การสังเคราะห์และการแยกอิแนนทิโอเมอร์ของสารมัธยันตร์อิปอกไซด์ และออกซาโซลิดิโนนของยาปฏิชีวนะลีเนโซลิดด้วยการใช้ HPLC และ GC โครมาโตกราฟีที่มีไครัลคอลัมน์ชนิดพิเศษ

SYNTHESIS AND THE SEPARATION OF ENEATIOMERIC EPOXIDE AND OXAZOLIDINONE INTERMEDIATES FOR ANTIBIOTIC LINEZOLID USING HPLC AND GC CHROMATOGRAPHY BEARING SPECIFIC CHIRAL COLUMNS

อนวัช อาชวาคม*, *ธนกฤต จันทรา*

Anawat Ajavakom*, *Thanakrit Chantra*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand.

****Corresponding author, E-mail:*** *anawat77@hotmail.com*

บทคัดย่อ

การพัฒนากรรมวิธีการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิด (Linezolid) หรือที่มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Zyvox® ซึ่งสามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้และมีปริมาณการนำเข้าแต่ละปีสูงนั้นมีความสำคัญ ผู้วิจัยได้พัฒนากรรมวิธีใหม่ในการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ของยาปฏิชีวนะลีเนโซลิดนี้โดยใช้ปฏิกิริยาแอลคิเลชันของสารคาร์บาเมต และปฏิกิริยาการปิดวงภายในโมเลกุลที่มีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของสารอิปอกไซด์ ปฏิกิริยาแอลคิเลชันสามารถให้ผลิตภัณฑ์อิปอกไซด์ในเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่สูงที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถเพิ่มค่าเปอร์เซ็นต์อีแนนทิโอเมอริกเอ็คเซส (Percentage enantiomeric excess, %ee) ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า -60°C ปฏิกิริยาการปิดวงโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบไครัลออกซาโซลิดิโนนนั้นไม่ขึ้นต่ออุณหภูมิและให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ 80-90% อย่างไรก็ตาม %ee ที่ได้จะต่ำกว่าของสารตั้งต้น ในการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาแอลคิเลชันและปฏิกิริยาการเกิดวงออกซาโซลิดิโนนพบว่า GC และ HPLC ที่มีคอลัมน์เป็นแบบไครัลชนิดพิเศษสามารถใช้ในแยกของอนุพันธ์ในระบบที่พัฒนาได้ โดยที่ GC ที่มีเฟสคงที่แบบ OV-1701 สามารถแยกสารในระบบที่มีหมู่แทนที่ของอะตอมไนโตรเจนเป็นหมู่ฟีนิลได้ และ HPLC ติดตั้งด้วยคอลัมน์ OJ-H และ OD สามารถใช้ในการแยกสารมัธยันตร์ประเภทอิปอกไซด์ **2B-(*S*)**

และสารมัธยันตร์ประเภทออกซาโซลิดิโนน **3B-(*R*)** ได้ตามลำดับ โดยที่ค่า R_s ของสารทั้งสองนี้คือ 1.88 และ 14.70 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแยกที่อยู่ในระดับที่ดีพอใช้ และสมบูรณ์ตามลำดับ

คำสำคัญ: ปฏิกิริยาการปิดวงภายในโมเลกุล ออกซาโซลิดิโนน ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิด การแยกสารอิแนนทิโอเมอร์

Abstract

The development of synthetic methodology for antibiotic Linezolid or so called commercially Zyvox®, which can well resist positive gram bacteria and have to be imported annually in large quantity, is of importance. We have then developed the novel way of synthesizing intermediate of this antibiotic Linezolid, in which there are two main strategic reactions; the alkylation reaction of carbamate derivative and the acid-induced intramolecular cyclisation of the obtained epoxide derivative. The alkylation reaction could generate the epoxide product in high yield at room temperature, but the decrease in reaction temperature below -60°C could help to increase the yield. The acid-induced intramolecular cyclisation for the construction of the oxazolidinone building block is independent to the reaction temperature and able to provide the product in 80-90%, however, percentage enantiomeric excess (%ee) of the product was obtained in lower level than that of the starting materials. In order to isolate the products from these alkylation reaction and oxazolidinone ring formation reaction, GC and HPLC equipped with special chiral column were developed. GC with OV-1701 type stationary phase was used to isolate compounds in the system having the phenyl group as the nitrogen atom substitution, and HPLC bearing OJ-H and OD column could isolate the epoxide type intermediate and the oxazolidinone type intermediate, respectively. The Rs values of epoxide compound **2B-(*S*)** and oxazolidinone compound **3B-(*R*)** were 1.88 and 14.70, respectively, demonstrated the acceptably good and the perfect isolation capability, respectively.

Keywords: Intramolecular Cyclisation, Oxazolidinone, Antibiotic Linezolid, Separation of Enantiomers

บทนำ

สารประกอบอสมมาตรที่มีไครัลเซ็นเตอร์นั้นมีคู่ไอโซเมอร์ของตัวเองซึ่งจะมีสูตรเคมีเหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันเพียงโครงสร้างที่เป็นภาพในกระจกของโมเลกุลอสมมาตรเดิมซึ่งโดยทั่วไปเราจะเรียกว่าไอโซเมอร์เชิงแสง โดยที่คู่ไอโซเมอร์นี้จะมีสมบัติทางกายภาพเหมือนกันทุกประการยกเว้นการบิดระนาบแสงนั้นมักจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยการตกผลึกหรือการกลั่นลำดับส่วน สมบัติทางเคมีโดยทั่วไปไม่แตกต่างกันอาจแตกต่างกันบ้างก็ในกรณีของปฏิกิริยาที่มีไอโซเมอร์เชิงแสงอื่นๆ อยู่ด้วย หรือปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงเฉพาะออปติคัลไอโซเมอร์ชนิดเดียว นอกจากนี้ในธรรมชาติเองก็มีสารหลายชนิดที่บิดระนาบแสงได้ แต่จะมีเพียงไอโซเมอร์เดียวเท่านั้นที่จะเกิดปฏิกิริยาทางเคมี หรือออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังตัวอย่างของสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาโรคต่างๆ ก็มักจะมีไอโซเมอร์เดียวเท่านั้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ [1]

