

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



NMR spektroskopie ve strukturní analýze  
izolovaných alkaloidů

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Jana Maříková

Školitel: doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.

2021



*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením svého školitele). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

Mgr. Jana Maříková





## PODĚKOVÁNÍ

Za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc během mého postgraduálního studia chci velice poděkovat svému školiteli doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. Můj velký dík patří také mému trpělivému kolegovi PharmDr. Petru Matoušovi, Ph.D., neboť mi byl velkou oporou a technickým rádcem při práci s tímto obsáhlým dokumentem.

Kolektivu Katedry farmaceutické botaniky pod vedením prof. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D. děkuji za neustálé zásobování naší laboratoře novými vzorky, ať už látek izolovaných nebo syntetizovaných, neboť díky této intenzivní spolupráci vznikla celá řada výsledků, které jsou, nebo v blízké době budou, publikovány.

Poděkování samozřejmě patří všem členům vědecké skupiny prof. RNDr. Milana Poura, Ph.D., kteří dohromady vytvořili pozitivní a produktivní pracovní prostředí. Zejména PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D., PharmDr. Zbyňku Brůžovi, Ph.D., MSc. Stefanii M. Perdomo, Mgr. Rastislavu Antalovi, Mgr. Michalu Kadaníkovi, PharmDr. Jakubu Radkovi Štočkovi, PharmDr. Pavlu Horkému, Ph.D., a dále také všem kolegům z Katedry organické a bioorganické chemie.

V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich neutuchající podporu a pochopení během celého mého studia.

Disertační práce vznikla za podpory Univerzity Karlovy (SVV 260 547, GAUK 178 518), Grantové agentury České republiky (18-17868S) a projektu EFSA-CDN spolufinancovaného Evropskou unií (reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841).



## ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Mgr. Jana Maříková

Školitel: doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.

Název disertační práce: NMR spektroskopie ve strukturní analýze izolovaných alkaloidů

Tato disertační práce se zabývá určením struktury sekundárních metabolitů, přesněji alkaloidů, získaných ze dvou různých rostlinných čeledí – Amaryllidaceae a Apocynaceae. Izolace popisovaných alkaloidů byla provedena kolegy na spolupracujícím pracovišti Katedry farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy.

Analýza vzorků, získaných z rostlinného materiálu, metodami nukleární magnetické rezonance (NMR) byla hlavním klíčem k úspěšnému osvětlení konstituce, a v některých případech i konfigurace identifikovaných molekul. Byly použity jednodimenzionální NMR experimenty, a také metody multidimenzionální a dynamické NMR analýzy. V některých případech pak bylo k analýze využito specifických vlastností chirálních posunových činidel pro stanovení enantiomerní čistoty. Kromě NMR dat byly u zkoumaných látek získány informace z dalších důležitých analytických technik, běžně používaných v oblasti přírodních látek.

Výsledkem práce je objasnění 30 struktur alkaloidů dosud v literatuře nepopsaných nebo nedostatečně charakterizovaných. U několika těchto látek byly popsány nové strukturní typy a struktury pravděpodobně patřící izolačním artefaktům. Dalších 43 látek bylo potvrzeno shodou experimentálních analytických dat s údaji uvedenými v literatuře.



## ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: Mgr. Jana Maříková

Supervisor: doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.

Title of Doctoral Thesis: NMR Spectroscopy in Structure Elucidation of Isolated Alkaloids

This doctoral thesis deals with the structure elucidation of secondary metabolites isolated from two different plant families – Amaryllidaceae and Apocynaceae. Isolation of analyzed compounds from these plants was performed by colleagues from the Department of Pharmaceutical Botany.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was the crucial method for the structure determination of isolated alkaloids. Processed data acquired from one-dimensional NMR experiments, as well as multidimensional and dynamic NMR methods, led to the identification of various alkaloid structures. Furthermore, in certain specific cases of the analysis, chiral solvents were employed to determine enantiomeric purity. Other analytical experiments commonly used in the field of natural product identification were carried out.

The outcome of this work is the elucidation of 30 alkaloid structures not described in the literature or insufficiently characterized. Several new structural types have been identified, as well as structures representing isolation artifacts. Another 43 substances were confirmed by the comparison of experimental and published analytical data.



