

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Kadiatou Traore

Univerzita Pardubice

Fakulta Chemicko-Technologická

Studium reaktivity diazoniových solí při arylaci tryptofanů

Kadiatou Traore

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kadiatou Traore**
Osobní číslo: **C15379**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Studium reaktivity diazoniových solí při arylaci tryptofanů**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši týkající se využití diazoniových solí pro kovy katalyzované arylace. Hlavní důraz kladte na arylace tryptofanů.
2. Proveďte literární rešerši prací týkajících se reaktivity diazoniových solí.
3. Vhodnou metodou generujte substituované diazoniové soli a pomocí ESI-MS stanovte jejich disociační energie.
4. Prozkoumejte vliv substituce na posun charakteristických vibračních pásů v IČ spektrech.
5. Pokuste se nalézt vztahy mezi získanými daty a reaktivitou studovaných solí.
6. Výsledky vyhodnoťte a zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Jiří Váňa, Ph.D.

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

Kadiatou Traore

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala panu Ing. Jiřímu Vánovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce za jeho cenné rady, připomínky a důležité pokyny při vypracování této práce.

ANOTACE

Práce je zaměřena na studium reaktivity diazoniových solí pro C–H arylace tryptofanů. Pro substituované benzendiazoniové soli byly určeny relativní hodnoty jejich disociačních energií vazeb (BDE) a ty korelovány s vypočtenými i experimentálně zjištěnými parametry, jako například vlivem substituce na polohu vibračních pásů, či Hammettovskými konstantami.

KLÍČOVÁ SLOVA

diazoniové soli, disociační energie vazeb, arylace, tryptofan.

TITLE

Study of reactivity of diazonium salts in arylation of tryptophans

ANNOTATION

This work is focused on determination of selected properties of substituted benzenediazonium salts such as relative bond dissociation energy (BDE) or vibration maxima of $N\equiv N$ bonds and correlations of the experimentally obtained values with calculated ones.

KEYWORDS

Diazonium salts, bond dissociation energy, arylation, tryptophan

OBSAH

ÚVOD 11

1. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1.1. Tryptofan a jeho využití v organické syntéze	12
1.2. Diazoniové soli a jejich reaktivita	13
1.3. Reakce tryptofanu a diazoniových solí.....	17
1.4. Arylace tryptofanu v poloze C2	20
1.5. Reakce diazoniových solí s boronovými kyselinami	23
2. Princip metody měření.....	26
2.1. Hmotnostní spektrometrie iontových pastí	26
2.1.1. Elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS)	26
2.1.2. Proces elektrosprejové ionizace.....	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1. Příprava diazoniových solí.....	28
3.2. ESI-MS experimenty	28
3.3. Vyhodnocení výsledků.....	28
3.4. Teoretické výpočty	28
3.5. IČ spektroskopie	29
4. Výsledky a Diskuse.....	30
5. Závěr	37
6. POUŽITÁ LITERATURA.....	38

SEZNAM OBRÁZKŮ

Schéma 1 Suzuki - Miyaurova reakce katalyzovaná paladiem (R – aryly)	13
Schéma 2 Zavedení alkynu na tryptofanový skelet [1]	13
Schéma 4 Mechanismus diazotace	14
Schéma 5 Diazotace - rozpad na stabilní produkty	14
Schéma 6 Diazotace - vznik aryldiazoniové soli	15
Schéma 7 Sandmeyerova reakce	16
Schéma 8 Reakce aryldiazoniových solí	16
Schéma 9 Tvorba C-C vazby pomocí Heckovy a Stilleovy reakce	18
Schéma 10 Paládiový komplex katalyzovaný Suzukiho reakce	18
Schéma 11 Sonogashirova reakce - mechanismus	19
Schéma 12 Sonogashirova reakce - cyklus paladia za nepřítomnosti mědi	20
Schéma 13 Selektivní vazba arylu na C2 tryptofanu	21
Schéma 14 Přímá arylace tryptofanu s mědí jako kokatalyzátorem	21
Schéma 15 Přímá arylace tryptofanu s paladiem za mírnějších podmínek	22
Schéma 16 Přímá arylace tryptofanu s paladiem v prostředí TFA a za použití mikrovlnného ohřevu	22
Schéma 17 Arylace tryptofanu substituovanou diazoniovou solí	23
Schéma 18 Vliv substituentu na výtěžek reakce aryldiazoniové soli	25

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní informace - tryptofan	12
Tabulka 2 Výtěžnost reakcí v závislosti na substituentu aryljodidu	23

SEZNAM ZKRATEK

NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
Cu	měď
THF	tetrahydrofuran
DCM	dichlormethan
MeCN	acetonitril
CID	Collision Induced Dissociation (technika MS)
DMF	dimethylformamid
TFA	trifluoroctová kyselina
ESI	Electrospray Ionisation (technika MS)
MS	hmotnostní spektrometr
Et	ethyl
i-	iso
IČ	infračervené (spektrum)
L	ligand
m-	meta
Me	methyl
o-	ortho
p-	para
Ph	fenyl
Piv	pivaloát

ppm	chemický posun (NMR)
Pr	propyl
Rf	retenční faktor (u tenkovrstvé chromatografie)
s-	sekundární
t-	terciární

ÚVOD

Tato práce má za nosné téma využití diazoniových solí pro arylační reakce tj. vnesení organického zbytku – arylu, do struktury proteinu resp. peptidu za účelem modifikace proteinu, který může být následně využit jako látka s antibiotickými vlastnostmi či jinak lékařsky využitelná. Jedná se o jednu z dnes velice zajímavých cest antimikrobiální ochrany při neustále narůstající rezistenci bakterií a virů k antibiotikům a antivirotikům.¹ Arylační reakce jsou v dnešní době nejčastěji prováděny za katalýzy paladiem a za mírných podmínek odpovídajících podmínkám biosyntézy.²

V této práci se zaměřuji na reakci tryptofanu jako často zastoupené aminokyseliny s vysokou schopností ovlivnit sekundární a terciální strukturu proteinu resp. peptidu. Aryl je poskytován diazoniovou solí.

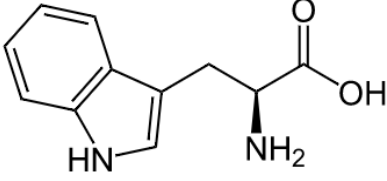
Práce je koncipována na teoretickou část a praktickou část. V teoretické části je první kapitola věnována vlastnostem tryptofanu a jeho arylačním reakcím s jinými substráty než jsou diazoniové soli. Dále jsou popsána vlastnosti diazoniových solí a zdůrazněn důvod, proč jsou vhodné jako zdroj arylu jako substituentu na indolový kruh tryptofanu. Následuje podrobná kapitola týkající se palladiem katalyzovaných reakcí tryptofanu s diazoniovými solemi. V závěru jsou shrnuty získané poznatky z literární rešerše.

Druhá část práce je věnována experimentální charakterizaci substituovaných benzendiazoniových solí, zejména disociační energii, která charakterizuje krom jiného stálost látky, stanovenou pomocí kolizních ESI-MS experimentů. Dále se v praktické části věnuji vlivu substituce – resp. substituentu na posun charakteristických vibračních pásů ve spektru infračerveného záření. V diskusi a závěru shrnuji získané výsledky a uvádím případnou korelaci mezi získanými daty připravených derivátů s jejich reaktivitou.

1. TEORETICKÁ ČÁST

Tryptofan patří mezi 20 esenciálních aminokyselin. Jedná se o látku nepolárního charakteru obsahující heteroaromatický skelet, konkrétněji indol. Je kódována kodonem UGG. Základní fyzikálně-chemické informace jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 1: Základní informace - tryptofan ³

Strukturní vzorec	
Název systematický	Kyselina (2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanová
Název triviální	Tryptofan
Registrační číslo CAS	73-22-3
Molární hmotnost	204,23 g/mol
Disociační konstanta	pK_{COOH} : 2,38, pK_{NH_2} : 9,39
Výskyt v proteinech	1,4 %

1.1. Tryptofan a jeho využití v organické syntéze

Tryptofan je důležitým prekurzorem biologických derivátů jako jsou serotonin (neurotransmitter), melatonin (regulace biorytmů) a nikotinamid (součást kofaktorů NAD^+ a $NADP^+$ pro oxidoredukční děje v organismů). Dále pak neribozomálních proteinů jako jsou protirakovinné agens Rebeccamycin či Diazonamid A.

Tryptofan vyskytující se v proteinech resp. peptidech je často prvkem, který stabilizuje sekundární a terciální strukturu tvorbou inter- a intramolekulárních vazeb. Tryptofanu se dále využívá pro jeho schopnost vlastní fluorescence, jež determinuje nebo moduluje spektrofotometrické vlastnosti celého peptidu. Toho může být využito pro kvantifikaci proteinu ve směsi, studiu foldingu proteinů a peptidů, dále pro analýzu vazných ligandů a interakcí protein – protein. ^{4,7}

Jeho důležitými analogy jsou halogentryptofany, které jsou vhodnými substráty pro cross-coupling reakce např. Suzuki-Myiaurova reakce. Tímto způsobem je možné do molekuly

peptidu resp. proteinu zavést aryl, heteroaryl nebo alkenyl formou substituce na indolový kruh, jak uvádí Deb Roy a kol.⁴ Toto umožňuje modifikovat protein pacienta při genové terapii, či modifikovat vznikající medikamenty. Je důležité, aby daná substituce probíhala, pokud možno, za mírných podmínek, kdy jsou karboxylová a aminoskupina nechráněné a protein je dostupný ve vodném roztoku. Většina reakcí je založena na katalýze palladiem, jak ilustruje následující reakce (Schéma 1).^{4,7}

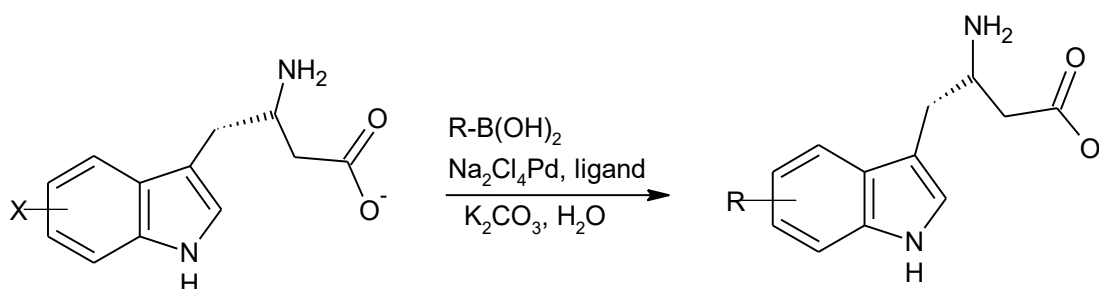


Schéma 1 Suzuki - Miyaurova reakce katalyzovaná paladiem (*R* – arylly)

Kupříkladu Deb Roy a kol. se zaměřili na studium tryptofanu, kdy připravili skupinu halogentryptofanů a za vhodných podmínek provedli Suzuki-Miyaurovu reakci na nechráněném 5- a 7-halotryptofanu s využitím substituovaných arylboronových kyselin. Touto reakcí se úspěšně podařilo modifikovat brom a chlorderiváty tryptofanu, které jsou více stabilní a v přírodě stabilnější než jejich analogický jod derivát.⁴ Na tu práci navázali Corr a kol. a vydávají se cestou cílené substituce pomocí Sonogashirovi reakce na bromtryptofanu (Schéma 2).^{5,7}

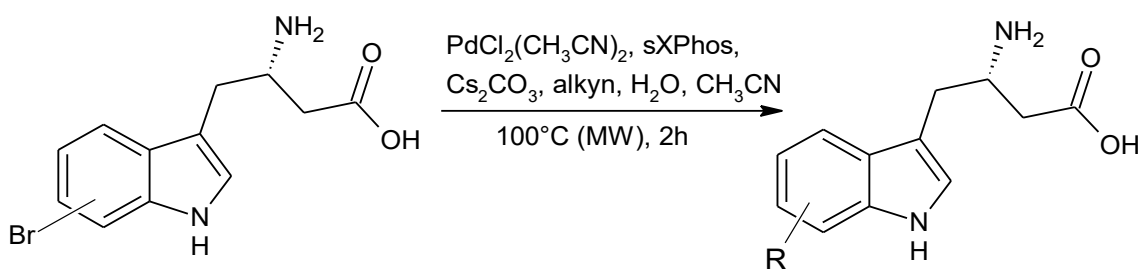
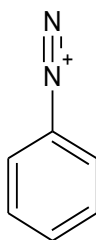


Schéma 2 Zavedení alkyne na tryptofanový skelet

1.2. Diazoniové soli a jejich reaktivita

Diazoniové soli vznikají diazotací z primárních aromatických aminů. Soli snadno uvolňují molekulu dusíku a jsou tedy málo stabilní a velmi reaktivní i za mírných podmínek.