การแยกสารราเซมิค (Racemic) ที่มีไอโซเมอร์เชิงแสงทั้งสองชนิดผสมกันอยู่ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันนั้นในทางเคมีมีการศึกษากันมาแต่โบราณ ยุคเมื่อเกือบ 150 ปีที่แล้ว ซึ่งสมัยนั้นยังเป็นยุคบุกเบิก ไม่มีเครื่องมือการแยกที่ทันสมัยเหมือนในปัจจุบัน กรรมวิธีการแยกที่ใช้กันในยุคต้นๆ มี 3 วิธีหลักๆ โดยวิธีที่ 3 เป็นการนำเอาศาสตร์ทางชีวเคมีมาประยุกต์ใช้ในการแยก

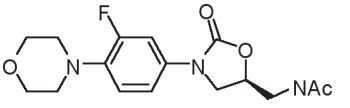
1) การแยกโดยใช้มือเลือกเอาไอโซเมอร์เชิงแสงที่มีรูปร่างหรือรูปลักษณ์ภายนอกที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดออกจากกัน

2) การแยกโดยใช้กรรมวิธีทางเคมีคือการนำเอาสารผสมไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่เป็นไครัลอีกชนิดหนึ่งซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นไอโซเมอร์เชิงแสงซึ่งกันและกัน แล้วค่อยนำไปแยกโดยวิธีทางกายภาพต่อไป [2]

3) การแยกโดยวิธีทางชีวเคมีซึ่งใช้แบคทีเรียหรือเอนไซม์ชนิดพิเศษที่สามารถกินหรือย่อยสลายเฉพาะไอโซเมอร์เดียวเท่านั้นและทำให้แยกไอโซเมอร์ที่เหลือออกมาได้ [3]

เครื่องมือที่ใช้ในการดูความแตกต่างทางสเตอริโอเคมีของสารจำพวกไครัลได้ในสมัยนั้นก็มีแค่เครื่องวัดค่าเชิงแสง ซึ่งก็อาศัยหลักการง่ายๆ คือ การส่องแสงโพลาไรซ์ไปยังผลึกของสารที่วัดนั้นๆ และสารประกอบที่มีคุณสมบัติเชิงแสงที่แตกต่างกันก็จะสามารถบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ในค่าที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบที่เป็นไอโซเมอร์เชิงแสงต่อกันจะมีค่าการบิดระนาบแสงในทิศทางตรงกันข้าม อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัดคือสามารถบอกความแตกต่างได้ชัดเจนก็เฉพาะในกรณีที่สารนั้นมีความบริสุทธิ์ทางสเตอริโอเคมีแล้วเท่านั้น เมื่อเวลาผ่านไปวิวัฒนาการทางด้านเทคโนโลยีในการแยกสารประเภทดังกล่าวก็มีการพัฒนาขึ้น ซึ่งในปัจจุบันการแยกสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันในเชิงอิแนนทิโอเมอร์นี้สามารถกระทำได้ง่ายขึ้นไม่ว่าจะเป็นกรรมวิธีแยกโดยใช้เครื่องมือที่ทันสมัยอาทิเช่น High performance liquid chromatography (HPLC) หรือ Gas chromatography (GC) ซึ่งจะสามารถแยกสารคู่ไอโซเมอร์ออกจากกันได้ [4] หรือการแยกด้วยเยื่อเมมเบรนชนิดใหม่ที่ได้รับการพัฒนาให้สารคู่อิแนนทิโอเมอร์เพียงชนิดเดียวที่ผ่านเยื่อได้ [5] รวมไปถึงการแยกด้วยกรรมวิธีการสกัดด้วยของเหลวเหนือจุดวิกฤต (Supercritical fluid extraction) [6] เป็นต้น ในจำนวนนี้ถ้าต้องการแยกสารผสมในปริมาณที่น้อยกรรมวิธีในการแยกด้วย HPLC ที่มีคอลัมน์ชนิดพิเศษซึ่งได้รับการพัฒนาให้สามารถแยกสารอิแนนทิโอเมอร์หรือแม้กระทั่งสารไดแอสเตอริโอไอโซเมอร์ (Diastereoisomer) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ก็จะเป็นวิธีที่เหมาะสม

ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิด (Linezolid) หรือที่มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Zyvox® [7] (**ภาพที่ 1**) ยาปฏิชีวนะตัวนี้มีคุณสมบัติที่ดีเลิศในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมักจะมีแนวโน้มการดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะทั่วไป [8] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการผลิตหรือสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรมยาภายในประเทศ เพราะฉะนั้นแต่ละปีประเทศไทยจึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำเข้ายาชนิดนี้จากต่างประเทศในปริมาณที่มากคิดเป็นเงินถึง 10 ล้านบาทต่อปี [9] จากมูลเหตุจูงใจดังกล่าวจึงทำให้เรามีแนวคิดที่จะพัฒนากรรมวิธีการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิดดังกล่าวเพื่ออาจจะสามารถเป็นพลังอีกแรงถึงแม้จะไม่มากที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในทางอุตสาหกรรมการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยาของประเทศไทยเพื่อความเจริญแบบยั่งยืน



Linezolid

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะลีเนโซลิด

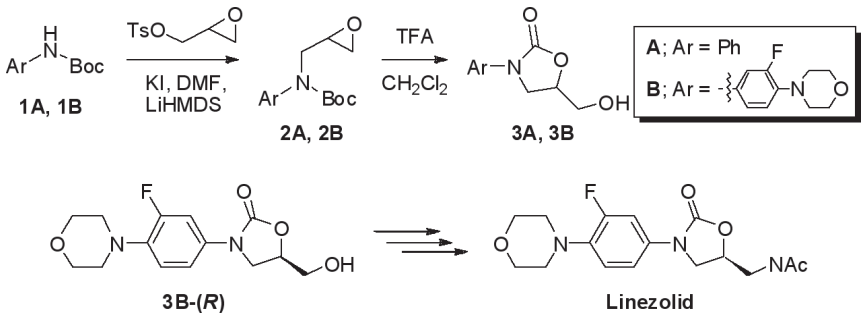
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือการพัฒนากรรมวิธีใหม่ในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิด (Linezolid) หรือที่มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Zyvox® โดยแยกสารไครัลจำพวกไครัลอีปอกไซด์และไครัลออกซาโซลิดิโนนซึ่งมีความสำคัญในทางการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิด (Linezolid) ดังกล่าว

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์ (Synthesis)