# OBSAH

---

1	ÚVOD .....	15
1.1	Strukturní analýza.....	17
1.1.1	Nukleární magnetická rezonance.....	17
1.1.2	Metody chiroptické analýzy .....	31
1.2	Rostliny a jejich alkaloidy.....	35
1.2.1	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Carlton.....	37
1.2.2	<i>Zephyranthes citrina</i> Baker .....	44
1.2.3	<i>Vinca minor</i> L. ....	47
1.2.4	Základy izolace alkaloidů.....	53
2	CÍL PRÁCE .....	55
3	VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....	56
3.1	Látky izolované z <i>Narcissus pseudonarcissus</i> var. Carlton .....	57
	U1C-B (1a).....	58
	U1b (2a) .....	60
	U1A-B (3a).....	61
	U1A-A (4a) .....	64
	U1c1 (5a) .....	66
	U2B (6a).....	68
	U1c2 (7a) .....	72
	Fw-2 other (8a) .....	74
	Fw-2 (9a) .....	77
	FAI-3-1-4b (10a) .....	80
3.2	Látky izolované ze <i>Zephyranthes citrina</i> Baker .....	82
	ZC-F3-5 (11a) .....	83
	ZC-F3-4 (12a) .....	88
	ZC-15-3-3-3 (13a).....	90
	ZC-F4-ML-1-67 (14a) .....	94
	ZC-5-6-1 (15a).....	97
	ZC-5-6-3 (16a).....	99
	Z2-3-1A (17a) .....	102
	ZC-15-1 (18a).....	104
	ZC-15-2 (19a).....	106
	ZC-15-3 (20a).....	108
3.3	Látky izolované z <i>Vinca minor</i> L.....	110
	VM81-93-3 (21a) .....	112
	VM-11-4-4 (22a) .....	114

RV-010b1 (23a).....	117
VM215-258-17-26-4 (24a) .....	122
VM73-110-2 (25a).....	125
VM42-48-2 (26a) .....	127
RV-001a (27a) .....	130
RV-010a (28a) .....	134
RV-017 (29a) .....	137
RV-006a (30a) .....	140
4 ZÁVĚR.....	143
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	144
5.1 Přístrojové vybavení a obecné experimentální postupy .....	144
5.2 Charakterizace identifikovaných látek .....	145
6 POUŽITÁ LITERATURA .....	155
7 SEZNAM PRACÍ KANDIDÁTA .....	167
Publikace .....	167
Účast na konferencích .....	169



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AChE	acetylcholinesterasa
ADEQUATE	<i>adequate sensitivity double-quantum spectroscopy</i>
9-AMA	2-(9-anthryl)-2-methoxyoctová kyselina
BPG	<i>N</i> -Boc-fenylglycin
br d	široký dublet <i>broad doublet</i>
bs	široký singlet <i>broad singlet</i>
BuChE	butyrylcholinesterasa
CD	cirkulární dichrosimus <i>circular dichroism</i>
CNS	centrální nervová soustava
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
1D	jednodimenzionální
2D	dvoudimenzionální
dd	dublet dubletů
ddt	dublet dubletu tripletů
dt	dublet tripletů
ee	enantiomerní přebytek <i>enantiomeric excess</i>
ekv	ekvivalent
Eu(fod) <sub>3</sub>	tris(6,6,7,7,8,8,8-heptafluor-2,2-dimethyl-3,5-oktadionáto)europitý komplex
Eu(THC) <sub>3</sub>	tris[3-(trifluormethylhydroxymethylen)-kamforato]europitý komplex
FID	signál volné precese, volně indukovaný signál <i>free induction decay</i>
gHSQC	<i>gradient heteronuclear single-quantum coherence/correlation spectroscopy</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond coherence/correlation spectroscopy</i>
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením <i>high-resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum coherence/correlation spectroscopy</i>
H2BC	<i>heteronuclear two-bond correlation</i>
IČ	infračervený
INADEQUATE	<i>incredible natural-abundance double-quantum transfer experiment</i>
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LSR	lanthanoidová chirální posunová činidla
m	multiplet
MPA	methoxy-2-fenyloctová kyselina
MRI	zobrazovací technika magnetické rezonance <i>magnetic resonance imaging</i>

MS	hmotnostní spektrometrie <i>mass spectrometry</i>
MTPA	2-methoxy-2-(trifluormethyl)fenyloctová kyselina
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance <i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
ORTEP	<i>oak ridge thermal ellipsoid plot</i>
t	kvartet
qNMR	kvantitativní nukleární magnetická rezonance <i>quantitative nuclear magnetic resonance</i>
s	singlet
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>
SÚKL	Státní úřad pro kontrolu léčiv
UV	ultrafialový <i>ultraviolet</i>
t	triplet
td	triplet dubletů
TBBA	2-(2-trifluormethyl)-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol-1-yl)benzoová kyselina
TFA	trifluoroctová kyselina