Obrázek 1 Diazoniový kationt

Reakce vedoucí ke vzniku diazoniové soli se nazývá diazotace. V nejběžnějším uspořádání probíhá jako reakce primárních aminů s kyselinou dusitou v kyselém prostředí. Mechanismus vzniku diazoniové soli je založen na reakci nitrosoniového iontu, jež je elektrofilem, s nukleofilním dusíkem aminu. Reakce se skládá z několika kroků, přesunů protonů s konečnou eliminací vody (Schéma 3).

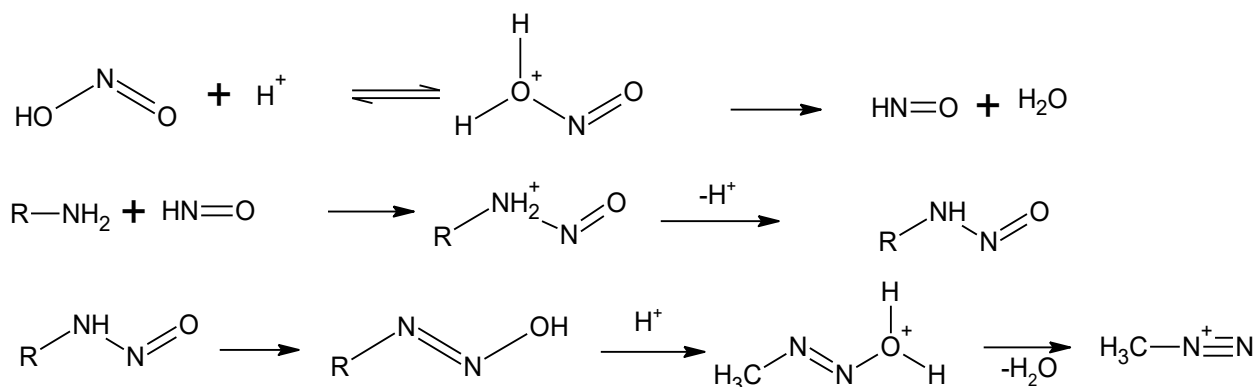


Schéma 3 Mechanismus diazotace

Alkyldiazoniové soli jsou málo stabilní. Již během diazotace se diazoniová sůl rozpadá za odstoupení molekuly dusíku a vzniku karbokationtu, jehož následné reakce vedou ke vzniku rozličných produktů (Schéma 4).

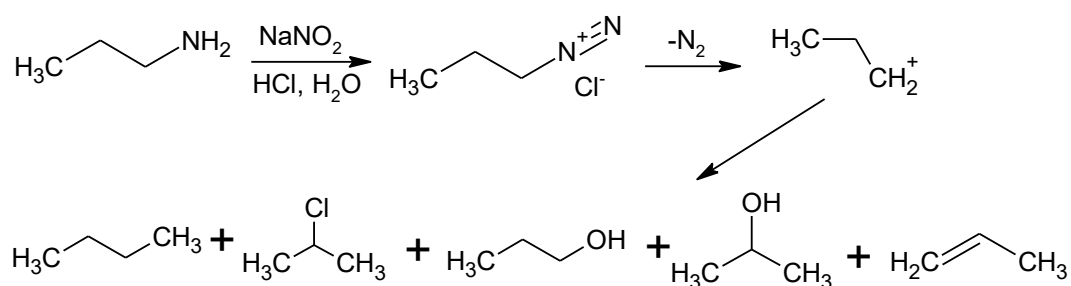


Schéma 4 Diazotace - rozpad na stabilní produkty

Diazoniová sůl může sloužit jako vhodný přenašeč organického zbytku – alkylu, arylu, do cílové molekuly. V této práci se jedná především o arylderiváty diazoniových solí. Ty vznikají

obdobně jako alkylderiváty. Díky přítomnosti benzenového jádra, a tedy možnosti konjugace elektronů, jsou aryldiazoniové soli stabilnější než jejich alkylová analoga a mohou být dokonce, jak uvádí Dvořák in Svoboda, skladovány při teplotě 0-5 °C.^{5,8}

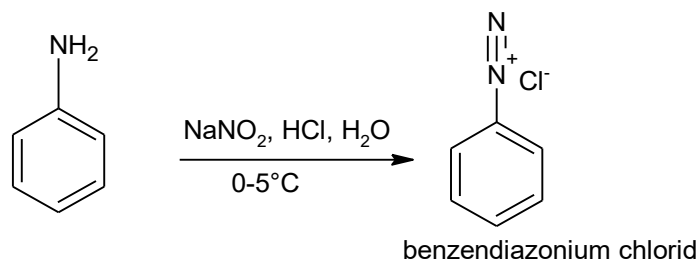


Schéma 5 Diazotace - vznik aryldiazoniové soli

Je potřeba zmínit, že po odštěpení dusíku z arylderivátu, vzniká nestabilní arylový kationt – obdobně u alkylderivátů vznikal alkylový kationt. Avšak tato reakce – rozštěpení arylderivátu, je mnohonásobně pomalejší než vznik alkylderivátu, což umožňuje využít aryldiazoniových solí pro přípravu dalších aromatických sloučenin.

Význam arylderivátů diazoniových solí tkví v tom, že odštěpující se dusík je možné substituovat jiným atomem resp. funkční skupinou. Tyto reakce, substituce, probíhají regiospecificky.⁷ Diazotace s následnou substitucí funkční skupiny se využívá např. pro přípravu fenolů, či v reakci s jodidem sodným/draselným ve vodném prostředí pro přípravu aryljodidů. Přímé reakce s jodidem jakožto halogenidem lze využít pouze zde, u ostatních halogenidů toto není možné, jelikož nejsou tak silnými nukleofilními činidly jako jodid. Pro přípravu arylchloridů, arylbromidů a arylnitridů se využívá reakcí diazoniových solí s měďnými solemi (chloridy, bromidy resp. kyanidu (Schéma 6)). V organické syntéze se takto označuje tzv. Sandmeyerova reakce. Reakce probíhá radikálovým mechanismem.^{2,6,8,9}

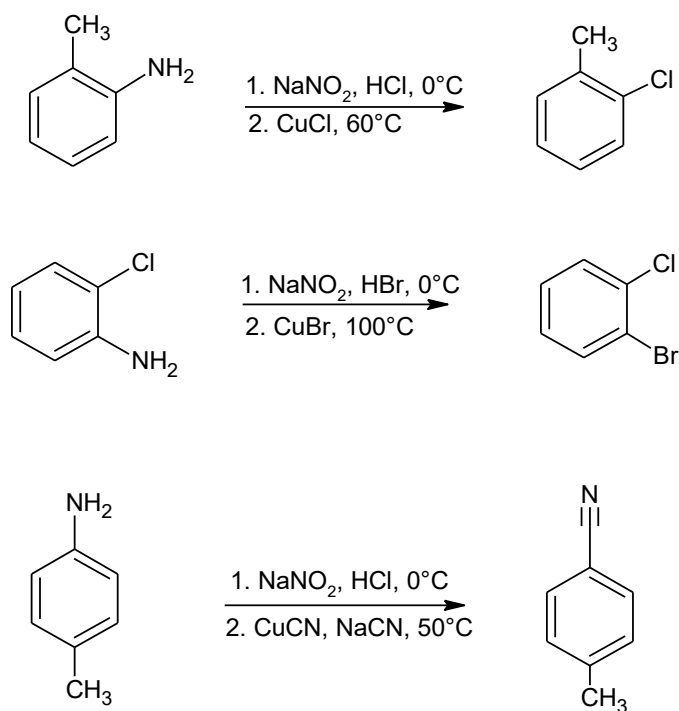


Schéma 6 Sandmeyerova reakce

Přehled reakcí aryldiazoniových solí je uveden na následujícím schématu (Schéma 7).

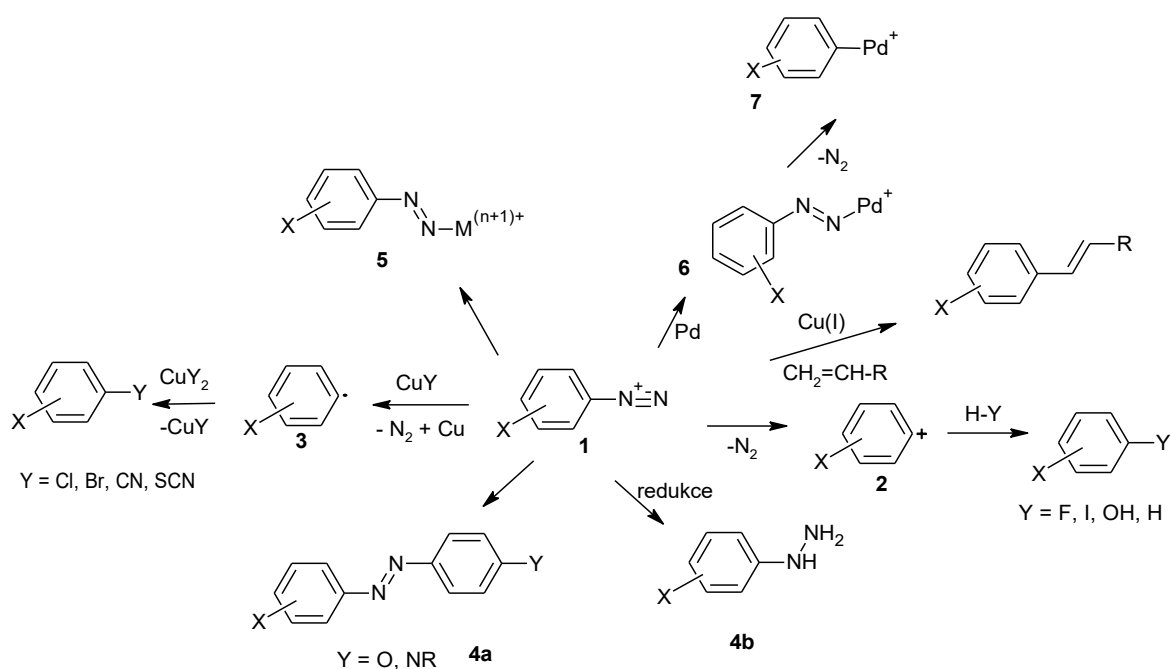


Schéma 7 Reakce aryldiazoniových solí.¹⁰

Arylderivát může dále vystupovat v reakcích: ^{2,9,10}

- Meerweinovy reakce (obdoba Sandmeyerovy reakce s alkeny)
- Balz-Schiemannova reakce
- Azokopulační reakce
- V reakcích katalyzovaných paladiem v tzv. cross coupling reakcích