การสังเคราะห์หลักมีอยู่สองขั้นตอนคือขั้นตอนแรกปฏิกิริยาแอลคิเลชันของไกลซิดิลทอซิเลต (Glycidyl tosylate) กับแอริลคาร์บาเมต (Aryl carbamate) **1** ที่ได้จากการนำเอาอนุพันธ์แอนิลีนนั้นๆ มาทำปฏิกิริยากับ Boc_2O และขั้นตอนที่สองคือปฏิกิริยาการสังเคราะห์วงออกซาโซลิดิโนน (Oxazolidinone) ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติค (TFA) [10] (**สมการที่ 1**) ซึ่งช่วงปฐมภูมิจะเป็นการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบ **3A** และจากนั้นจะนำเอาสภาวะที่เหมาะสมนั้นไปประยุกต์เข้ากับกรณีของสารประกอบ **3B** ที่สามารถใช้เป็นสารมัธยันตร์ในการสังเคราะห์ยาลีเนโซลิดได้ ซึ่งในรายละเอียดเราสามารถสังเคราะห์ยาลีเนโซลิดจากสารไครัลตั้งต้นด้วยกรรมวิธีที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว[11]



สมการที่ 1 การสังเคราะห์ของสารประกอบ Oxazolidinones **3A**, **3B** และ Linezolid

2. การศึกษาความจำเพาะของอีแนนทิโอเมอร์ (Study of Enantioselectivity)

ในกระบวนการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิดที่เราได้พัฒนานั้น เราได้สารประกอบมัธยันตร์ที่มีเปอร์เซ็นต์อีแนนทิโอเมอริกแอ็คเซส (Percentage enantiomeric excess, %ee) ที่ต่ำ เราได้พยายามปรับปรุงเทคนิคและสภาวะต่างๆ ของปฏิกิริยาแล้วแต่ผลก็ยังไม่สามารถให้ %ee ที่สูงเป็นที่น่าพอใจได้ แต่สิ่งที่เราได้คือการพัฒนาการแยกสารประกอบจำพวกไครัลอีปอกไซด์และไครัลออกซาโซลิดิโนนด้วยไครัลคอลัมน์ โดยเราได้ทำการศึกษาอีแนนซิโอเซเล็คทิวิตี้และประสิทธิภาพในการแยกสารของสารมัธยันตร์แบบไครัลของยาลีเนโซลิด 2 แบบด้วยกัน คือ HPLC และแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ซึ่งทั้งสองวิธีต้องใช้ไครัลคอลัมน์ชนิดพิเศษในการแยกมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

A) โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

การหาเปอร์เซ็นต์อีแนนทิโอเมอริกแอ็คเซสสามารถคำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของสเปกตรัมของ HPLC วัดที่ 260 nm คอลัมน์ HPLC (250 x 4.6 mm ID) ที่ใช้คือคอลัมน์ OJ-H

และคอลัมน์ OD ของบริษัทไครัลเซล โดยคอลัมน์ OJ-H [12] บรรจุอนุภาคซิลิกาเจลขนาด 5 μm ซึ่งโคทด้วยเซลลูโลสตริส(4-เมทิลเบนโซเอต) {cellulose tris(4-methylbenzoate)} ส่วนคอลัมน์ OD [13] นั้นบรรจุอนุภาคซิลิกาเจลขนาด 10 μm ซึ่งโคทด้วยเซลลูโลสตริส(3,5-ไดเมทิลฟีนิลคาร์บาเมต) {cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)} ตัวชะ (eluent) สำหรับคอลัมน์ทั้ง 2 ระบบเป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane (ตัวทำละลาย A) และ isopropanol (ตัวทำละลาย B) โดยระบบแบบ isocratic ของคอลัมน์ OJ-H จะใช้ตัวทำละลายผสมที่มีอัตราส่วน A : B เท่ากับ 70 : 30 ณ อัตราเร็วการไหล 0.8 mL/min เป็นเวลา 40 นาที และระบบคอลัมน์ OD จะใช้ตัวทำละลายผสมที่มีอัตราส่วน A : B เท่ากับ 99 : 1 ณ อัตราเร็วการไหล 1.0 mL/min เป็นเวลา 30 นาที

B) แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)

ในส่วนการแยกที่ใช้กรรมวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) นั้น เราใช้เครื่องที่ติดตั้งตัววัดแบบ FID (แก๊สเม็กอัพ (Makeup gas) ที่ใช้เป็นแก๊สผสมที่ปรับอัตราไหลต่างกันคือ N_2: 30 mL/min, H_2: 30 mL/min, อากาศ: 300 mL/min) สารตัวอย่าง 1 กรัม จะนำมาละลายในอะซิโตนปริมาณน้อยๆ จากนั้นนำไปวิเคราะห์แยกโดยมีเฟสคงที่คือ OV-1701 ที่มี 30%BSiMe (ขนาด 15.356 m x 0.25 mm x 0.25 μm) ใช้แก๊สตัวนำพาเป็นแก๊สไฮโดรเจน (50 cm/s) อุณหภูมิในการใส่สารตัวอย่างอยู่ที่ 250°C ระบบไอโซเทอร์มัลนี้จะใช้เวลาในการแยกขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 30 ถึง 60 นาที และเช่นกันกับกรณี HPLC %ee คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของสเปกตรัม

C) ปัจจัยการแยก [Separation Factor (α)]

ค่าปัจจัยการแยก [Separation Factor (α)] เป็นค่าดัชนีที่บอกถึงระยะห่างระหว่างพีคใดๆ สองพีค การคำนวณหาค่าปัจจัยการแยก (α) สามารถกระทำได้ดังสมการที่ (1)

$$\alpha = T_B / T_A \quad \text{สมการที่ (1)}$$

โดยให้ α เป็นค่าปัจจัยการแยก

T_A เป็นเวลารีเทนชันของสาร A

T_B เป็นเวลารีเทนชันของสาร B

D) ค่าการแยก [Resolution (Rs)]

