

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH TỔNG HỢP 2 METHYL - 5 NITROIMIDAZOLE

TS. Lê Văn Huỳnh*, Nguyễn Thị Ngọc Mai, Đặng Thị Hằng

Trường Đại học Thành Đông

*Email: lehuynh1058@gmail.com

TÓM TẮT

Tiền chất 2-Methyl-5-nitroimidazole được sử dụng để tổng hợp thuốc kháng sinh Metronidazole dùng để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Quá trình nghiên cứu tổng hợp 2-Methyl-5-nitroimidazole đã đưa ra được các thông số tối ưu cho phản ứng nitro hóa 2-methyl-1H-imidazole để tạo ra sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole như sau: Tỷ lệ số mol 2-methyl-1H-imidazole với thể tích acid HNO_3 là 1mol / 125ml; Nhiệt độ của phản ứng là 140 – 150 °C; pH của môi trường phản ứng là 5 – 6. Hiệu suất đạt 98%. Tinh thể có màu vàng nhạt và có điểm chảy ở 250 – 252 °C. Bài báo này là kết quả nghiên cứu tổng hợp tiền chất 2-Methyl-5-nitroimidazole và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng vào các quá trình công nghệ sản xuất, góp phần giải quyết vấn đề tự chủ nguồn nguyên liệu được tại Việt Nam.

Từ khóa: Tổng hợp; 2-Methyl-5-nitroimidazole; yếu tố ảnh hưởng.

ABSTRACT

The precursor 2-Methyl-5-nitroimidazole is used to synthesize the antibiotic Metronidazole used to treat bacterial infections. The process of synthesizing 2-Methyl-5-nitroimidazole gave the optimal parameters for the nitration reaction of 2-methyl-1H-imidazole to produce 2-methyl-5-nitroimidazole products as follows: The molar ratio of 2-methyl-1H-imidazole to the volume of HNO_3 acid is 1mol / 125ml; The reaction temperature is 140 – 150°C; The pH of the reaction medium is 5 – 6; The efficiency is 98%. The crystals are pale yellow and have a melting point at 250 – 252°C; This article is the result of research on synthesis of 2-Methyl-5-nitroimidazole precursor and factors affecting the synthesis. The research results are the scientific basis for application to the production technology process, contributing to solving the problem of self-reliance in pharmaceutical raw materials in Vietnam.

Keyword: The process of synthesizing; 2-Methyl-5-nitroimidazole; factors influencing

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Metronidazole là loại thuốc kháng sinh được sử dụng rộng rãi, với công dụng đặc trị các bệnh nhiễm khuẩn do các vi khuẩn gây ra như: lỵ amip gây nên tình trạng nhiễm trùng đường ruột, phá hủy hệ tiêu hóa và suy giảm chức năng thận dẫn đến tử vong. Metronidazole là hoạt chất có khả năng chống các vi khuẩn yếm khí, metronidazole đã được đưa vào sử dụng làm thuốc để điều trị các bệnh apxe viêm nhiễm chân răng và lợi, ngoài ra cũng được sử dụng trong điều trị bệnh có liên quan tới dạ dày.

Bệnh do amip phổ biến ở các vùng khí hậu nhiệt đới, do điều kiện vệ sinh kém có thể gây ra các đại dịch nguy hiểm. Ở Việt Nam, tỷ lệ người lành mang mầm bệnh lỵ amip có nơi lên đến 25%. Lứa tuổi mắc bệnh nhiều nhất ở 20 – 30 tuổi. Bệnh lỵ amip ruột do trùng kiết lỵ thâm nhập vào ruột để nuốt hồng cầu ở đó. Bệnh nhân đau bụng vật, hay đi ngoài cho phân có lẫn máu và chất nhầy như nước mũi. Nếu điều trị không đúng, bệnh dễ tái phát và gây apxe gan. Bệnh lỵ amip gan dẫn đến viêm gan, gan hóa mủ, gan to, sốt cao. Gan hóa mủ có thể gây tràn mủ màng phổi và gây áp-xe phổi.