1.3. Reakce tryptofanu a diazoniových solí

Následující kapitola se zabývá reakcemi diazoniových solí s aryl- a alkylderiváty organických sloučenin. Tryptofan zde spadá do skupiny arylderivátů. V textu jsou uvedeny dvě základní schémata a to tzv. Suzuki-Miyauraova reakce a následně tzv. Sonogashirovy reakce. Jsou zde uvedena obecná schémata, kde pod organickým zbytkem R se v této práci řadí aryl, resp. tryptofan.^{4,7}

Cross-coupling reakce

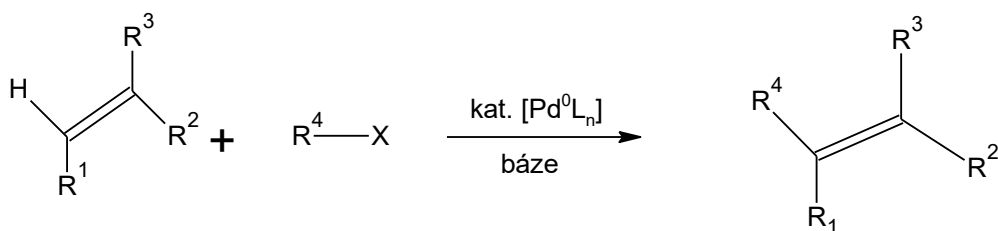
Pro modifikaci tryptofanů se využívají zejména cross-couplingové reakce. Ty lze rozdělit do několika typů v závislosti na použitých činidlech a katalyzátorech.

Heckova Reakce využívá spojení arylhalogenů s alkeny.

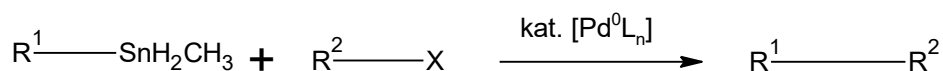
Stielova Reakce je založena na organociničitých sloučeninách.

Suzuki-Miyaruova reakce využívá fenyloboronových kyselin.

Heckova reakce



Stilleho reakce



Suzukiho reakce

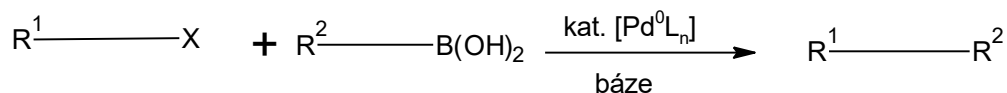


Schéma 8 Tvorba C-C vazby pomocí Heckovy, Stilleovy a Suzukiho reakce

Další reakcí, v praxi vysoce užívanou, je Suzukiho reakce. Její význam spočívá v možnosti konstrukce konjugovaných dienů a vyšších polyenových produktů s vysokou stereoizomerní čistotou a dále diarylových systémů. Suzukiho reakce je adicí využívající organoboronové sloučeniny. Paralela s Heckovou reakcí je patrná v pomyslné záměně vodíku alkenů s látkou obsahující bor.^{10,11} Uvádí se, že Suzukiho reakce probíhá typicky za přítomnosti palladia, uhličitanu draselného příp. methanolu to vše při 25°C a to dle následujícího (schématu 9).¹²

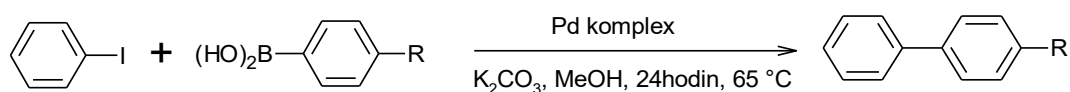


Schéma 9 Paládiovým komplexem katalyzovaná Suzukiho reakce

Sonogashirova reakce

Sonogashirova reakce je reakce halogenaromátů s alkyny. Realizuje se za přítomnosti paladnatých kationtů jako katalyzátoru, především ve formě chloridu a octanu paladnatého. Literatura uvádí, že přesný mechanismus reakce není zcela znám. Předpokládá se že reakce probíhá ve dvou na sobě nezávislých cyklech (Schéma 10).^{6,13}

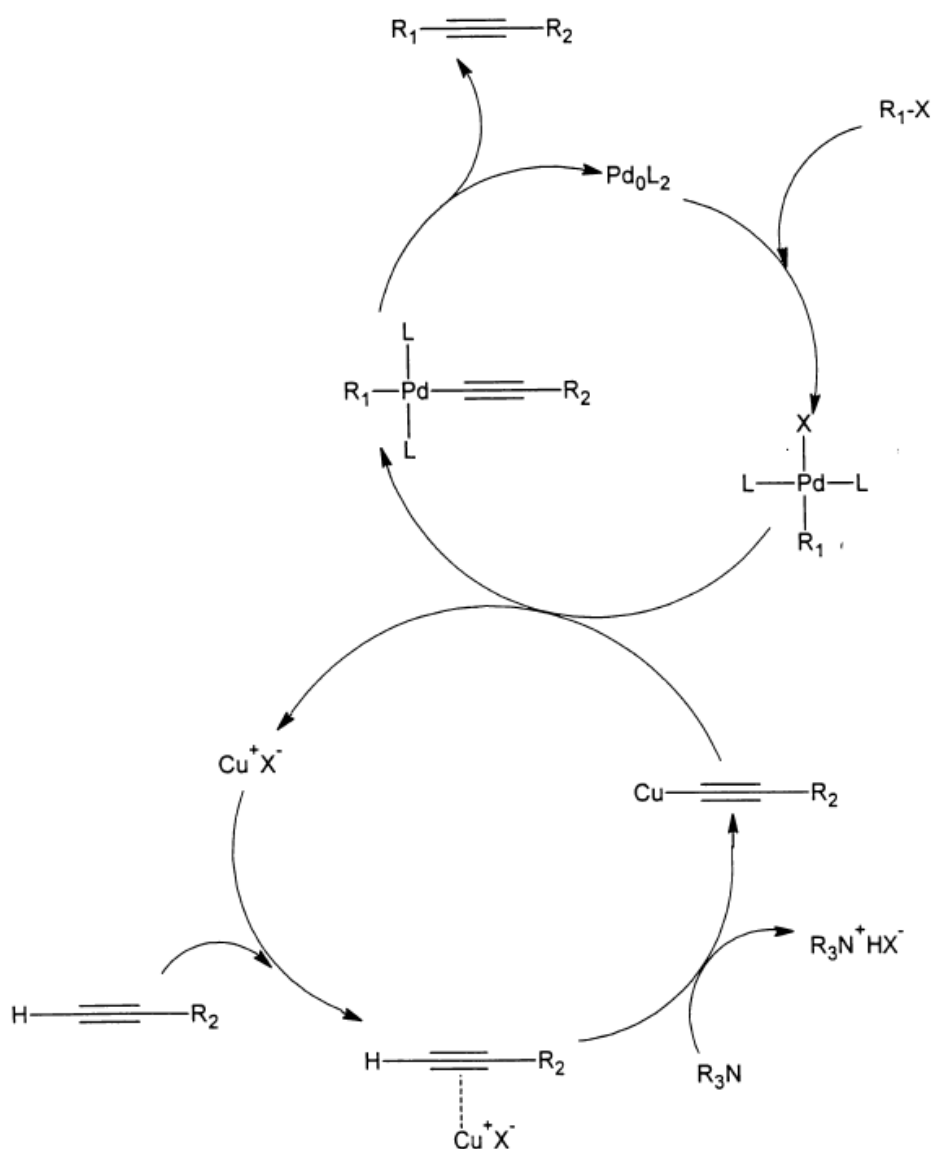


Schéma 10 Sonogashirova reakce - mechanismus

Terciální amin resp. diazoniová sůl slouží jako báze. Reakce začíná oxidativní adicí, palladium vstupuje do vazby aryl-halogen. Vzniklý komplex zpravidla obsahuje 14 elektronů Pd^0L_2 . Jako L – ligand může posloužit fosfin, organické rozpouštědlo atd. Typ ligandu ovlivní za podmínek Sonogashirovy reakce rychlost oxidativní adice. Další krok je navázaný na společně probíhající reakční cyklus mědi, jehož mechanismus není zcela znám. Předpokládá se, že dochází k transmetalaci sloučeniny mědi na R_1PdL_2 a následné reaktivní eliminaci a posléze k regeneraci katalyzátoru. Studie provedené pomocí NMR ukazují, že v reakci vzniká acetylid měďný resp. π -komplex, jež se může účastnit reakce s paladiem za tvorby komplexu, který prochází reaktivní eliminací za vzniku aktivního Pd^0L_2 . Alternativní schéma reakce probíhající bez účasti mědi je znázorněno na následujícím schématu 11.¹⁴

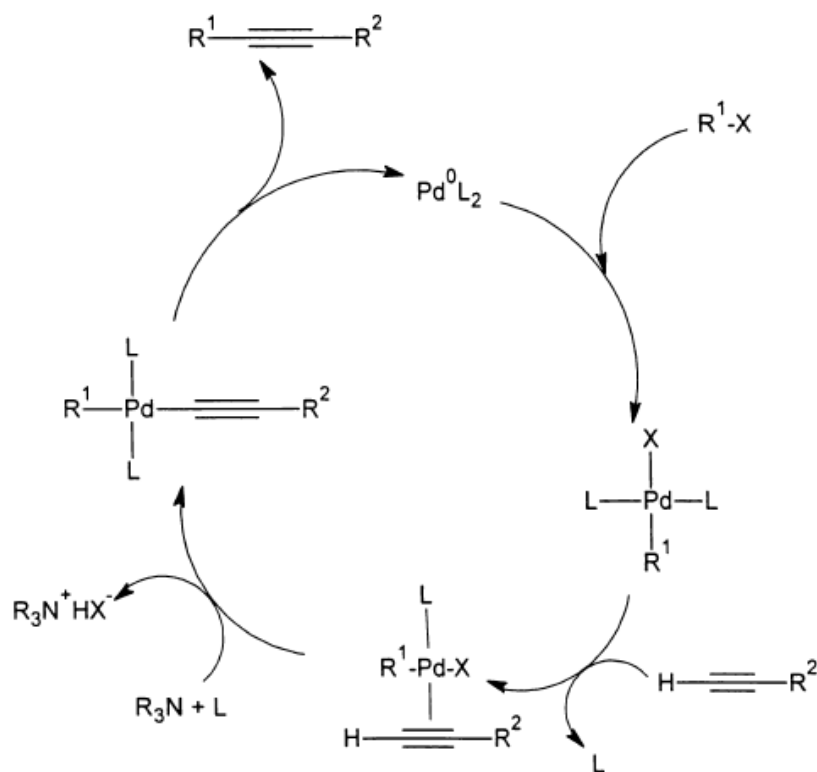


Schéma 11 Sonogashirova reakce – navržený mechanismus bez atomu mědi

Obecně lze říci, že trojná vazba je schopná reagovat s aktivním komplexem ještě před započítím oxidativní adice, čímž se cyklus zpomalí a vzniká komplex, jež je stabilní. Dále se uvádí, že pokud v Sonogashirově reakci není dostupná měď, je nutno pro její úspěšný průběh přidat aditiva – sekundární amin ve vysokém nadbytku pro ustavení rovnováhy vznikajících produktů Sonogashirovy reakce.¹⁵

1.4. Arylace tryptofanu v poloze C2

Arylace tryptofanu může být provedena jedno i více krokově a s použitím různých kombinací katalyzátorů resp. s palladiem, palladiem a mědí, a různými vnějšími podmínkami za různých výtěžků. Přehled základních reakcí je uveden následovně.