# 1 ÚVOD

Člověk využívá empiricky účinky alkaloidů v rostlinných drogách v rámci tradiční medicíny již od nepaměti. Archeologické nálezy a historické zdroje zmiňují období 4000 př. n. l. jako počátek této éry.<sup>1,2</sup> Avšak lze předpokládat, že člověk využíval tyto mocné nástroje přírody již mnohem dříve, ať už pro jejich pozitivní účinky na lidské tělo, nebo pro travičské záměry.



**Obrázek 1** Olejomalba s názvem „La Mort de Socrates”, kterou zhotovil Jacques-Luis David v roce 1787 (převzato z internetového zdroje<sup>3</sup>)

Otrava byla velmi populárním stylem likvidace nepřátel ve starém Římě. Bohužel takový osud stihl v roce 399 př. n. l. pokrokového athénské filozofa Sokrata, který byl nucen svými vězňáky vypít odvar z bolehlavu plamatého (*Conium maculatum* L.). Intoxikace obsaženým koniinem zapříčinila paralýzu Sokratova dýchacího svalstva, což vedlo k jeho smrti při plném vědomí.<sup>4,5</sup>

Díky technologickému pokroku přineslo 19. století možnost zkoumat tyto často vysoce potentní molekuly i z hlediska struktury. První izolaci alkaloidu (morfinu) z rostlinného materiálu popsal již v roce 1805 Sertürner.<sup>6</sup> Nicméně struktura tohoto alkaloidu zůstala záhadou až do roku 1952, kdy morfin spolu s kodeinem poprvé připravili Gates a Tschudi cestou totální syntézy a byla tak potvrzena predikovaná struktura Gullandem a Robinsonem (1925).<sup>6</sup> Toto je ukázkový příklad průběhu potvrzení struktury molekuly přírodní látky.

Z výše popsaného je zřejmé, že fascinace alkaloidními látkami provází lidské pokolení dlouhá staletí. Průkopnická analytická metoda v podobě nukleární magnetické rezonance (NMR) přinesla 50. léta. Typická pro ni byla tehdejší nízká instrumentální senzitivita a vysoká cena. V té době otištěné vědecké články čítaly pouze interpretace vodíkových spekter, tento trend se objevoval zhruba do 90. let. Dále byla často prezentována doprovodná analytická data (elementární analýza, UV a IČ spektroskopie, uvedení hodnot retenčního faktoru a specifické optické otáčivosti), či případně výsledky chemické modifikace zkoumané látky. Publikované výsledky pocházející z doby před rozmachem NMR spektroskopie mohou být dnes spíše

na škodu. Neboť redakce současných vědeckých časopisů zpravidla spatřují nízký inovativní přínos v prezentaci řádné identifikace struktur již dříve objevených látek. Avšak takové publikace by často mohly zamezit zbytečným nedorozuměním.

V současné době jsou používány především techniky NMR spektroskopie v kapalně fázi, která je nedestruktivní metodou objasnění konstituce molekuly a někdy i její konfigurace. Výsledky měření NMR experimentů ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR; občas jsou popisována i  $^{15}\text{N}$  NMR spektra; homokorelované a heterokorelované 2D NMR experimenty jsou nezbytnou součástí) jsou většinou dostatečně průkazné, robustní a zejména reprodukovatelné.<sup>7</sup> Bohužel některé práce prezentují spektra různých solí izolovaných alkaloidů na místo volné báze. Použití těchto referenčních dat pro potvrzení neionizované formy alkaloidu pak není zcela *lege artis* (např. Shitara a spol.<sup>8</sup>, Abouzeid a spol.<sup>9</sup> uvádí interpretace solí trifluoroctové kyseliny (TFA) izolovaných alkaloidů).

Další z důležitých metod pro určování struktury je rentgenová krystalografie. Provedení této analýzy je podmíněno získáním monokrystalické formy vzorku o dostatečné velikosti pro měření, což je z malého množství izolovaných, většinou amorfních sekundárních metabolitů rostlin často problematické připravit. Samozřejmě nelze nepřipomenout další analytické techniky hmotnostní spektrometrie (MS), cirkulárního dichroismu (CD), polarimetrie, aj.