Người bệnh mắc lỵ amip do ăn phải các kén sống từ nước, thực phẩm không đảm bảo vệ sinh. Khi kén xâm nhập vào cơ thể qua đường miệng, đến ruột non thì vỏ bao của amip sẽ bị dịch tiêu hóa phá vỡ trở thành amip ở dạng hoạt động, xâm nhập vào niêm mạc ruột gây viêm ruột hoặc đi vào máu tới các cơ quan gây apxe như gan, phổi, não... nhưng thường gặp là bệnh amip đường ruột.

Thuốc thường được sử dụng là

metronidazol, đây là một loại thuốc rất đắng, cần phải uống sau khi ăn no để tránh những cảm giác khó chịu do thuốc như cảm giác đắng miệng khi uống nước, cảm giác chóng mặt nhẹ, buồn nôn.

Nhóm thuốc Imidazole thường được dùng để điều trị lỵ amip. Thuốc khuếch tán, thâm nhập sâu vào bên trong và phá hủy hay ức chế sự tổng hợp AND của ký sinh trùng. Loại thuốc này có ưu điểm diệt được cả thể kén và thể đơn bào amíp.

Metronidazol chuyển hóa ở gan thành các chất chuyển hóa dạng hydroxy và acid và thải trừ qua nước tiểu một phần dưới dạng glucuronid.

Cùng với các dòng kháng sinh β -lactam, quinolon, các imidazole là một dòng kháng sinh thiết yếu và rất quan trọng được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, ký sinh trùng và virus.

Hàng năm, Việt Nam tiêu thụ khoảng 700 tấn thuốc kháng sinh các loại cho điều trị bệnh, với tổng giá trị khoảng 200 triệu USD. Yêu cầu tự chủ nguồn thuốc trong nước đã và đang trở thành một vấn đề cấp thiết. Nhu cầu về nhóm thuốc imidazole trị các ký sinh trùng là rất lớn. Tuy nhiên tất cả các thuốc nhóm này hiện có ở Việt Nam đều là thuốc ngoại nhập.

Sử dụng 2-Metyl-1H-imidazole được nitro hoá dưới tác dụng của xúc tác H_2SO_4 đặc, Na_2SO_4 gia nhiệt sẽ thu được sản phẩm 2-Methyl-5-nitroimidazole.

Hoặc có thể sử dụng phương pháp tổng hợp định hướng nhóm nitro vào vị trí C4 trên nhân imidazole để sản xuất

một số thuốc đồng 4-nitroimidazole chống virus, ung thư và HIV.

Bài báo này là kết quả nghiên cứu tổng hợp tiền chất 2-Methyl-5-nitroimidazole và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng vào các quá trình công nghệ sản xuất, góp phần giải quyết vấn đề tự chủ nguồn nguyên liệu dược tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất và dụng cụ

Hóa chất được sử dụng của hãng Merck, Đức gồm: 2-Methyl-1H-imidazole, H_2SO_4 đặc, HNO_3 98%, Na_2SO_4 , dung dịch NH_3 25% và dung dịch NaOH đều có độ tinh khiết 99,9%, bình cầu 3 cổ 500ml, 1000ml, bản mỏng silica gel F254 Merck.

Hệ thiết bị sắc ký lỏng LC-MSD-Trap-SL Agilen 1100 của Đức.

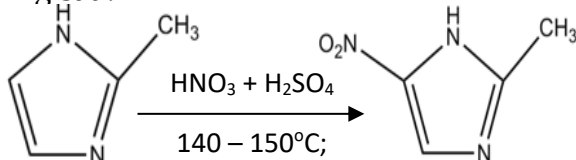
Hệ thống thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân NMR Bruker AVANCE 500 MHz, của Thụy sỹ.

Máy đo điểm nóng chảy Buechi-Melting Point B540 của Đức.

Máy đo phổ tử ngoại với cuvet thạch anh 1cm của hãng Hitachi Nhật Bản; Máy đo phổ UV – VIS của Heidelberg Đức.