Regioselektivní arylace tryptofanu v poloze C2 se podařila kolektivu profesorky Sanfordové. Kombinace katalytického množství octanu palladnatého, fenyl boronové kyseliny, fenyljodid-diacetátu v kyselině octové jako rozpouštědla vedla k průměrným výtěžkům arylovaného produktu.^{7,15,16,17,18}

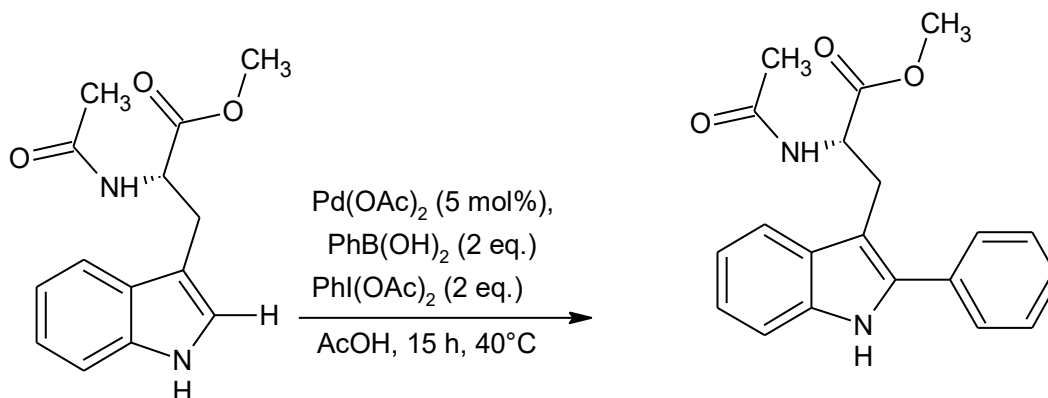


Schéma 12 Selektivní vazba arylu na C2 tryptofanu

Jak ukazuje reakce na obrázku (Schéma 12) výše, tvorba C-C vazby tj. propojení dvou arylových zbytků je provedena za mírných podmínek – 40°C, 15 hodin. Výtěžky reakce lze zvýšit na 93 % záměnou fenyliodidacetátu za octan měďnatý.¹⁶

Uvedeného přístupu se držely i další výzkumné skupiny a za srovnatelných podmínek došly ke stejné vysokým výtěžkům reakce za udržení či dalšího zmírnění podmínek reakce. Oproti předchozí reakci dochází ke změně vnesení Cu do reakce jako katalyzátoru. (Schéma 13).

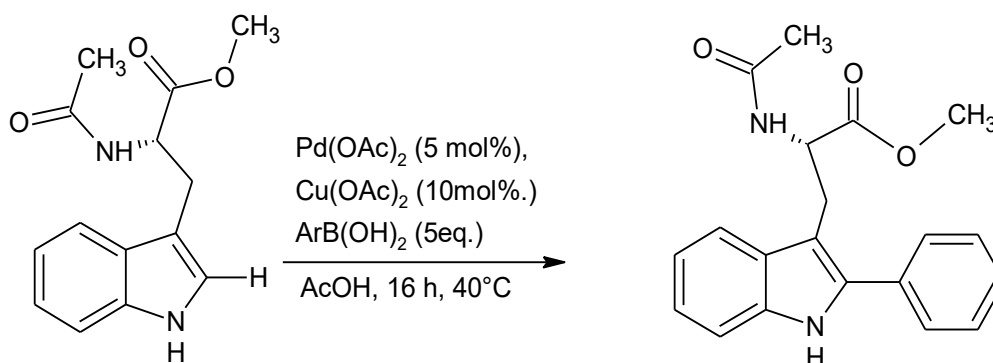


Schéma 13 Přímá arylace tryptofanu s mědí jako kokatalyzátorem

Reakce uvedená na Obrázku 14 je typem Sonogashirovy reakce, kdy jako katalyzátor je použito palladium spolu s mědí. Jak je uvedeno výše, přesná funkce mědi v reakci není doposud známá.⁹

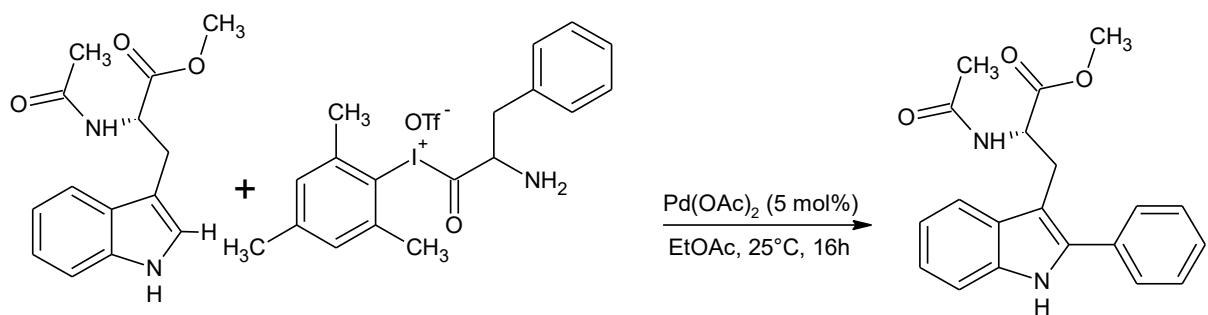


Schéma 14 Přímá arylace tryptofanu s paladiem za mírnějších podmínek

Dalším popsáním příkladem je reakce chráněného tryptofanu s iodoniovou solí, katalyzována octanem palladnatým v ethylacetátu a to vše při 25°C (Schéma 14). Konečný produkt je přečištěn pomocí chromatografické kolony.⁹

Preciado a kol. uvádí reakci tryptofanu s fenyljodonium-diacetátem v přítomnosti tetrafluorboritanu stříbrného a kyseliny tetrafluorocitové za katalýzy octanem paladnatým. Reakce probíhala v DMF jako rozpouštědle za teploty 90°C. Pokud je jako zdroj tepla použito mikrovlnné záření, dochází k významnému zkrácení reakce – na 20 minut (Schéma 15).¹⁰

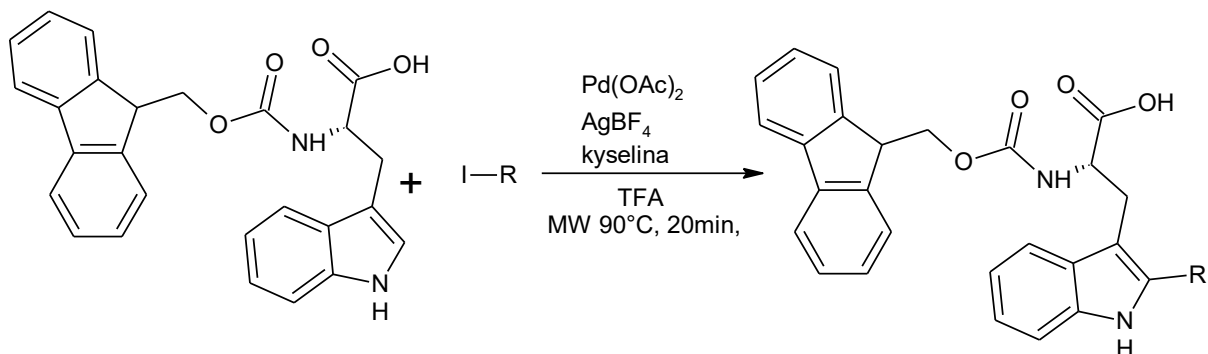


Schéma 15 Přímá arylace tryptofanu s paladiem v prostředí TFA a za použití mikrovlnného ohřevu

Tabulka 2 Výtěžnost reakcí v závislosti na substituentu aryljodidu

R	Výtěžek reakce
C ₆ H ₅ -	56 %
p-NO ₂ -C ₆ H ₄ -	91 %
p-MeO ₂ C-C ₆ H ₄ -	68 %
p-Br-C ₆ H ₄ -	62 %
m-CF ₃ -C ₆ H ₄ -	59 %
o-F-C ₆ H ₄ -	77 %
p-Me-C ₆ H ₄ -	81 %
p-MeO-C ₆ H ₄ -	63 %
1-pyrenyl-	66 %

Míru vlivu substituentu na výtěžky reakcí (Schéma 16) ukazuje tabulka 2. Je patrné, že nejvyššího je dosaženo v případě 4-nitrofenyliodidu (91 %), naopak nejnižší výtěžek poskytuje nesubstituovaný fenyljodid (56 %).

1.5. Reakce diazoniových solí s boronovými kyselinami

Sina a kol. se ve své studii zabývají Suzukiho reakcí diazoniových solí v přítomnosti boronové kyseliny za katalýzy (4-CF₃-C₆H₄)₃PdAuCl v prostředí methanolu při pokojové teplotě (Schéma 16).¹⁸

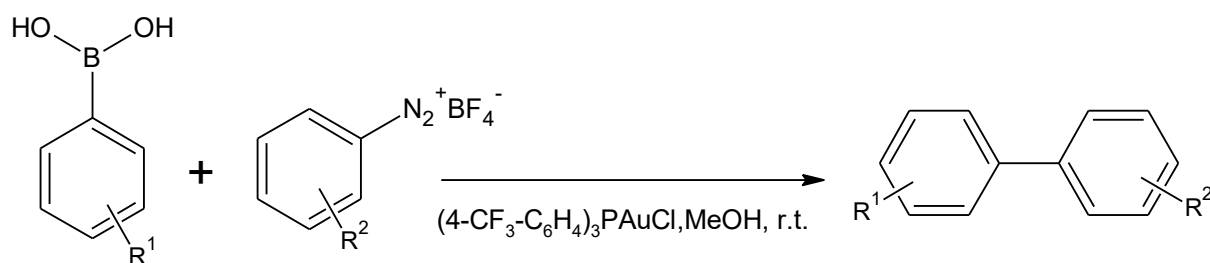


Schéma 16 Arylace tryptofanu substituovanou diazoniovou solí

Dané podmínky reakce byly zkoumány podrobněji s různými katalyzátory, různými rozpouštědly (MeCN, methanol, THF a DCM) a za různých teplot (pokojová teplota, 50°C a 70°C). Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 4 Vnější podmínky reakce arylace tryptofanu s výtěžky

Označení	Katalyzátor, koncentrace 10 mol%	Rozpouštědlo	Teplota v °C	Výtěžek v %
1	Ph ₃ PAuCl	MeCN	25°C	-
2	Ph ₃ PAuNtf	MeCN	25°C	31
3	(RO) ₃ PAuCl	MeCN	25°C	-
4	(4-Me-C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeCN	25°C	20
5	Cy ₃ PAuCl	MeCN	25°C	31
6	Ph ₂ (8-quinolyl)PAuCl	MeCN	25°C	-
7	(4-F-C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeCN	25°C	-
8	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeCN	25°C	51
9	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuNTf ₂	MeCN	25°C	22
10	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	DMF	25°C	-
11	(4-CF₃-C₆H₄)₃PAuCl	MeOH	25°C	85
12	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	THF	25°C	-
13	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	DCM	25°C	-
14	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeCN	25°C	21
15	-	MeOH	25°C	-
16	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeOH	25°C	-
17	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeOH	70°C	-
18	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeOH	70°C	-

19	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeOH	°C	-
20	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeOH	25°C	61
21	(4-CF ₃ -C ₆ H ₄) ₃ PAuCl	MeOH	25°C	75

Dále je ukázáno nakolik typ substituentu (dle Schéma 17) ovlivňuje výtěžek reakce.