ค่าการแยก [Resolution (Rs)] เป็นค่าดัชนีที่บอกถึงความสามารถในการแยกระหว่างสารใดๆ ยิ่งค่า Rs มากขึ้นเท่าใดก็จะหมายถึงการแยกที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้นเท่านั้น การคำนวณหาค่าการแยก (Rs) สามารถกระทำได้ดังสมการที่ (2)

$$Rs = 2[T_B - T_A] / [W_A + W_B] \quad \text{สมการที่ (2)}$$

โดยให้ Rs เป็นค่าการแยก

T_A เป็นเวลารีเทนชันของสาร A

T_B เป็นเวลารีเทนชันของสาร B

W_A เป็นค่าความกว้างของฐานพีค A หน่วยคิดเป็นเวลา

W_B เป็นค่าความกว้างของฐานพีค B หน่วยคิดเป็นเวลา

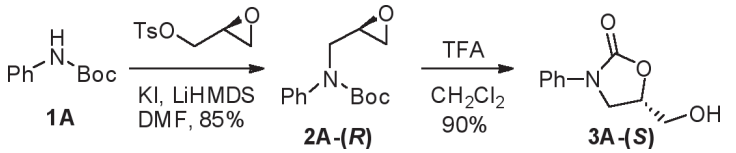
ผลการวิจัย

การวิจารณ์และสรุปผลการทดลองประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ คือ ในส่วนแรกเป็นส่วนของการสังเคราะห์ที่ได้วางแผนการทดลองเป็น 2 ช่วงด้วยกัน คือ ช่วงปฐมภูมิเป็นการศึกษาปฏิกิริยาเพื่อดูความเป็นไปได้ พร้อมทั้งหาสภาวะที่ดีที่สุดของปฏิกิริยา และช่วงการทดลองหลักซึ่งจะนำเอาสภาวะที่ได้จากช่วงปฐมภูมิมาใช้ในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะลีเนโซลิดจริง และในส่วนที่สองคือการวัดค่าการเลือกเกิดอิแนนทิโอเมอร์จำเพาะของปฏิกิริยาที่เราทำการทดลอง ซึ่งเราใช้เครื่อง GC ในการ

ตรวจวัดปฏิกิริยาในช่วงปฐมภูมิ และใช้เครื่อง HPLC ในการตรวจวัดปฏิกิริยาในช่วงการทดลองหลัก แต่ ณ ที่นี้จะทำการวิจารณ์และสรุปผลการทดลองทั้งในส่วนการสังเคราะห์ และการวัดค่าการเลือกเกิดอิแนนทิโอเมอร์จำเพาะของปฏิกิริยาไปพร้อมๆ กัน

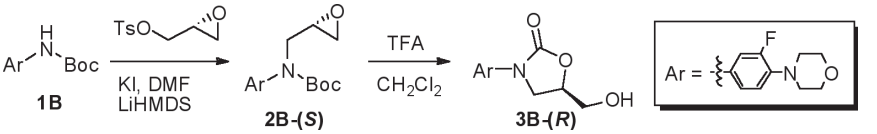
1. การสังเคราะห์ (Synthesis)

การสังเคราะห์ช่วงปฐมภูมิใช้อะนิลีนที่มีราคาถูกเป็นสารตั้งต้น เพื่อทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบแบบออกซาโซลิดิโนน **3A** และจากนั้นจะนำเอาสภาวะที่เหมาะสมนั้นไปประยุกต์เข้ากับกรณีของสารประกอบ **3B** ซึ่งสามารถใช้เป็นสารมัธยันตร์ในการสังเคราะห์ยาลีเนโซลิดตามขั้นตอนการสังเคราะห์ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว [11]



สมการที่ 2 การสังเคราะห์ขั้นปฐมภูมิของ 2-ออกซาโซลิดิโนน **3A-(*S*)** จาก *tert*-บิวทิลฟีนิลคาร์บาเมต **1A**

ผลการสังเคราะห์ช่วงแรกนั้นให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่สูงเป็นที่น่าพอใจ คือ 85% ในปฏิกิริยาแอลคิเลชันและ 90% ในปฏิกิริยาการปิดวง (**สมการที่ 2**) โดยในรายละเอียดการทดลองจะเริ่มสังเคราะห์ β-(*N*-*แอริลคาร์บามิล*) *อิปอกไซด์* **2A** และ 2-ออกซาโซลิดิโนน **3A** เพื่อการสังเคราะห์ของลิเนโซลิดรีเอเจนต์ที่ใช้คือ *(S)*-ไกลซิดิลทอซิเลตที่ต้องเตรียมก่อนเองจากการนำเอา *(R)*-ไกลซิดอลมาทำปฏิกิริยาทอซิเลชัน ซึ่งการสังเคราะห์สารประกอบ **2A-*(R)*** เริ่มจากปฏิกิริยาระหว่างฟีนิลคาร์บาเมต **1A** และ *(S)*-ไกลซิดิลทอซิเลต โดยมีโปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) และลิเทียมบิส (ไตรเมทิลไซลิล) เอไมด์ (Lithium bis(trimethylsilyl) amide, LiHMDS) เป็นเบสในตัวทำละลาย DMF เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเอาสารประกอบ **2A-*(R)*** มาทำการรีฟลักซ์กับกรด TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 2-ออกซาโซลิดิโนน **3A-*(S)***



สมการที่ 3 การสังเคราะห์สารมัธยันตร์ของยาลิเนโซลิด, 2-ออกซาโซลิดิโนน **3B-(*R*)**

จากผลการทดลองที่น่าพอใจในขั้นปฐมภูมิ เราจึงได้นำเอาสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ของยาลีเนโซลิด เริ่มด้วยการสังเคราะห์ของสารตั้งต้นไครัลโดยการสังเคราะห์เป็นไปตาม **สมการที่ 3** ในกรณีนี้เราใช้สาร *(R)*-ไกลซิดิลทอซิเลต ซึ่งสามารถซื้อได้จากบริษัทสารเคมี ซึ่งการสังเคราะห์สารประกอบ **2B-*(S)*** และเพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อ %ee ปฏิกิริยาระหว่างแอริลคาร์บาเมต **1** และ *(R)*-ไกลซิดิลทอซิเลตได้กระทำ ณ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ -60°C สามารถให้ %ee ที่สูงที่สุดคือ 74% แต่ในทางกลับกันให้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ต่ำที่สุด (40%) เนื่องจากขาดพลังงานในการเร่งปฏิกิริยา (**ตารางที่ 1**, entry 1) และถึงแม้การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงจะให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่าก็ตาม (57-79%, entry 2-4) แต่น่าเสียดายที่ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงนี้กลับให้ %ee ที่ต่ำกว่าปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ -60°C ถึงเกือบ 15% ซึ่งก็น่าจะสามารถอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวได้ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้โมเลกุลของสารตั้งต้นทั้งสองมีโอกาสวิ่งมาเจอกันและทำปฏิกิริยากันได้มากขึ้นตามทฤษฎีทางเทอร์โมไดนามิค แต่ในเวลาเดียวกันการเคลื่อนที่ก็ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเตอริโอเซ็นเตอร์ส่งผลให้ %ee ต่ำลงมาอยู่ที่ประมาณ 60%ee ทั้งหมดซึ่งจะวิจารณ์ผลนี้ในหัวข้อ 4.2 ต่อไป สำหรับขั้นตอนสุดท้ายคือการนำเอาสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาแอลคิเลชันที่ไม่ใช่ไครัลบริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับ TFA ในสภาวะการรีฟลักซ์หรือที่อุณหภูมิห้องจะให้ผลิตภัณฑ์ 2-ออกซาโซลิดโนน **3B-*(R)*** ในเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างสูง (71-81%) ซึ่งไม่ขึ้นกับอุณหภูมิปฏิกิริยาพร้อมกับ %ee ที่ลดลงอีกจาก %ee ของสารตั้งต้น (52-58%) (entry 1-4)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ และ %ee ของผลิตภัณฑ์แอลคิเลชัน (**2B-*(S)***) และผลิตภัณฑ์ปิดวง (**3B-*(R)***)