2.2. Quy trình tổng hợp 2-methyl-5-nitroimidazole

Tổng hợp 2-methyl-5-nitroimidazole như sau: Từ 2-methyl-1H-imidazole được nitro hoá bằng acid HNO_3 thu được 2-methyl-5-nitroimidazole theo phương trình phản ứng sau:



Lấy 164 gam 2-methyl-1H-imidazole cho vào bình cầu 3 cổ được hoà tan trong 276ml nước, 352ml acid H_2SO_4 đặc và 576 gam Na_2SO_4 khan. Khuấy trộn hỗn hợp và đun hồi lưu ở $130^\circ C$ đến khi hỗn hợp tan hoàn toàn. Tiến hành nhỏ từ từ 252 ml dung dịch acid HNO_3 99% và luôn duy trì nhiệt độ ở $130^\circ C$. Tiếp đó gia nhiệt hỗn hợp đến $150^\circ C$ và duy trì ở nhiệt độ này trong 4h.

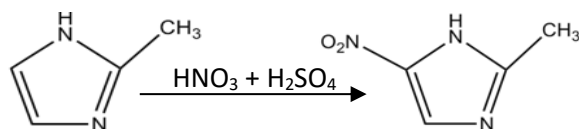
Sau khi phản ứng kết thúc, để nguội hỗn hợp xuống $60 - 70^\circ C$, rót toàn bộ hỗn hợp sang cốc có chứa 1200 ml nước lạnh và điều chỉnh pH của hỗn hợp về $pH = 5 - 6$ bằng dung dịch NH_3 25%.

Khuấy trộn hỗn hợp ở nhiệt độ $30 - 40^\circ C$ trong khoảng 30 phút. Lọc, rửa kết tủa bằng nước sạch, rồi sấy khô ở nhiệt độ $60 - 70^\circ C$, thu được 2-methyl-5-nitroimidazole với hiệu suất đạt 96%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tổng hợp 2-Methyl-5-nitroimidazole

Từ 2-methyl-1H-imidazole được nitro hoá bằng acid HNO_3 thu được 2-methyl-5-nitroimidazole. Sử dụng tác nhân xúc tác H_2SO_4 đặc và Na_2SO_4 . Duy trì nhiệt độ ở khoảng $140 - 150^\circ C$ theo phương trình phản ứng:

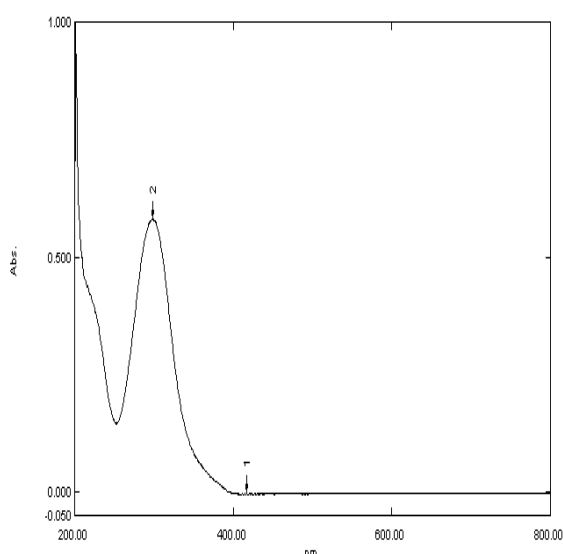


Nếu sử dụng acid H_2SO_4 đậm đặc thì khi phản ứng, một phần của acid sẽ bị tạo muối imidazole bisunfat làm giảm mạnh nồng độ acid trong hỗn hợp nitro hóa dẫn đến dừng phản ứng. Do đó phải dùng lượng dư acid H_2SO_4 , điều này khó thực

hiện trong qui mô công nghiệp và làm tăng giá thành.

Nhiệt độ phản ứng cao hơn 130°C , phần lớn lượng nước đưa vào ban đầu sẽ bị bốc hơi hết. Lượng nước mới sinh ra trong quá trình phản ứng lại tạo ra NO_2 lại gây ảnh hưởng xấu đến phản ứng nitro hóa.