Aryldiazonové soli a arylboronové kyseliny reagují s (4-CF₃-C₆H₄)₃PuCl katalyzátorem na bázi zlata (10 mol%) za přítomnosti methanolu při teplotě místnosti pod ozářením modrými diodami. Přehled vybraných substrátů a substituovaných diazoniových solí spolu s výtěžky je uveden ve schématu 18 a tabulce 4.^{13,18}

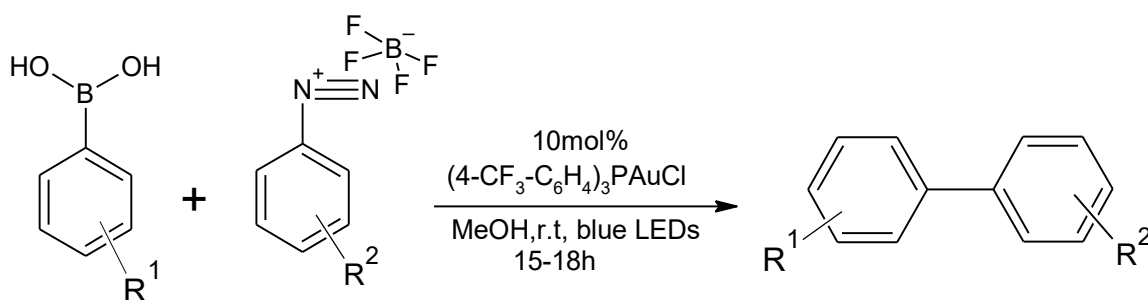


Schéma 17 Vliv substituentu na výtěžek reakce arylcediazoniové soli

Tabulka 5: Výtěžky syntézy různě substituovaných diazoniové soli

R ₁	R ₂	Výtěžek (%)
CO ₂ Me	4-CF ₃	82
CO ₂ Me	4-F	77
CO ₂ Me	4-Cl	86
CO ₂ Me	4-Br	95
CO ₂ Me	4- <i>t</i> -Bu	77
CO ₂ Me	4-OMe	30
CO ₂ Me	3-F	83
CO ₂ Me	2-F	66

2. PRINCIP METODY MĚŘENÍ

Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS) patří mezi velice účinné analytické metody. Vzhledem k tomu, že se jedná o mírnou ionizační techniku, nalézá se její hlavní uplatnění zejména při studiu biomolekul sdílejících podobné molekulární struktury. Dále pak je zvláště užitečná při screeningu vrozených chyb v metabolismu aminokyselin, mastných kyselin, purinu, pyrimidinu a diagnostice galaktozémie a peroxisomálních poruch. V neposlední řadě umožňuje takzvané vychytávání “fishing out“ reakčních intermediátů a tedy se stává významným pomocníkem při objasňování reakčních mechanismů.¹⁹

2.1. Hmotnostní spektrometrie iontových pastí

Jedná se o analytickou techniku, která poskytuje nejen kvantitativní (molekulovou hmotnost látky), ale také kvalitativní (strukturní) informaci o molekulách analyzovaných látek. Zásadní výhodou iontových pastí je možnost provedení násobných MSⁿ experimentů, což umožňuje mnohem detailnější prozkoumání struktury látek. Navíc lze v pomoci iontových pastí stanovovat hodnoty disociačních energií vazeb (BDE),²⁰ či po úpravě přístroje sledovat přímo reakce v plynné fázi.

2.1.1. Elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS)

Jak bylo zmíněno výše, elektrosprejová ionizace je mírná metoda umožňující detekci i velmi nestabilních molekul. Hlavní nevýhodou této metody je fakt, že látky musejí být schopné přijmout či odevzdat proton. Z tohoto důvodu není metoda vhodná například pro analýzu uhlovodíků či aromátů.

Nejširší využití nachází tato metoda ve spojení s vysokoúčinným kapalinovým chromatografem (HPLC). Toto experimentální uspořádání je hojně využíváno ve všech typech laboratoří a lze říci, že se jedná o jednu z nejmocnějších technik používaných k analýze směsí látek.

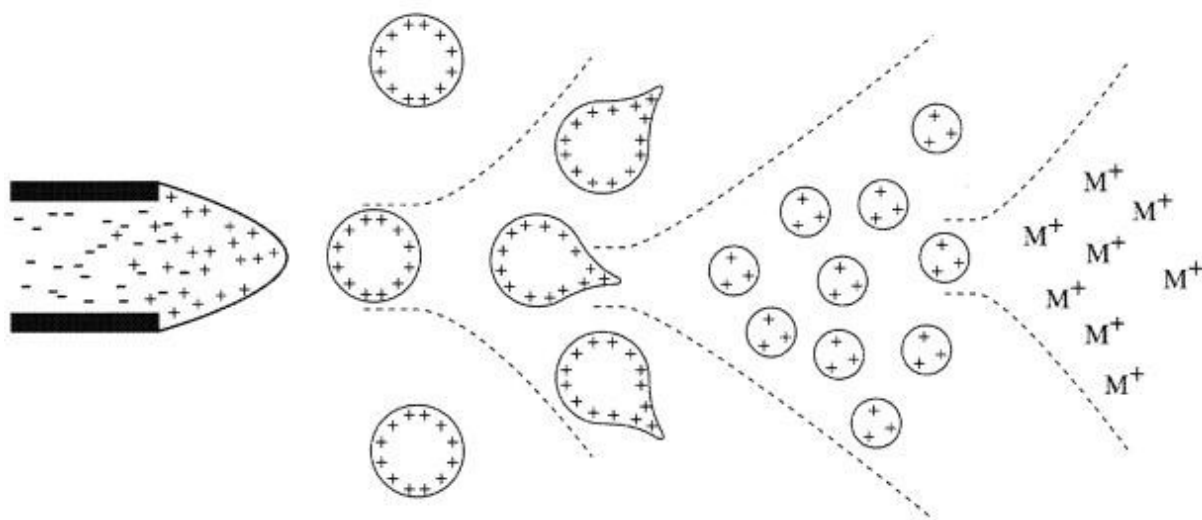
2.1.2. Proces elektrosprejové ionizace

Při ESI ionizaci je pro generování iontů využíván elektrické napětí, které napomáhá přenosu iontů z roztoku do plynné fáze předtím, než jsou podrobeny hmotnostní spektrometrické analýze. Neutrální sloučeniny mohou být také převedeny na iontovou formu v roztoku nebo v plynné fázi protonací nebo kationizací (např. kationizací kovu).

Přenos iontových druhů z roztoku do plynné fáze pomocí ESI zahrnuje tři kroky:

- (1) rozptýlení jemného rozstříku nabitých kapiček
- (2) odpaření rozpouštědla
- (3) vytlačování iontů z vysoce nabitých kapiček, které jsou udržovány při vysokém napětí (například 2,5 až 6,0 kV) vzhledem ke stěně okolní komory. (Obrázek 2)

Dojde k vytvoření mlhy vysoce nabitých kapiček se stejnou polaritou jako vložené napětí na kapiláře. Aplikace rozprašovacího plynu (například dusík) proudícího kolem kapiláry usnadní natažení vzorku a tím zvyšuje průtok vzorku. Nabité kapičky, generované na výstupu elektrosprejového hrotu procházejí tlakovým a potenciálním gradientem směrem k oblasti analyzátoru hmotnostního spektrometru. Pomocí zvyšování teploty zdroje ESI a / nebo jiného proudu plynného dusíku, jako sušícího plynu se nabité kapičky plynule zmenšují odpařením rozpouštědla, což vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje a ke snížení poloměru kapiček. Konečně, intenzita elektrického pole v nabité kapičce dosáhne kritického bodu, ve kterém je kineticky a energeticky možné, aby ionty na povrchu kapiček byly vypouštěny do plynné fáze. Vyzařované ionty jsou následně nasáty do hmotnostního detektoru.¹⁹



Obrázek 2: Mechanismus elektrosprejové ionizace.¹⁹

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Příprava diazoniových solí

K roztoku substituovaných anilinů (0,3 ml) v acetonitrilu (1 ml) byl přidán isoamylnitrit (0,5 ml). Po pěti minutách bylo odebráno 50 μ L roztoku, doředěno acetonitrem na 1 ml a sprejováno do ESI-MS. Pro každý derivát byly CID experimenty provedeny třikrát a kalibrovány na nesubstituovanou diazoniovou sůl.

3.2. ESI-MS experimenty

ESI-MS experimenty byly prováděny iontové pastí Thermo LCQ Fleet, v pozitivním módu za podmínek: napětí 3,5 kV; napětí na kapiláře 45 V; teplota kapiláry 150 °C. Po izolaci iontu fragmentu byl tento podroben CID experimentům s rostoucí kolizní energií.

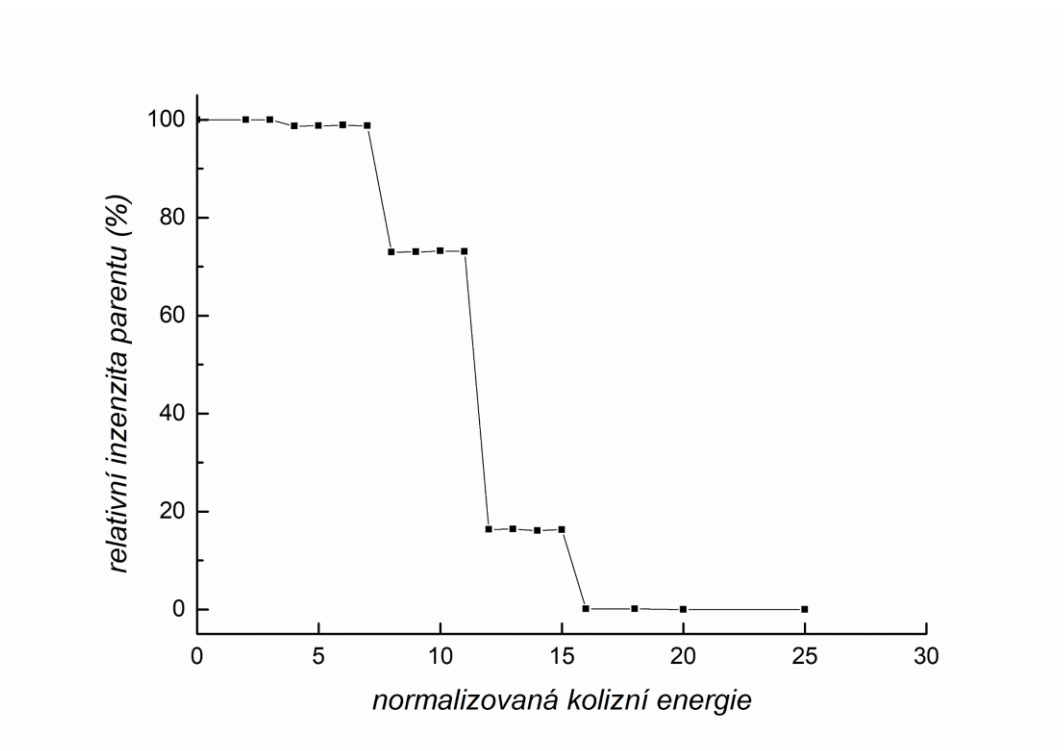
3.3. Vyhodnocení výsledků

Ukázalo se, že LCQ Fleet na našem pracovišti mění kolizní energie vždy až po 4 jednotkách, což vede k závislostem ukázaným na Obrázku 3. Proto pro další vyhodnocení byly vždy čtyři hodnoty získané při stejné intenzitě parentu zprůměrovány a celý graf tak byl stažen do Obrázku 5.