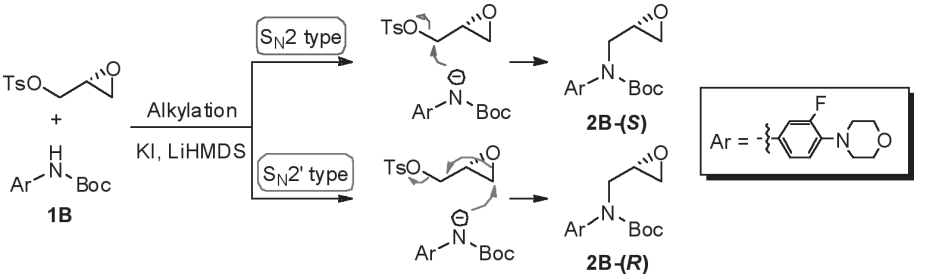
entry	Ar	alkylation[a]	%yield	%ee	cyclisation	%yield	%ee
1	A	-60°C to RT	40 (**2B-*(S)***)	74.2[b]	TFA, reflux	72 (**3B-*(R)***)	58.3[b]
2		0°C to RT	57 (**2B-*(S)***)	59.7[b]	TFA, reflux	71 (**3B-*(R)***)	53.4[b]
3		0°C to RT	57 (**2B-*(S)***)	59.7[b]	TFA, RT	81 (**3B-*(R)***)	53.0[b]
4		RT	79 (**2B-*(S)***)	59.9[b]	TFA, reflux	81 (**3B-*(R)***)	52.4[b]

[a] Enatiomeric pure starting materials was used in alkylation step, [b] calculated from Chiral HPLC.

2. การศึกษาความจำเพาะของอีแนนทิโอเมอร์ (Study of Enantioselectivity)

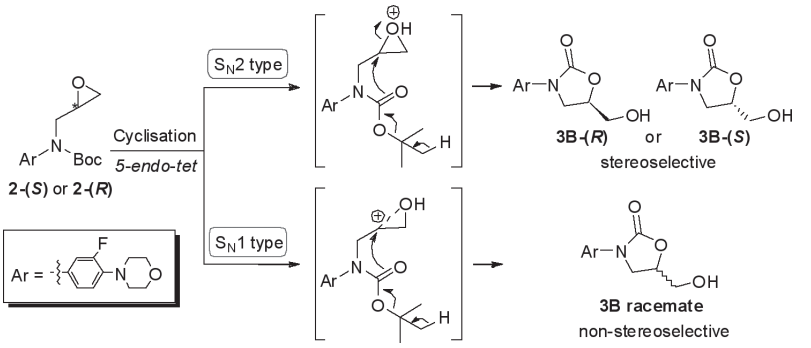
จากผลการทดลองที่ได้ ปฏิกิริยาที่กระทำที่อุณหภูมิต่ำสุดคือ -60°C จะให้ค่า %ee สูงสุดคือ 74.2 (**ตารางที่ 1**, entry 1) และเมื่ออุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์จะสูงขึ้นตามกฎเทอร์โมไดนามิค แต่ในทางกลับกัน %ee ของผลิตภัณฑ์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด (entry 2-4) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าแปลกว่าถึงแม้ปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ของลิเนโซลิดนั้นจะเริ่มจากสารตั้งต้นที่เป็นไครัลแต่ผลปรากฏว่ามีการสูญเสียความเป็นไครัลเกิดขึ้น ซึ่งในขั้นตอนปฐมภูมิของปฏิกิริยาแอลคิเลชันที่อุณหภูมิห้องนั้น %ee ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ในกรณีที่หมู่แทนที่แอริลเป็นหมู่ฟีนิลนั้นคือ 74%ee ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกรณีของ entry 1 ที่ทำที่อุณหภูมิ -60°C อย่างไรก็ตาม

จะเห็นได้ว่ามีการลดของ %ee เกิดขึ้นเมื่อทำที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะทั้งฟลูออรีนอะตอมและหมู่มอร์ฟอลินิลซึ่งทำให้หมู่แอริลที่ติดกับไนโตรเจนอะตอมมีขนาดใหญ่กว่าหมู่ฟีนิลธรรมดา และที่อุณหภูมิห้องความเกะกะดังกล่าวอาจรบกวนกลไกการเกิดปฏิกิริยา S_N2 ทำให้มีกลไกปฏิกิริยา S_N2' เกิดขึ้นด้วยตามที่แสดงใน **สมการที่ 4** ซึ่งนั่นก็หมายถึงการที่ไนโตรเจนแอนไอออนที่เกิดในระบบจะสามารถเข้าชนได้ทั้งทอซิเลตคาร์บอน (S_N2) ให้ผลิตภัณฑ์ **2B-(*S*)** และนอนไครัลอิปอกไซด์คาร์บอน (S_N2') ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีสเตอริโอเคมีที่ตรงกันข้ามคือ **2B-(*R*)** และแน่นอนว่าเมื่ออุณหภูมิสูงการควบคุมทางสเตอริโอก็เป็นไปได้ยากมากขึ้นเป็นเหตุให้ %ee ของผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ



สมการที่ 4 กลไกที่มีความเป็นไปได้ในการเกิดปฏิกิริยาแอลคิเลชัน

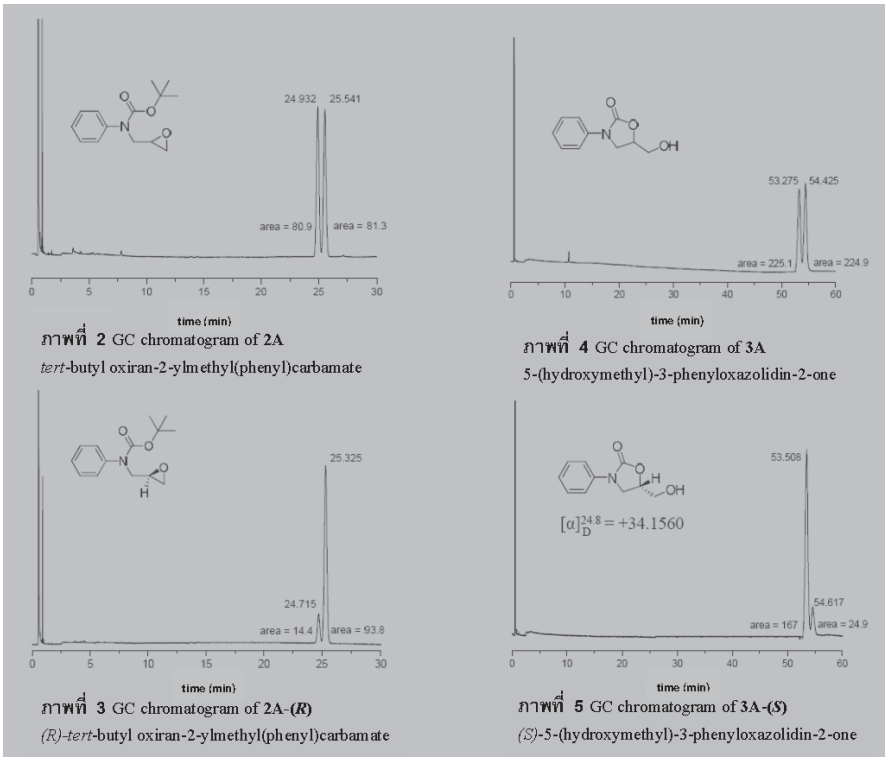
โดยทั่วไปแล้วการนำเอาอิปอกไซด์มาทำปฏิกิริยากับกรดจะเกิดการเปิดวงซึ่งสามารถเกิดผ่านกลไกได้ทั้งแบบ S_N2 และ แบบ S_N1 ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะปฏิกิริยา (**สมการที่ 5**) โดยทั่วไปการโปรโตเนชันของสารประกอบจำพวกอิปอกไซด์สามารถเพิ่มความว่องไวของปฏิกิริยาการเปิดวงอิปอกไซด์ได้ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาเปิดวงเป็นแบบที่เกิดภายในโมเลกุลเดียวกันนั้นมุมการเข้าทำปฏิกิริยามีผลกระทบโดยตรงต่อผลิตภัณฑ์ที่จะได้ ซึ่งในกรณีนี้มุมการเข้าทำปฏิกิริยาที่พอดีไม่มีความจำเป็นที่จะต้องบิดหรือยืดคือการเข้าทำที่คาร์บอนที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นวงห้าเหลี่ยม ส่งผลทางด้านการเลือกเกิดจำเพาะแบบเรจิโอ (Regioselectivity) แต่ในความเลือกเกิดจำเพาะดังกล่าวก็เป็นสาเหตุของการสูญเสียคุณสมบัติด้านการเลือกเกิดจำเพาะแบบสเตอริโอ (Stereoselectivity) ในเวลาเดียวกัน ซึ่งประเด็นการสูญเสียคุณสมบัติด้านการเลือกเกิดจำเพาะแบบสเตอริโอนี้สามารถอธิบายได้ดังนี้ ปฏิกิริยาการแทนที่นี้จัดอยู่ในประเภท S_N2 โดยทั่วไปจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสเตอริโอเคมีของคาร์บอนที่เกิดปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามในกรณีนี้คาร์บอนที่เกิดปฏิกิริยาการเปิดวงมีหมู่แทนที่ถึง 3 หมู่เพิ่มความเสถียรให้แก่คาร์โบแคทไอออน เป็นผลให้กลไกประเภท S_N1 จะเข้ามามีส่วนมากขึ้น (**สมการที่ 5**) และนำปฏิกิริยาไปสู่การสูญเสียการเลือกเกิดจำเพาะแบบสเตอริโอ และได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงทางสเตอริโอหรือผลิตภัณฑ์แบบราเซมิคได้



สมการที่ 5 กลไกที่มีความเป็นไปได้ในการเกิดปฏิกิริยาปิดวงภายในโมเลกุลโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากผลของ %ee ที่ได้ของผลิตภัณฑ์แบบวงมีค่าต่ำกว่าสารอิปอกไซด์ตั้งต้นถึงแม้จะไม่มากก็ตาม แต่ก็มากพอที่จะบ่งบอกได้ว่ามีปฏิกิริยาประเภท S_N1 เกิดขึ้นบางส่วนแต่ก็ไม่ถึงขนาดเกิดการราเซไมเซชันแบบสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่าขบวนการของปฏิกิริยาปิดวงภายในโมเลกุล (แบบ S_N2) เกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าการเกิดของแคทไอออนอินเตอร์มีเดียต (แบบ S_N1) และนอกจากนี้การลดลงในปริมาณที่ใกล้เคียงกันของ %ee ในผลิตภัณฑ์ที่เกิดในปฏิกิริยาที่กระทำภายใต้สภาวะรีฟลักซ์ (entry 2) และที่อุณหภูมิห้อง (entry 3) ยังแสดงให้เห็นถึงการไม่ขึ้นกับอุณหภูมิของปฏิกิริยาการปิดวงดังกล่าว

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนการทดสอบความเป็นไปได้ในช่วงปฐมภูมิที่เริ่มจากสารตั้งต้นที่เป็นอะนิลีน ทั้งในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (**2A**) และปฏิกิริยาการฟอร์มวงออกซาโซลิดิโนนด้วยกรด (**3A**) ซึ่งกรณีของสารที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ฟีนิลทั้งแบบราเซมิคและแบบที่มี %ee สูง (74) สามารถกระทำได้ด้วยกรรมวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ด้วยคอลัมน์ชนิด OV-1701 (**ภาพที่ 2-5**) และดัชนีการแยก Separation factor หรือ Selectivity factor (α) ที่คำนวณได้ของสารชุดนี้อยู่ในช่วง 1.02 – 1.03 ซึ่งอาจจะเป็นค่าที่ไม่ดีนัก แต่เมื่อพิจารณาจากค่า Resolution (R_s) ของสารอิปอกไซด์ **2A** และ สารออกซาโซลิดิโนน **3A** คือ 0.97 และ 0.86 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสามารถแยกได้อยู่ในระดับที่ดีพอใช้ เนื่องจากพีคแยกกันค่อนข้างชัดเจน แต่ยังมีบริเวณฐานของพีคที่ยังทับกันอยู่บ้างเนื่องจากค่ารีเทนชั่นไทม์นั้นใกล้กันมากคืออยู่แค่ประมาณ 1 นาที ส่งผลให้ค่า Rs นั้นต่ำลง