Việc đưa Na_2SO_4 sẽ là một lựa chọn thích hợp và rẻ tiền. Na_2SO_4 làm tác nhân hút nước và duy trì nồng độ sunfat. Thực hiện phản ứng theo cách

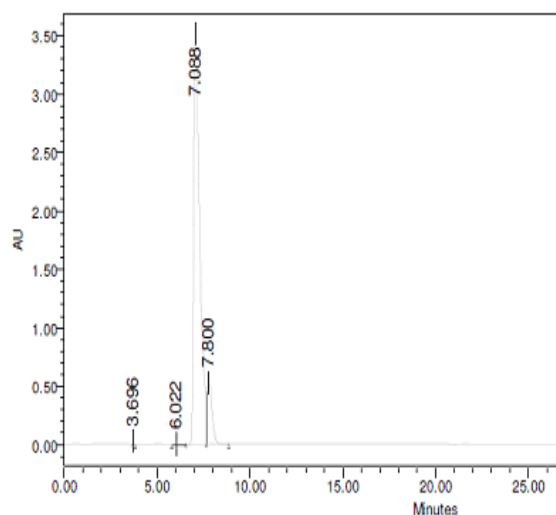


Hình 1: Phổ UV của 2-methyl-5-nitroimidazole

Phân tích hàm lượng và cấu trúc các sản phẩm sau phản ứng, sử dụng đồng thời các phương pháp phân tích: Phương pháp phân tích bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR; Phân tích khối phổ MS; Phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC); Phân tích bằng phổ hấp thụ hồng ngoại.

Kết quả phân tích HPLC cho thấy: Trên phổ đồ có 1 pic chính, thời gian lưu 7,088 phút chính là sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole, chiếm hơn

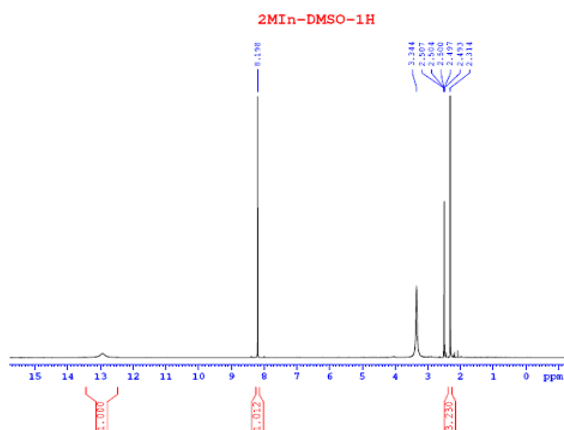
này sẽ định hướng thế nhóm nitro vào vị trí C5 của vòng imidazole, sản phẩm thế C4 xuất hiện với hiệu suất không đáng kể. Theo dõi tiến trình phản ứng nitro hóa bằng phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) với hệ dung môi triển khai là etanol/toluen với tỉ lệ thể tích là 9/1, hiện vật chất 2-methyl-5-nitroimidazole soi dưới đèn UV ở bước sóng 366 nm trên máy UVIS Heidelberg được thể hiện trên hình 1.



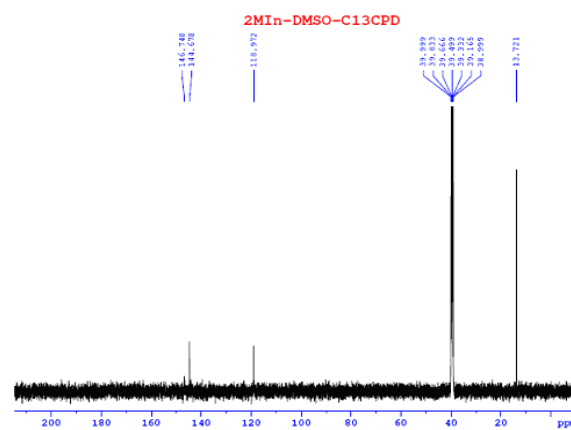
Hình 2: Sắc ký đồ HPLC của 2-methyl-5-nitro-imidazole

98%. Sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole độ sạch 98% có bước sóng hấp phụ cực đại ở 292 nm được thể hiện trên hình 2.

Kết quả phân tích bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR: ^1H -NMR (500MHz; DMSO-d_6); $\delta(\text{ppm})$: 8,20 s (1H, H-4); 2,31 s (3H, CH_3 - C-2). ^{13}C -NMR (500MHz; DMSO-d_6); $\delta(\text{ppm})$: 144,67 s (C-2); 118,97 d (C-4); 146,74 s (C-5); 13,72 q (CH_3).