Inflexní body byly získány z proložení závislostí Boltzmanovou sigmoidální funkcí $y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$.

3.4. Teoretické výpočty

Výpočty byly provedeny pomocí programu Gaussian 09 s využitím metody B3LYP/6-311+G** v plynné fázi.



Obrázek 3. Závislost relativní intenzity iontů parentů na kolizní energii – surová data.

3.5. IČ spektroskopie

IČ spektra všech látek byly měřeny na přístroji Nicolet iS50 metodou ATR. Buď jako krystalický prášek bemzendiazonium tetrafluoroborátů ze zásob našeho Ústavu, a nebo jejich roztoků v nitromethanu.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Jak ukazuje rešeršní část, s trochou nadsázky lze říci, že diazoniové soli díky popularitě C–H funkcionalizačních reakcí zažívají svou renesanci. Velice důležitým faktorem při těchto reakcích je porovnání reakčních bariér C–H aktivačního a následného vlastního funkcionalizačního kroku. Díky známé teplotní labilitě diazoniových solí je potřeba, aby C–H aktivační reakce proběhla rychleji, než se veškerá diazoniová sůl rozloží na nežádoucí látky. Z tohoto důvodu se jeví jako velice užitečné znát hodnoty disociačních energií vazeb (BDE) benzendiazoniových solí.

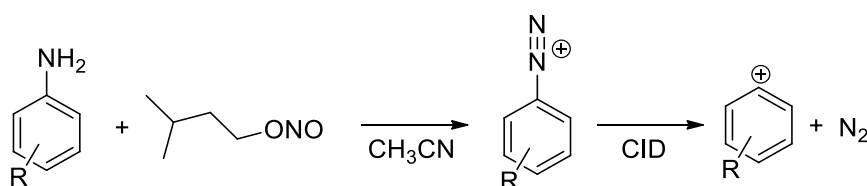
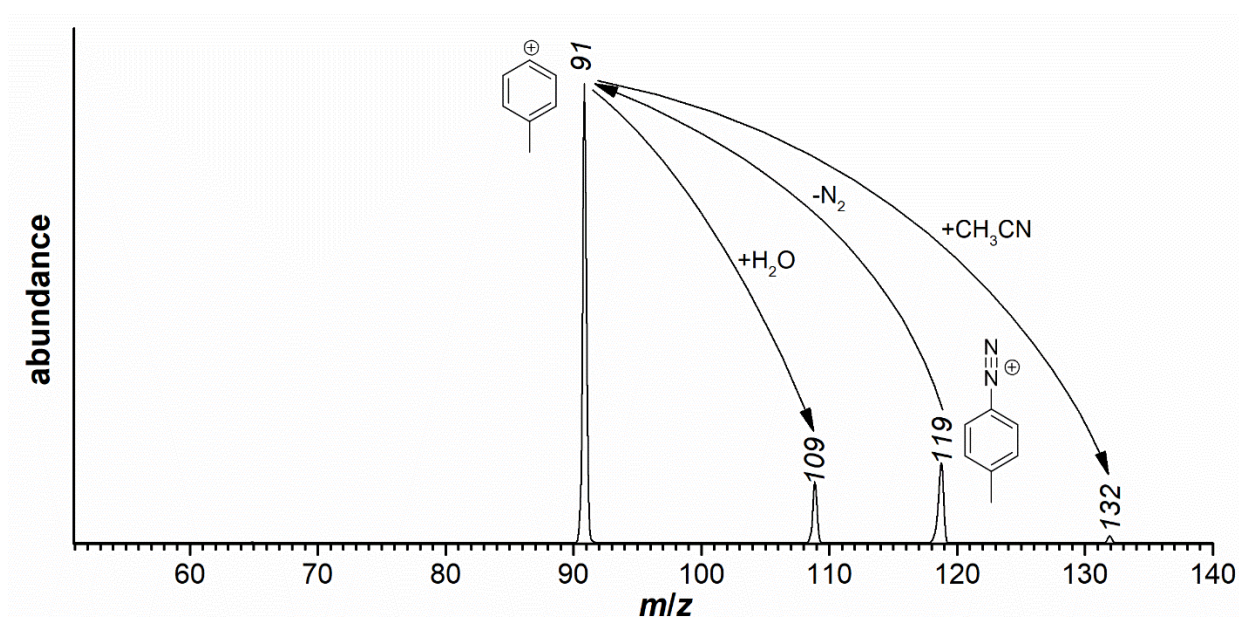


Schéma 19. Schéma přípravy diazoniových solí reakcí substituovaných anilinů s isoamylnitritem a jejich následný rozpad způsobený kolizí s atomy helia.

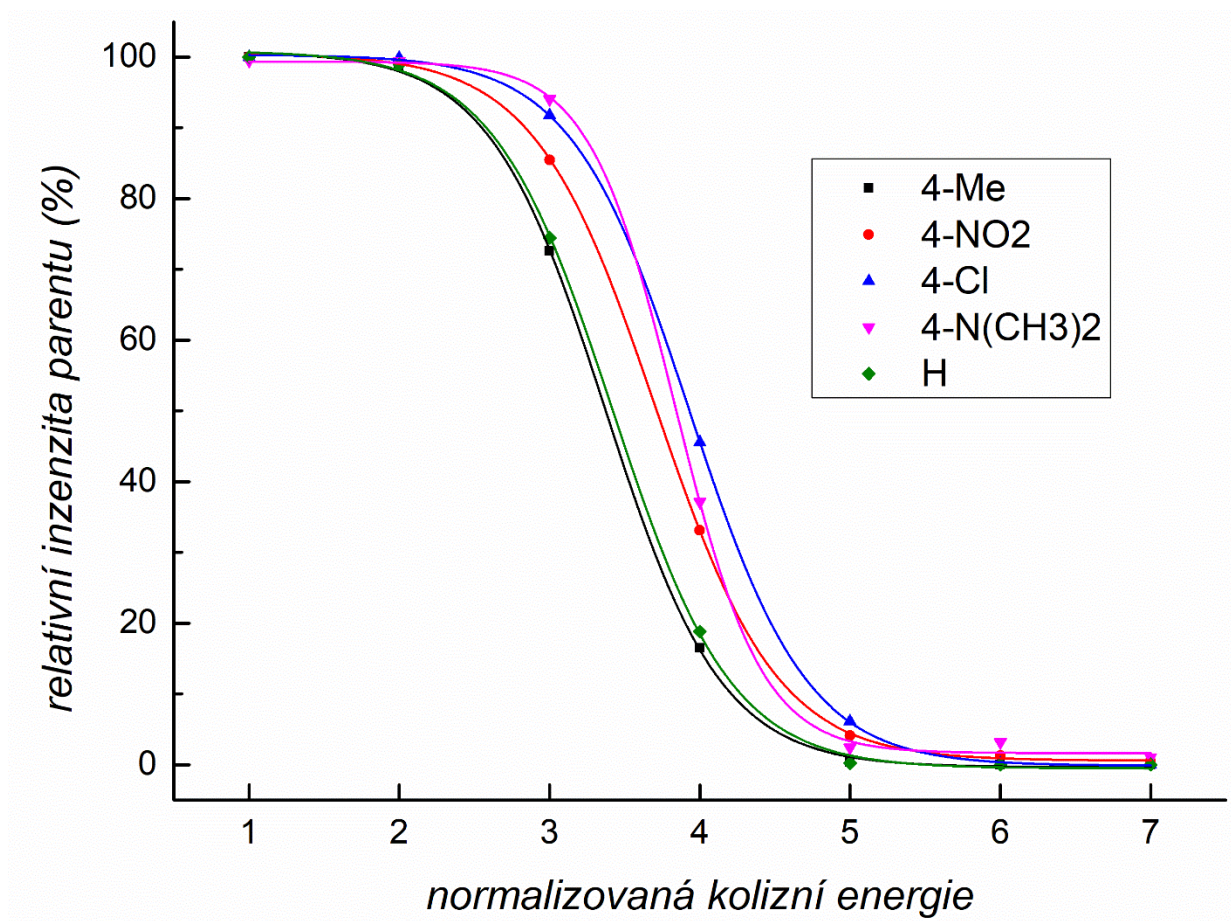
V této práci jsem se zaměřila na stanovení relativních BDE pomocí ESI-MS. Diazoniové soli jsou díky svému kladnému náboji ideálním substrátem pro ESI-MS. Z důvodu usnadnění práce jsem soli generovala přímo v roztoku reakcí příslušných anilinů s isoamylnitritem v acetonitrilu (Schéma 19). Takto generovaný roztok byl sprejován do přístroje. V pozorovaných spektrech byly jasně patrné ionty s m/z odpovídající požadovaným diazoniovým solím. Tyto ionty byly následně vybrány v iontové pasti a podrobeny srážkám s molekulami helia (CID experiment) při různých energiích. Typické fragmentační spektrum ukazuje obrázek 4.



Obrázek 4: Typické CID spektrum pro 4-methylbenzediazoniovou sůl.

Z obrázku je jasně vidět, že diazoniová sůl (m/z 119) při kolizích ztrácí molekulu dusíku za vzniku 4-methylfenylového (m/z 91) kationtu. Tento následně může tvořit asociát s molekulou vody za vzniku iontu m/z 109 či s molekulou acetonitrilu s m/z 132.

Poměr intenzity signálů iontů výchozí látky (parent) a signálů iontů fragmentů je závislý na normalizované kolizní energii, kterou lze nastavit v přístroji. Při nulové hodnotě kolizní energie je ve spektru přítomen pouze signál výchozí látky. S narůstající energií srážek intenzita tohoto signálu začíná klesat a objevují se signály iontů fragmentů. Závislost intenzity parentu na kolizní energii má sigmoidní charakter.²⁰ Relativní posun takto získaných sigmoidních křivek pro různě substituované deriváty odpovídá rozdílným hodnotám jejich BDE. Typické srovnání sigmoidních křivek získaných proložení experimentálních dat sigmoidální Boltzmannovou funkcí ilustruje obrázek 5.