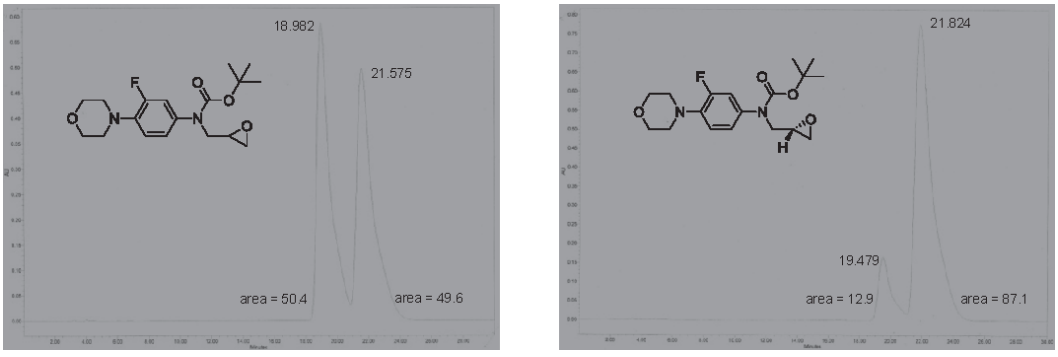
ภาพที่ 2 GC chromatogram of **2A**
tert-butyl oxiran-2-ylmethyl(phenyl)carbamate

ภาพที่ 4 GC chromatogram of **3A**
5-(hydroxymethyl)-3-phenyloxazolidin-2-one

ภาพที่ 3 GC chromatogram of **2A-(*R*)**
(R)-tert-butyl oxiran-2-ylmethyl(phenyl)carbamate

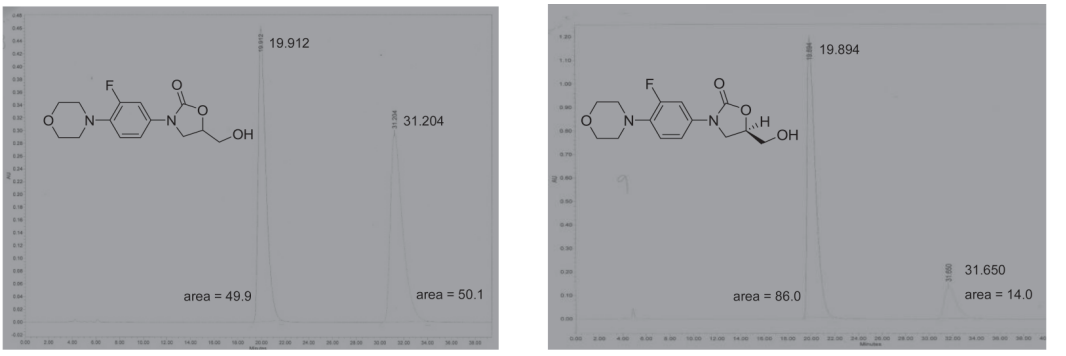
ภาพที่ 5 GC chromatogram of **3A-(*S*)**
(S)-5-(hydroxymethyl)-3-phenyloxazolidin-2-one

การแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (**2B**, **2B-(*S*)**) ในกรณีของสารที่มีหมู่แทนที่แบบราเซมิค สามารถกระทำได้ด้วยเครื่อง HPLC ติดตั้งด้วยคอลัมน์ OJ-H (**ภาพที่ 6**) ค่า α ที่คำนวณได้ของสารคาร์บาเมต **2B** และ **2B-(*S*)** คือ 1.14 และ 1.12 ตามลำดับ และค่า R_s ของสารคาร์บาเมต **2B** และ **2B-(*S*)** คือ 1.99 และ 1.88 ตามลำดับ ในกรณีนี้ถึงแม้รีเทนชั่นไทม์จะใกล้เคียงกันเป็นเหตุให้มีบริเวณฐานของพีคที่ยังทับกันอยู่บางส่วน แต่อย่างไรก็ตามค่าที่คำนวณได้นั้นชี้ให้เห็นว่าสามารถแยกสารไครัลทั้งสองไอโซเมอร์ได้ดีพอสมควร



ภาพที่ 6 HPLC chromatogram of *tert*-butyl-3-fluoro-4-morpholinophenyl (oxiran-2-ylmethyl) carbamate **2B** and *(S)-tert*-butyl-3-fluoro-4-morpholinophenyl (oxiran-2-ylmethyl) carbamate **2B-(*S*)** by using OJ-H column

การแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการฟอร์มวงออกซาโซลิดิโนนด้วยกรด (**3B**, **3B-(*R*)**) ในกรณีของสารที่มีหมู่แทนที่แบบราเซมิค B สามารถกระทำได้ด้วยเครื่อง HPLC ติดตั้งด้วยคอลัมน์ OD (**ภาพที่ 7**) ค่า α ทั้งสองของสารออกซาโซลิดิโนน **3B** และ **3B-(*R*)** คือ 1.57 และ 1.59 ตามลำดับ และค่า R_s ของสารคาร์บาเมต **2B** และ **2B-(*R*)** คือ 12.55 และ 14.70 ตามลำดับ ซึ่งกรณีนี้เห็นได้ชัดว่าแยกกันชัดเจน และตามค่าที่คำนวณได้นั้นก็แสดงให้เห็นเช่นกันว่าสามารถแยกสารไครัลทั้งสองไอโซเมอร์ได้อย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 7 HPLC chromatogram of 3-(3-fluoro-4-morpholinophenyl)-5-(hydroxymethyl) oxazolidin-2-one **3B** and *(R)*-3-(3-fluoro-4-morpholinophenyl)-5-(hydroxymethyl) oxazolidin-2-one **3B-(*R*)** by using OD column