Hình 3: Phổ ^1H NMR



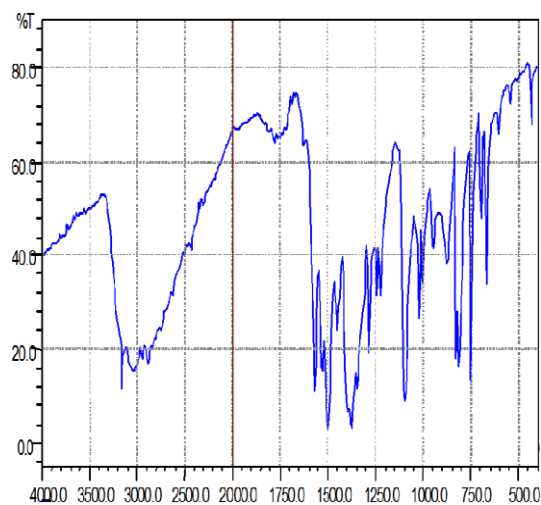
Hình 4: Phổ ^{13}C NMR

Phân tích bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho thấy: Trên phổ ^1H NMR có tín hiệu của nhóm methyl tại 2,31 và chỉ có 1 tín hiệu của ^1H nhân thơm tại 8,20 ppm. Điều này cho thấy phản ứng thế electrophin nhân thơm vào vòng imidazole đã được thực hiện, được thể hiện trên hình 3.

Trên phổ ^{13}C NMR của sản phẩm, ngoài tín hiệu nhóm methyl tại 13,72 ppm, còn thấy xuất hiện các tín hiệu tại 146,74; 144,67 và 118,97 ppm được thể hiện trên hình 4.

Phổ hồng ngoại của 2-methyl-5-nitroimidazole được thể hiện trên hình 5.

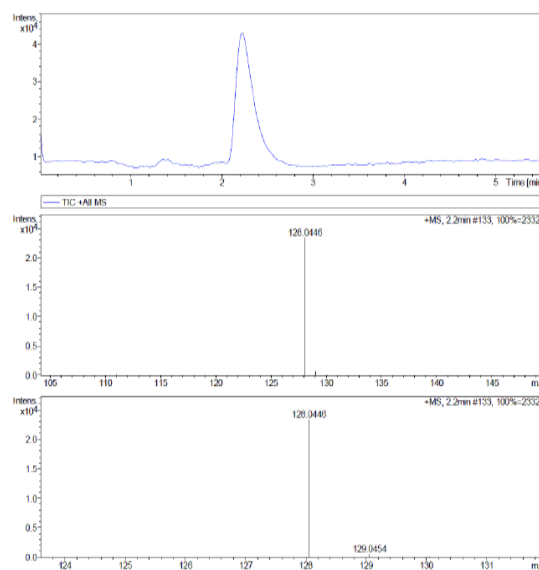
Phổ MS của 2-methyl-5-nitroimidazole được thể hiện trên hình 6.



Hình 5: Phổ hồng ngoại của 2-methyl-5-nitroimidazole

Như vậy sản phẩm nitro hóa thu được có cấu trúc hoàn toàn phù hợp với phân tử 2-methyl-5-nitroimidazol. Tiến hành đo điểm chảy của sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole trên máy đo điểm chảy Buechi-Melting Point B540: Dùng capilar lấy mấy hạt tinh thể 2-methyl-5-nitroimidazole, hàn kín một đầu capilar rồi đặt vào máy đo điểm chảy đã được đặt trước ở nhiệt độ 100°C .

Tiến hành gia nhiệt rồi quan sát cho thấy: Ở nhiệt độ 240°C tinh thể ngả dần sang màu vàng nhạt và ở nhiệt độ $250^\circ\text{C} - 252^\circ\text{C}$, tinh thể hóa lỏng màu vàng sẫm.



Hình 6: Phổ MS của 2-methyl-5-nitroimidazole

3.2. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng nitro hóa

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ số mol 2-methyl-1H-imidazole với thể tích acid HNO_3

Tiến hành phản ứng nitro hóa của 2-methyl-1H-imidazole với hỗn hợp acid HNO_3 trong H_2SO_4 đặc. Acid HNO_3 trong quá trình phản ứng đóng vai trò vừa là tác nhân phản ứng, đồng thời cũng là dung môi cho phản ứng. Chính vì vậy, Tỷ lệ giữa số mol 2-methyl-1H-imidazole với thể tích acid HNO_3 sẽ ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất của phản ứng. Lượng acid H_2SO_4 đặc với lượng acid HNO_3 theo tỷ lệ 1 : 1,4.