## 1.1 Strukturní analýza

Jak již bylo zmíněno, současné metody strukturní analýzy přírodních látek se značně liší od těch v minulosti využívaných. Příslušně upravené vzorky přírodních látek jsou charakterizovány pomocí NMR, MS a/nebo rentgenové difraktometrie. Výsledky těchto analýz jsou zpravidla doplněny daty optických analytických metod, jako jsou například data z polarimetrie, infračervené spektroskopie, cirkulárního dichroismu a v některých případech mohou být nápomocná i data z ultrafialové spektroskopie.

Výsledky jmenovaných analýz jsou v souvislosti s identifikací molekul porovnávány s dostupnými daty v publikovaných vědeckých článcích. Tato mnohdy náročná rešeršní práce vyústí do jedné z následujících možností:

- V elektronických informačních databázích není nalezena shoda identifikované struktury. Zveřejnění výsledků vynaložené práce bude pravděpodobně snadno dosažitelné (za předpokladu určení konstituce s absolutní konfigurací molekuly). Ovšem pokud byla určena pouze relativní konfigurace molekuly, může být její úspěšná prezentace problémová.
- Struktura alkaloidu je popsána, avšak nebyla publikována relevantní referenční data. Příkladem jsou články, kde je publikováno pouze  $^1\text{H}$  NMR spektrum nebo jeho část; nebo je struktura identifikována pomocí rentgenové krystalografie a NMR data chybí (přitom měření NMR spekter patří k nejdostupnějším metodám strukturní analýzy).
- Alkaloid je zcela popsán v literatuře a informace se shodují s naměřenými daty.
- Data o alkaloidu nejsou dostupná v literatuře, ale látku je možné zakoupit u výrobce/distributora chemikálií a použít jako referenci (výjimečně).

### 1.1.1 Nukleární magnetická rezonance

Existence nukleární magnetické rezonance byla objevena teprve v roce 1938 (Isidor Isaac Rabi byl za tento objev oceněn v roce 1944 Nobelovou cenou za fyziku). Následovala série objevů, která přispěla k zavedení NMR spektroskopie, jakožto důležité a dnes široce používané analytické metody. Jedná se tedy o obor poměrně mladý a dynamicky se rozvíjející. Nabízí široké možnosti různých aplikací, ať už pro strukturní analýzu látek známých i neznámých, syntetizovaných či izolovaných, nebo pro hodnocení kvantity v metabolomice (qNMR), aj. Díky této metodě lze sledovat dynamické procesy, jako je kinetický průběh reakce nebo chemická výměna. Pravděpodobně v populaci nejnámějším využitím magnetických vlastností atomového jádra je „magnetická rezonance“ jako klinická zobrazovací metoda (MRI) používaná zejména ve zdravotnictví ke sledování stavby měkkých tkání. Toto je jen hrubý nástin aplikační různorodosti, kterou NMR spektroskopie poskytuje.

#### 1.1.1.1 Základní teorie NMR spektroskopie

Zmiňovanému objevu Rabiho předcházelo odhalení magnetického momentu jádra, za což byl oceněn v roce 1943 další laureát Nobelovy ceny za fyziku Otto Stern. V té době téměř neprobádaná kvantová fyzika částic se začala rychle rozvíjet, což také značně přispělo k akceleraci rozvoje a pochopení NMR.<sup>10</sup>

**Tabulka 1-1** Magnetické vlastnosti izotopů nejčastěji se vyskytujících v alkaloidech<sup>11</sup>

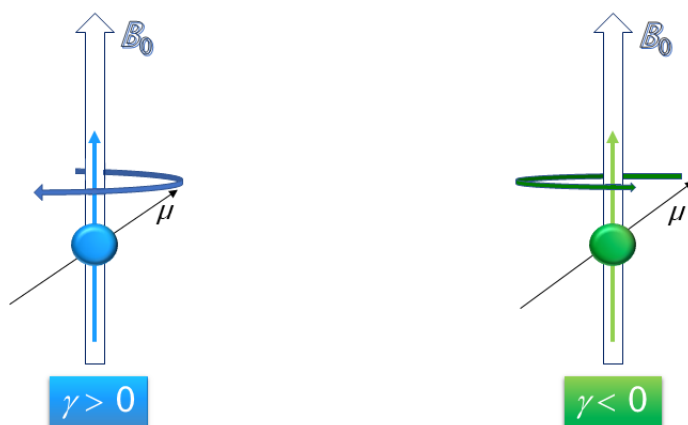
atomové jádro	$s$	přirozený výskyt [%]	$\gamma$ [ $10^7 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$^1\text{H}$	1/2	99,99	26,75
$^2\text{H}$	1	0,010	4,11
$^{12}\text{C}$	0	98,93	-
$^{13}\text{C}$	1/2	1,07	6,73
$^{14}\text{N}$	1	99,63	1,93
$^{15}\text{N}$	1/2	0,37	-2,71
$^{16}\text{O}$	0	99,96	-
$^{17}\text{O}$	5/2	0,04	-3,63

