium; favipivir; tablets.

References

1. Goèmez-Hens A., Aguilar-Caballos M. Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends Anal. Chem.* 2002, 21(2), 131–141. Doi: 10.1016/S0165-9936(01)00139-X.
2. Egorova A.V., Skripinets Yu.V., Aleksandrova D.I., Antonovich V.P. Sensibilizirovannaya lyuminestsentsiya ionov lantanidov i ee primenenie v bioanalize (obzor). Metodyi i ob'ektyi himicheskogo analiza, 2010, 5(3), 106–130 (in Russ).
3. Gok E., Ates S. Fluorimetric determination of thyroxine hormone with Eu(III)-(pyridine-2,6-dicarboxylate) tris complex. *J. Fluorescence.* 2003, 13(3), 221–225. Doi: 10.1023/A:1025085715447.
4. Shaghaghi M., Manzoori J.L., Jouyban A. Indirect spectrofluorimetric determination of omeprazole by its quenching effect on the fluorescence of Tb^{3+}-1,10-phenanthroline complex in presence of bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium in caps. *DARU.* 2008, 16(4), 256–262.

5. Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K. et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 2013, 100, 446–454 Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
6. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacol Ther*. 2020, 209, 107512. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107512.
7. Bulduk I. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*. 2021, 33(3), 209–215. Doi: 10.1556/1326.2020.00828.
8. Liu Cuiyan; Zhang Yuanyuan; Bu Lichao; Liu Yongjin; Liu Lei. Content determination of favipiravir tablets by HPLC. *China Pharmacist*. 2015, 18(7), 1231–1233.