Nồng độ của 2-methyl-imidazole là 1mol. Độ pH của môi trường phản ứng được duy trì ở 5 – 6. Nhiệt độ phản ứng luôn được ổn định ở 150°C . Thời gian tiến hành phản ứng là 4h. Thay đổi thể tích dung dịch acid HNO_3 lần lượt là 100ml; 110ml, 115ml, 120ml, 125ml , 130ml và 135ml. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên bảng 1 cho thấy:

Số mol của 2-methyl-imidazole được giữ cố định là 1mol. Khi thể tích của acid HNO_3 98% tăng lên thì hiệu suất của phản ứng thu được 2-Methyl-5-nitroimidazole cũng tăng lên. Nhưng khi thể tích acid HNO_3 tăng lên đến 125ml thì hiệu suất phản ứng đạt cao nhất đến 97,3%.

Khi thể tích acid HNO_3 tăng lên thì hiệu suất phản ứng lại giảm. Sản phẩm thu được kết tinh sạch, không cần phải tinh chế. Tỷ lệ tối ưu của các chất tham gia phản ứng: số mol 2-methyl-imidazole / Thể tích HNO_3 là 1mol / 125ml.

Bảng 1: Ảnh hưởng của thể tích acid HNO_3 đến hiệu suất phản ứng nitro hóa.

Số mol 2-methyl-imidazole / Thể tích acid HNO_3 (mol / ml)	Hiệu suất phản ứng (%)
1 / 115	82,4
1 / 120	88,5
1 / 125	98,1
1 / 130	89,7
1 / 135	81,9

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất phản ứng

Tổng hợp 2-methyl-5-nitroimidazole đi từ 2-methyl-1H-imidazole và hỗn hợp acid $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$. Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng trong quá trình phản ứng. Cố định tỉ lệ số mol 2-methyl-1H-imidazole là 1mol và thể tích acid HNO_3 là 1mol / 125ml. Tỉ lệ acid H_2SO_4 : HNO_3 là 1 : 1,4.

Tiến hành khảo sát ở khoảng nhiệt độ $120 - 160^\circ\text{C}$, thời gian phản ứng là 4h, pH phản ứng luôn được duy trì là 5 – 6. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên bảng 2 cho thấy:

Bảng 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất phản ứng

Nhiệt độ phản ứng ($^\circ\text{C}$)	Hiệu suất phản ứng (%)
120 – 130 $^\circ\text{C}$	61,7
130 – 140 $^\circ\text{C}$	67,3
140 – 150 $^\circ\text{C}$	98,1
150 – 160 $^\circ\text{C}$	81,6

Khi nhiệt độ tăng thì hiệu suất của phản ứng cũng tăng lên và đạt hiệu suất cao nhất 98 % khi nhiệt độ trong khoảng $140 - 150^\circ\text{C}$. Nhưng khi nhiệt độ tăng cao hơn 150°C thì hiệu suất phản ứng lại giảm. Khi nhiệt độ phản ứng cao hơn

160°C, lúc này acid HNO_3 bị phân hủy làm giảm lượng tác nhân thể electrophin NO_2^+ tạo thành, dẫn đến hiệu suất phản ứng giảm.

Như vậy, nhiệt độ tối ưu cho phản ứng tổng hợp 2-methyl-5-nitroimidazole là 140 – 150°C.

3.2.3. Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất phản ứng

Tiến hành cố định nhiệt độ phản ứng ở 150°C. Thời gian tiến hành phản ứng là 4h,. Tỷ lệ số mol 2-methyl-1H-imidazole là 1mol với thể tích acid HNO_3 là 1 : 125ml. Tỷ lệ acid H_2SO_4 : HNO_3 là 1 : 1,4. Khảo sát hiệu suất phản ứng thu được sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole ở các khoảng pH môi trường phản ứng khác nhau. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên bảng 3 cho thấy:

Bảng 3: Ảnh hưởng của pH tới hiệu suất phản ứng

pH môi trường phản ứng	Hiệu suất phản ứng (%)
3 – 4	67,3
4 – 5	78,5
5 – 6	97,9
6 – 7	69,7
> 7	45,9

Khi pH của môi trường phản ứng tăng lên thì hiệu suất phản ứng cũng tăng lên và đạt hiệu suất cao nhất 98% khi pH trong khoảng 5 – 6, sản phẩm kết tinh sạch, không cần phải tinh chế.