Obrázek 5. Závislost relativní intenzity iontů parentů na kolizní energii pro různě substituované benzendiazoniové soli. Experimentální body byly proloženy Boltzmannovou sigmoidní funkcí

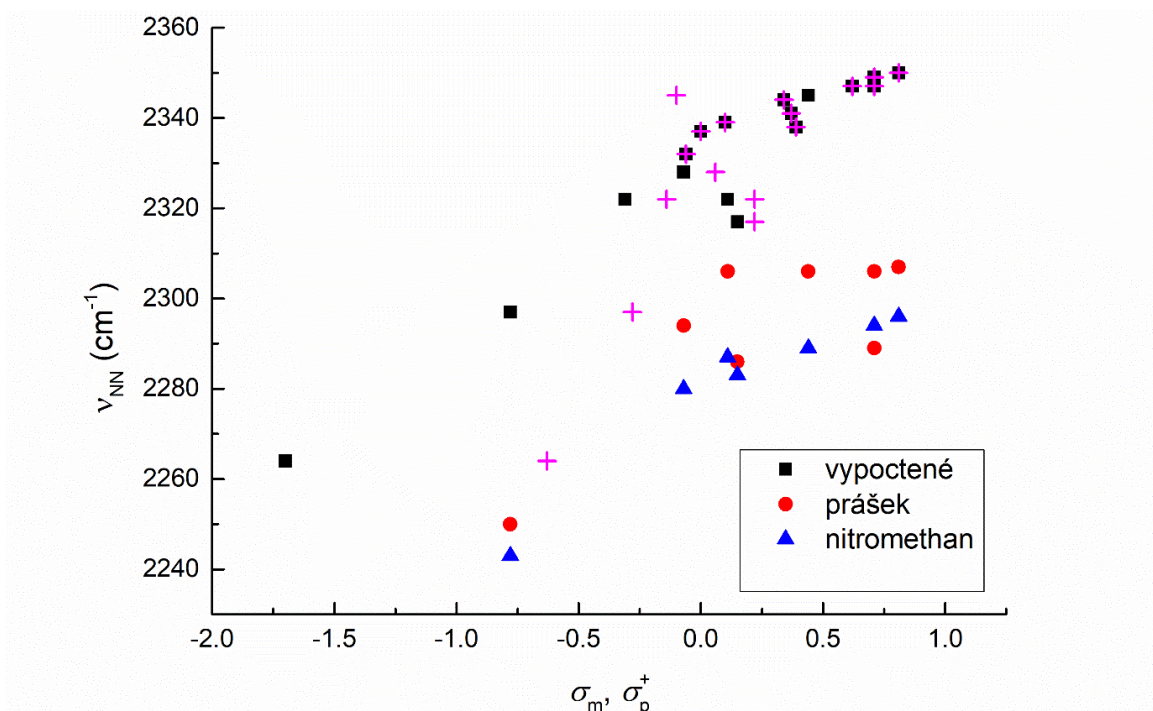
Z proložených dat lze určit hodnoty inflexních bodů získaných závislostí a ty pak použít pro relativní srovnání BDE.

Takto získané elativní hodnoty BDE jsem se dále pokusila korelovat s dalšími veličinami charakteristickými pro substituované diazoniové soli. V první řadě to jsou hodnoty polohy pásů odpovídajících N≡N vibraci v IČ spektrech měřených v pevné fázi ATR technikou či v roztoku nitromethanu. Dále pak s disociačními energií stanovených kvantově-chemickými výpočty. V neposlední řadě pak s hodnotami Hammettových σ konstant. Všechna data ukazuje tabulka 6.

Tabulka 6. Přehled experimentálních a vypočtených výsledků

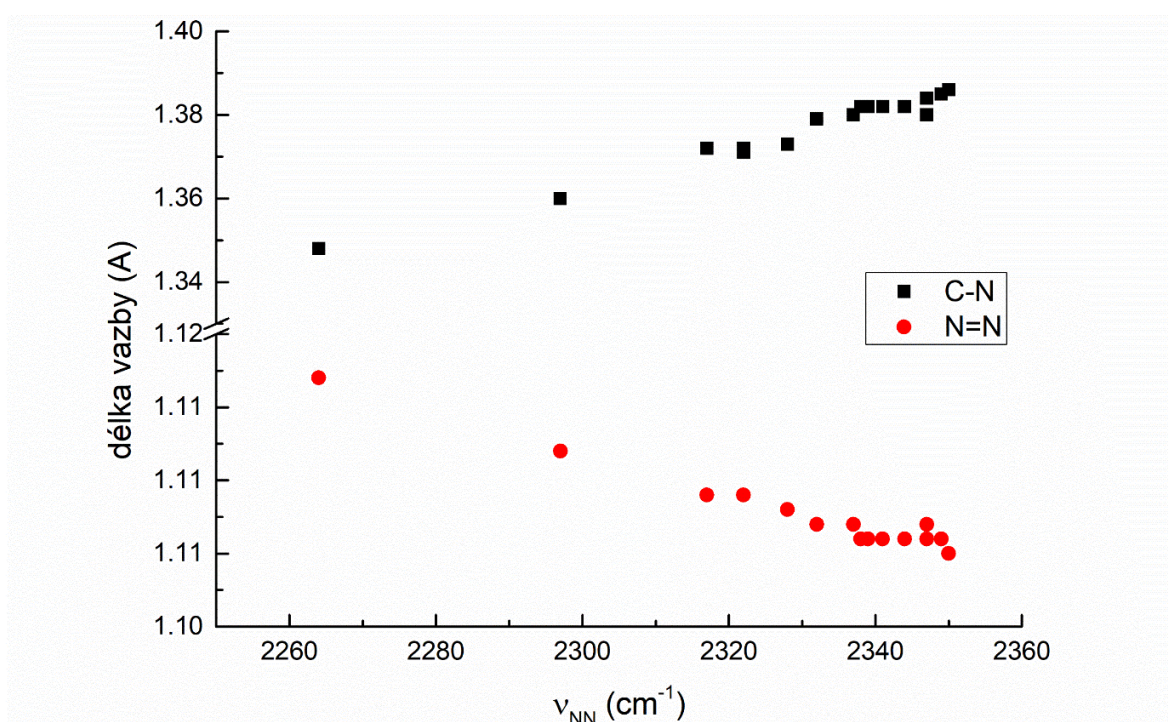
substituent	$\nu_{N\equiv N}$ (cm ⁻¹) (vypočtená)	$\nu_{N\equiv N}$ (cm ⁻¹) (prášek)	$\nu_{N\equiv N}$ (cm ⁻¹) (nitromethan)	BDE (inflex)	$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)	C-N (Å)	N≡N (Å)	σ_p^+
H	2337			3,41	0	1,380	1,107	0
4-F	2328	2294	2280		27	1,373	1,108	-0,07
3-F	2344				8	1,382	1,106	0,34
4-Cl	2322	2306	2287	3,93	21	1,372	1,109	0,11
3-Cl	2341				1	1,382	1,106	0,37
4-Br	2317	2286	2283	4,00	18	1,372	1,109	0,15
3-Br	2338				-3	1,382	1,106	0,39
4-Me	2322			3,37	8	1,371	1,109	-0,31
3-Me	2332				-10	1,379	1,107	-0,06
4-NO ₂	2350	2307	2296	3,71	14	1,386	1,105	0,81
3-NO ₂	2349	2306			10	1,385	1,106	0,71
4-CN	2347	2289	2294		14	1,380	1,107	0,71
3-CN	2347				10	1,384	1,106	0,62
4-OMe	2297	2250	2243	3,85	33	1,360	1,112	-0,78
3-OMe	2339				-12	1,382	1,106	0,1
4-DMA	2264			3,92	34	1,348	1,117	-1,7
4-CF ₃	2345				8			0,44
4-COOEt		2306	2289					

Závislost vlnočtů frekvencí pro vibraci N≡N získané jak z experimentálních tak vypočtených dat na Hammettových σ_p , σ_p^+ a σ_m konstantách ukazuje obrázek 6. Obrázek ukazuje, že vypočtené hodnoty jsou v souladu s experimentálními daty, i když absolutní hodnoty se liší. Je zřejmé, že elektron akceptorní substituenty způsobují posun vlnočtů k vyšším hodnotám. Zajímavé výsledky přináší srovnání použití různých Hammettovských konstant. V případě σ_p konstant je nárůst zprvu relativně prudký, ale v oblasti přechodu od elektron donorních substituentů k elektron akceptorním dochází ke zlomu a závislost strmost ztrácí. Záměna σ_p za σ_p^+ konstanty pak učiní tento zlom nevýrazným, což potvrzuje přímou konjugaci diazoniové skupiny s benzenovým jádrem.



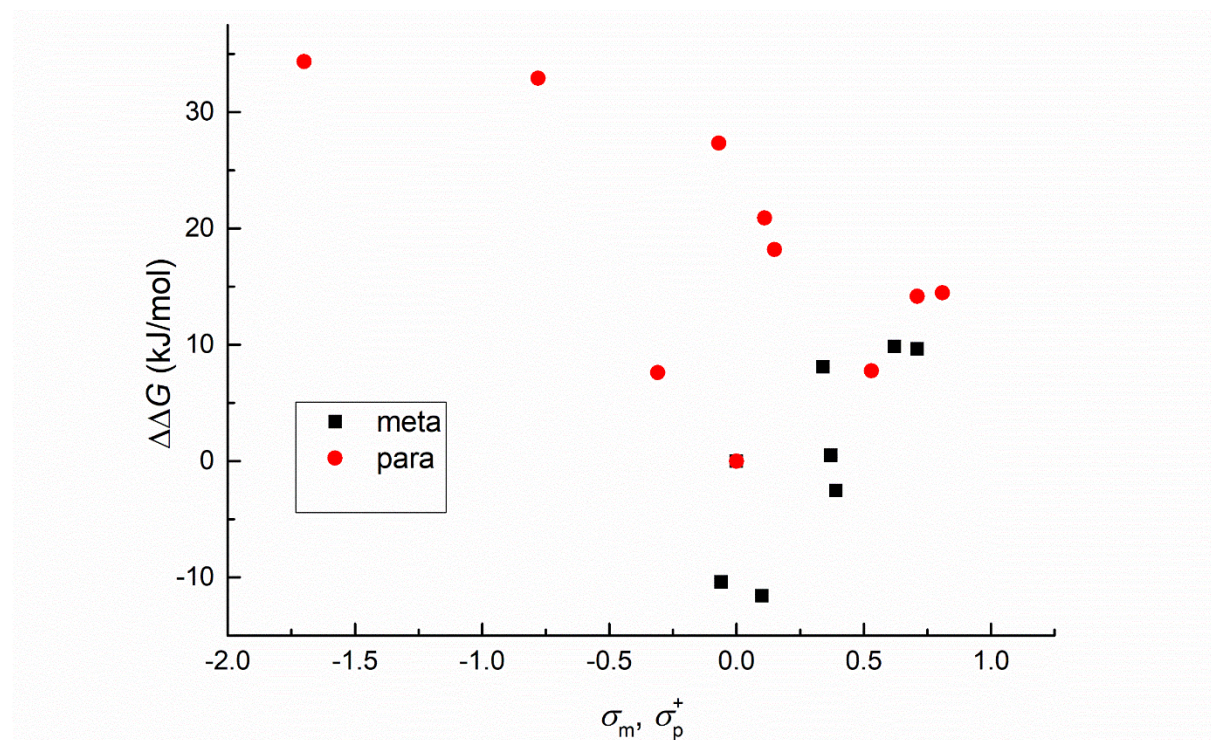
Obrázek 6 Závislost vlnočtů $N\equiv N$ vibrací na Hammettových sigma konstantách.