สรุปและอภิปรายผล

โดยสรุปแล้วปฏิกิริยาแอลคิเลชันในการสังเคราะห์สารไครัลจำพวกไครัลอิปอกไซด์สามารถกระทำได้โดยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์อยู่ในเกณฑ์ที่ดีที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าคำนึงถึงค่า %ee เป็นหลักควรเลือกกระทำที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า -60°C เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยา S_N2' ส่วนปฏิกิริยาการปิดวงโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบไครัลออกซาโซลิดิโนน ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ของยาปฏิชีวนะลีเนโซลิดนั้น สามารถกระทำได้ในเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่สูงน่าพอใจ รวมทั้งปฏิกิริยานั้นก็ไม่ขึ้นต่ออุณหภูมิ อย่างไรก็ตาม %ee ที่ได้จะต่ำกว่าของสารตั้งต้น และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง GC และ HPLC สามารถนำมาใช้แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาแอลคิเลชันและปฏิกิริยาการฟอร์มวงออกซาโซลิดิโนนของระบบสาร A (Ar = Ph) และระบบสาร B (การสังเคราะห์สารมัธยันตร์ยาลีเนโซลิด) ตามลำดับ โดย HPLC ติดตั้งด้วยคอลัมน์ OJ-H สามารถใช้ในการแยกสารมัธยันตร์ประเภทอิปอกไซด์ได้ในระดับที่ดีพอใช้ ด้วยค่า a และค่า R_s ของสาร **2B-(*S*)** คือ 1.12 และ 1.88 ตามลำดับ และ HPLC ติดตั้งด้วยคอลัมน์ OD สามารถใช้ในการแยกสารมัธยันตร์ประเภทออกซาโซลิดิโนนได้สมบูรณ์ โดยที่ค่า α และค่า R_s ของสาร **3B-(*R*)** คือ 1.59 และ 14.70 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

[1] a) Solomons, T. W. G.; Fryhle, G. B. (2008). *Organic Chemistry*. 9th ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 210.

b) Enantiomer, Retrieved June 21, 2011, from http://en.wikipedia.org/wiki/Enantiomer

c) L-(+)-Tartaric acid - Compound Summary, Retrieved June 28, 2011, from http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=444305

[2] a) Solomons, T. W. G.; Fryhle, G. B. (2008). *Organic Chemistry*. 9th ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 213.

b) Mannschreck, A.; Kiesswetter, R. (2005). Differentiations of Enantiomers via Their Diastereomeric Association Complexes-There Are Two Ways of Shaking Hands. *J. Chem. Educ.* 82(7): 1034.

[3] Monteiro, M. C.; Afonso A. M. C.; Lourenso, M. T. N. (2010). Enzymatic Resolution and Separation of Secondary Alcohols Based on Fatty Esters as Acylating Agents. *J. Chem. Educ.* 87: 423.

[4] McInnch, J. K.; Geiser, F.; Prickett, K. B.; Maya, S. W. (1998). Determination of the absolute configuration of α-hydroxyglycine derivatives by enzymatic conversion and chiral high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*. 828: 191-198.

[5] Yoon, T. H.; Hong, L. Y.; Kim, D. P. (2011). Chiral Separation by a Pseudo Membrane in a Triple-Laminar Flow with a Microfluidic Contactor. *Chemistry – An Asian Journal.* 6: 1015-1018.

[6] a) Simándi B., Keszei S., Fogassy E., Kemény S., Sawinsky J. (1998). Separation of enantiomers bysupercritical fluid extraction, *J. Supercrit. Fluids*. 13: 331-336.

b) Keszei S., Simándi B., Székely E., Fogassy E., Sawinsky J., Kemény S. (1999). Supercritical fluid extraction: a novel method for the resolution of tetramisole, *Tetrahedron: Asymmetry.* 10: 1275-1281.

[7] a) Henri, B. K.; Olhrier, R. (1992). Catalytic Asymmetric Diels-Alder Reactions. *Chem. Rev.* 92: 1007-1019.

b) Gilson, Z.; Richard, C. L. (2004). Synthesis of Heterocycles via Palladium π-Olefin and π-Alkyne Chemistry. *Chem. Rev.* 104: 2285-2309.

c) Zyvox®, Retrieved June 28, 2011, from http://www.pfizerpro.com/hcp/zyvox

[8] Janine, M. C.; Grant, S. H.; Denis, R. L. (2000). Biotransformation of the Trichoderma metabolite 6-n-pentyl-2H- pyran-2-one by cell suspension cultures of Pinus radiate. *Phytochemistry*. 53: 447-450.

[9] Bureau of drug control, Retrieved June 28, 2011, from http://wwwapp1.fda.moph.go.th

[10] Sirijindalert, T.; Hansuthirakul, K.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M.; Ajavakom, A. (2010). Novel synthetic route to 1,4-dihydropyridines from β-amino acrylates by using titanium(IV) chloride under facile conditions. *Tetrahedron*. 66: 5161-5167.

[11] a) Lirong, S.; Xiaobei, C.; Shilei, Z.; Haoyi, Z.; Ping, L.; Guangshun, L.; Wenjing, L.; Wenhu, D.; Wei, W. (2008). An Organocatalytic Approach to the Construction of Chiral Oxazolidinone Rings and Application in the Synthesis of Antibiotic Linezolid and Its Analogues. *Org. Lett.* 10: 5489-5492.

b) Srinivasarao V. N.; Arumugam, S. (2006). Short and practical enantioselective synthesis of linezolid and eperezolid via proline-catalyzed asymmetric a-aminooxylation. *Tetrahedron Lett.* 47: 6799-6802.

c) Giuseppe, B.; Marcella, B.; Armando, C.; Manuela, L.; Paolo, M.; Letizia, S. (2005). Direct Catalytic Synthesis of Enantiopure 5-Substituted Oxazolidinones from Racemic Terminal Epoxides. *Org. Lett.* 7: 1983-1985.

d) Roberto, Morán-R.; Ramón, L.; Vicente, G. (2007). Regioselective and Stereospecific Synthesis of Enantiopure 1,3-Oxazolidin-2-ones by Intramolecular Ring Opening of 2-(Boc-aminomethyl) aziridines. Preparation of the Antibiotic Linezolid. *Org. Lett.* 9: 575-578.

[12] *Application Guide for Chiral Column Selection.* (2004). 3rd ed. Daicel Chemical Industries, Ltd., p. 76.

[13] Krause, K.; Girod, M.; Chankvetadze, B.; Blascnke, G. (1999). *J. Chromatography A*. 837: 51-63.

[14] Srinivasarao V. Narina, Arumugam Sudalai. (2006). Short and practical enantioselective synthesis of linezolid and eperezolid via proline-catalyzed asymmetric α-aminooxylation. *Tetrahedron Lett.* 47: 6799-6802.