Ở pH thấp, 2-methyl-5-nitroimidazole không kết tủa hoàn toàn, làm giảm hiệu suất thu nhận sản phẩm. Ở pH > 7, hiệu suất phản ứng giảm dần.

Như vậy, khoảng pH tối ưu của phản ứng nằm trong khoảng 5 – 6.

Tóm lại: Các thông số tối ưu cho phản ứng nitro hóa 2-methyl-1H-imidazole để tạo sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole như sau: Tỷ lệ số mol 2-methyl-1H-imidazole với thể tích acid HNO_3 là 1mol / 125ml; Nhiệt độ của phản ứng là 140 – 150°C; pH của môi trường phản ứng là 5 – 6. Hiệu suất đạt 98%. Tinh thể 2-methyl-5-nitroimidazole có màu vàng nhạt và có điểm chảy ở 250 – 252°C, không tan trong nước, nhưng tan trong acid và kiềm, ít tan trong ethanol.

4. KẾT LUẬN

Đã tổng hợp được 2-methyl-5-nitroimidazole với hiệu suất đạt 98%.

Các thông số tối ưu cho phản ứng nitro hóa 2-methyl-1H-imidazole để tạo sản phẩm 2-methyl-5-nitroimidazole như sau:

Tỷ lệ số mol 2-methyl-1H-imidazole với thể tích acid HNO_3 là 1mol / 125ml;

Nhiệt độ của phản ứng là 140 – 150°C; pH của môi trường phản ứng là 5 – 6.

Tinh thể 2-methyl-5-nitroimidazole có màu vàng nhạt và có điểm chảy ở 250 – 252°C.

TÀI LIỆU TRÍCH DẪN

- [1] Lexi-Comp. (2009), “Metronidazole Drug Information Provided by Lexi-Comp”, *Merck Manuals Medical Library*.
- [2] Edwards, DI.(2014) “Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms”, *Journal Antimicrobial*.
- [3] Trindade LC, Biondo-Simões Mde L, Sampaio CP, Farias RE, Pierin RJ, Netto MC.(2010) “Evaluation of topical metronidazole in the healing wounds process: an experimental study”, *Rev Col Bras Cir*, 37(5):358 – 363, PubMed.
- [4] Pradeep AR, Kumari M, Priyanka N, Naik SB.(2012) “Efficacy of chlorhexidine, metronidazole and combination gel in the treatment of gingivitis--a randomized clinical trial”. *J Int Acad Periodontol*, 4(4), 91 – 96. PubMed.
- [5] Menendez D, Bendesky A, Rojas E, Salamanca F, Ostrosky-Wegman P.(2002) “Role of P53 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolite”, *Mutat Res*. 501(1-2):57 – 67.
- [6] Pradeep AR, Kumari M, Priyanka N, Naik SB.(2012) “Efficacy of chlorhexidine, metronidazole and combination gel in the treatment of gingivitis--a randomized clinical trial”, *J Int Acad Periodontol* 14(4):91 – 96.
- [7] Pattanayak P, Kaliyaperumal S. Design,(2022) “synthesis, characterization and in vitro antimicrobial and anthelmintic evaluation of metronidazole derivatives modified at position 1”, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 56:191–196.
- [8] Benassi A, Doria F, Pirota V. (2020)“Groundbreaking Anticancer Activity of Highly Diversified Oxadiazole Scaffolds”, *Int J Mol Sci*. 21.
- [9] Lelyukh M, Martynets M, Kalytovska M, Drapak I, Harkov S, Chaban T, et al.(2020) “Approaches for synthesis and chemical modification of non-condensed heterocyclic systems based on 1, 3, 4-oxadiazole ring and their biological activity: A review”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 10:151– 165.
- [10] Zarafu I, Matei L, Bleotu C, Ionita P, Tatibouet A, Paun A, et al.(2020) “Synthesis, Characterization, and Biologic Activity of New Acyl Hydrazides and 1,3,4-Oxadiazole Derivatives”, *Molecules*. 25.