Vypočtené hodnoty vlnočtů $N\equiv N$ vibrací pochopitelně také dobře koreluje s délkou vazby $N\equiv N$ a $C-N$ (obrázek 7). Zatímco s rostoucí hodnotou vlnočtu se délka vazby $N\equiv N$ zkracuje, naopak délka vazby $C-N$ roste.

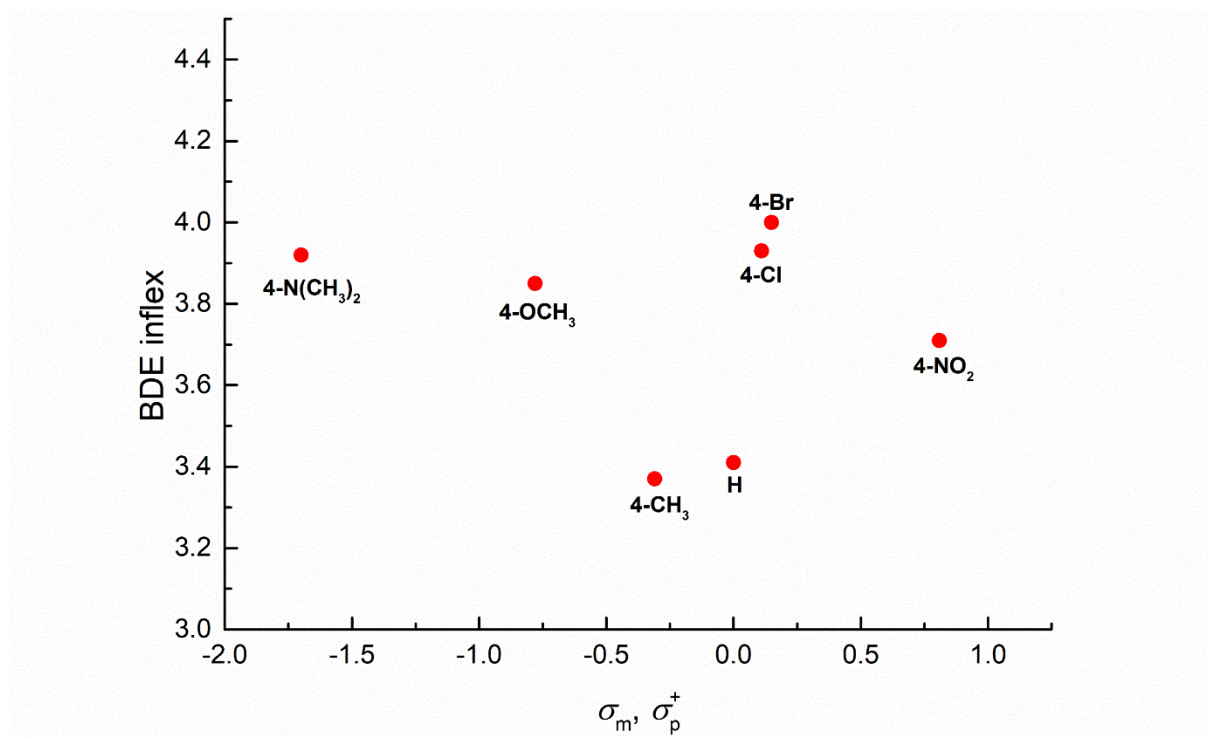


Obrázek 7 Porovnání vypočtených délek vazeb $N\equiv N$ a $C-N$ substituovaných diazoniových solí s vypočtenými vlnočty $N\equiv N$ vibrací.

V další části práce jsem vypočetla disociační energie pro disociaci benzendiazoniových solí (Schéma 19). Jejich relativní energie vztažené k benzendiazoniové soli vynesené proti hammetovským sigma konstantám ilustruje obrázek 8. Je zřejmé, že v případě *meta* substituovaných látek má závislost přibližně lineární charakter, kdy disociační energie roste s rostoucím elektron akceptorním vlivem substituentu. Na druhou stranu v případě *para* substituovaných solí se jedná hodně přibližně o závislost tvaru V, kdy nejnižší disociační energii mají látky se substituenty působícími jen slabými efekty. Obdobný trend (Obrázek 9) lze pozorovat i v analogické závislosti mnou získaných hodnot inflexních bodů získaných při ESI-MS stanovení relativních BDE energií.



Obrázek 8. Závislost vypočtených relativních disociačních energií substituovaných diazoniových solí na Hammettovských konstantách.



Obrázek 9. Závislost určených hodnot inflexních bodů při stanovení relativních BDE na Hammettovských konstantách.

5. ZÁVĚR

V první části práce jsem shrnula poznatky o diazoniových solích, uvedla jejich využití v organické syntéze a dále pospala známé reakce vedoucí k modifikaci tryptofanového skeletu pomocí těchto solí a dalších činidel.

V experimentální části jsem pomocí ESI-MS stanovila relativní disociační energie vazeb substituovaných benzendiazoniových solí, změřila vlnočty vibrací vazby $N\equiv N$ a získané hodnoty korelovala nejen mezi sebou a v závislosti na hammettovských konstantách, ale i s daty vypočtenými pomocí kvantově-chemických výpočtů.

6. POUŽITÁ LITERATURA

[1] CORR, M. J.; SHARMA, S. V.; PUBILL-ULLDEMOLINS, C.; BOWN, R. T.; POIROT, P.; SMITH, D. R. M.; CARTMELL, C.; ABOU FAYAD, A. a GOSS, R. J. M. Sonogashira diversification of unprotected halotryptophans, halotryptophan containing tripeptides; and generation of a new to nature bromo-natural product and its diversification in water. *Chemical Science*. **2017**, 8(3), s. 2039-2046. ISSN 2041-6520.

[2] REAY, Alan J.; HAMMARBACK, L. Anders; BRAY, Joshua T. W.; SHERIDAN, Thomas; TURNBULL, David; WHITWOOD, Adrian C. a FAIRLAMB, Ian J. S. Mild and Regioselective Pd(OAc)₂ Catalyzed C–H Arylation of Tryptophans by [ArN₂]X, Promoted by Tosic Acid. *ACS Catalysis*. **2017**, 7(8), s. 5174-5179. ISSN 2155-5435.

[3] Tryptophan. The Merck Index* online [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2018. Last Revised 2013 [cit. 26. 18. 2018]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m11247/tryptophan?q=authorize>

[4] PRECIADO, Sara; MENDIVE-TAPIA, Lorena; ALBERICIO, Fernando a LAVILLA, Rodolfo. Synthesis of C-2 Arylated Tryptophan Amino Acids and Related Compounds through Palladium-Catalyzed C–H Activation. *Journal of Organic Chemistry*. **2013**, 78(16), s. 8129-8135. ISSN 0022-3263

[5] GONZALEZ, Rodrigo; MENDIVE-TAPIA, Lorena; PASTRIAN, Maria B.; ALBERICIO, Fernando; LAVILLA, Rodolfo; CASCONI, Osvaldo a IANNUCCI, Nancy B. Enhanced antimicrobial activity of a peptide derived from human lysozyme by arylation of its tryptophan residues. *Journal of Peptide Science*. **2016**, 22(2), s. 123-128. ISSN 1075-2617

[6] NICOLAOU, K. C.; BULGER, Paul G. a SARLAH, David. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions in Total Synthesis. *Angewandte Chemie, International Edition*. **2005**, 44(29), s. 4442-4489. ISSN:1433-7851

[7] ROY, Abhijeet Deb; GOSS, Rebecca J. M.; WAGNER, Gerd K. a WINN, Michael. Development of fluorescent aryltryptophans by Pd mediated cross-coupling of unprotected halotryptophans. *Chemical Communications*. **2008**, 39, s. 4831-4833. ISSN 1359-7345.

[8] SVOBODA, J. *Organická syntéza I*. Vyd. 1 Praha: VŠCHT, 2000, s. 227–228. ISBN 80-7080-385-1. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-385-1/pages-img/227.html

- [9] REAY, Alan J.; WILLIAMS, Thomas J. a FAIRLAMB, Ian J. S. Unified mild reaction conditions for C2-selective Pd-catalysed tryptophan arylation, including tryptophan-containing peptides. *Organic & biomolecular chemistry*. **2015**, 13(30), s. 8298-309. ISSN 1477-0539
- [10] ROGLANS, Anna; PLA-QUINTANA, Anna a MORENO-MANAS, Marcial. Diazonium Salts as Substrates in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Chemical Reviews* . **2006**, 106(11), 4622-4643. ISSN:0009-2665.
- [11] RAWAL, V.H. *Organic synthesis*. 1. Wiley, 2016, s. 440. ISBN 978-119280682
- [12] M. Kalita; K.J. Tamuli; P. Barman; B. Sarma; R. Baruah; H.P.D. Boruah. Synthesis, crystal structure, bioactivities of Ni(II), Cu(II), Co(II) and Pd(II) complexes with unsymmetrical thioether donor Schiff base: phosphine free Pd(II) complex catalyzed Suzuki reaction. *Polyhedron*. **2015**, 97, s 140-147. ISSN 0277-5387. Dostupné také z <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.05.020>
- [13] KOSTATS, I.D. *Suzuki–Miyaura Cross- Coupling Reaction and Potential Applications*. **2017**, s. 264 [cit. 14. 6. 2019]. ISBN 978-3-03842-556-4. Dostupné také z: <http://www.MDPI.com/books/pdfview/book/388>
- [14] MEIJERE de Armin, DIEDERICH, Franois. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*. WILEY-VCH, Weinheim. Second Edition, Vol. 1 a 2, 2004. ISBN 3-527-30518-1.
- [15] JUTAND, Anny; NÉGRI, Serge a PRINCIPAUD, Anna. Formation of ArPdXL(amine) Complexes by Substitution of One Phosphane Ligand by an Amine in trans-ArPdX(PPh₃)₂ Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2005**, s. 631–635. ISSN 1434–1948.
- [16] WILLIAMS J. Thomas; REAY J Alan; WHITWOODA C Adrian a FAIRLAMB J. S. Ian. A mild and selective Pd-mediated methodology for the synthesis of highly fluorescent 2-arylated tryptophans and tryptophan-containing peptides: a catalytic role for Pd⁰ nanoparticles?. *Chemical Communication.*, **2014**,50(23), s 3052-3054
- [17] LOACH, Richard P.; FENTON, Owen S.; AMAIKE, Kazuma; SIEGEL, Dustin S.; OZKAL, Erhan a MOVASSAGHI, Mohammad. C7-derivatization of C3-alkylindoles including tryptophans and tryptamines. *Journal of Organic Chemistry* . **2014**, 79(22), s. 11254-11263. ISSN 0022-3263.

[18] WITZEL, Sina; XIE, Jin; RUDOLPH, Matthias; HASHMI, A. a STEPHEN, K. Photosensitizer-Free, Gold-Catalyzed C–C Cross-Coupling of Boronic Acids and Diazonium Salts Enabled by Visible Light. *Advanced Synthesis & Catalysis*. **2017**, 359(9), s. 1522-1528. ISSN 1615-4150.

[19] CS Ho; CWK Lam; MHM Chan; RCK Cheung; LK Law; LCW Lit; KF Ng; MWM Suen; a HL Tai. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev.* **2003**;24(1):3–12.

[20] ZINS, Emilie-Laure; PEPE, Claude a SCHROEDER, Detlef. Energy-dependent dissociation of benzyropyridinium ions in an ion-trap mass spectrometer *Journal of Mass Spectrometry*. **2010**,45(11), s. 1253-1260. ISSN 1076-5174.