\* znaménko hodnoty gyromagnetického poměru vyjadřuje směr precese jádra okolo pole  $\mathbf{B}_0$  – kladné hodnoty proti směru, záporné po směru hodinových ručiček

Nenulová hodnota spinového kvantového čísla  $s$  (potažmo spinového momentu hybnosti jádra  $l$ ) je důležitou vlastností NMR aktivních jader (Tabulka 1-1). Vztah magnetického momentu ( $\mu$ ) a spinového kvantového čísla  $s$  je vyjádřen rovnicí (1). Redukovaná Planckova konstanta má hodnotu  $\hbar = 1,054\,571\,817 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$  a do rovnice je zavedena, neboť vynásobením hodnot veličin  $s$  a  $\hbar$  je získána hodnota úhlového momentu daného jádra, která vyjadřuje jeho rotační moment. Díky magnetickému momentu, pak lze u jádra indukovat magnetismus vnějším magnetickým polem.<sup>10</sup>

$$\mu = \gamma s \hbar \quad (1)$$

Konstanta  $\gamma$ , charakteristická pro každý izotop, je známa pod pojmem gyromagnetický poměr a vyjadřuje poměr magnetického momentu a momentu hybnosti (jaderného spinu) daného jádra. Tedy, je-li atomové jádro s definovaným  $\gamma$  vystaveno vnějšímu magnetickému poli ( $\mathbf{B}_0$ ) o určité indukci, začne se u něj projevovat precesní pohyb (opisuje plášť kužele) magnetického momentu okolo osy určené směrem  $\mathbf{B}_0$  (Obrázek 2). Výslednice působení možných orientací magnetického momentu  $\mu$  se označuje jako vektor magnetizace  $\mathbf{M}$ .<sup>12</sup>



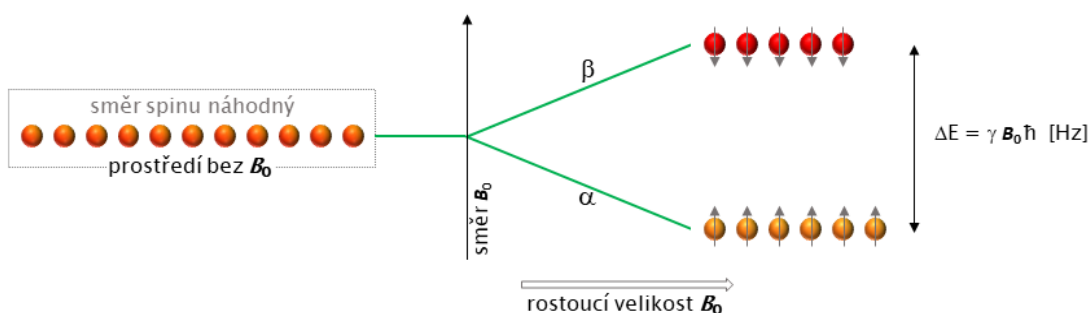
**Obrázek 2** Znárodnění precese jádra se záporným  $\gamma$  a kladným  $\gamma$  ve směru působení  $\mathbf{B}_0$  (dle pravidla pravé ruky je Larmorova precese jádra proti směru hodinových ručiček považována za kladnou). Směr  $\mathbf{M}$  je shodný se směrem působení  $\mathbf{B}_0$ <sup>12</sup>

Orientace  $\mathbf{M}$  závisí na směru působení  $\mathbf{B}_0$ . Celkově se tento pohyb jádra nazývá Larmorova precesní frekvence ( $\nu$ ). Vztahy jmenovaných veličin popisuje rovnice (2).<sup>10</sup>

$$\nu = \frac{-\gamma \mathbf{B}_0}{2\pi} \text{ [Hz]} \quad (2)$$

V roce 1945 Felix Bloch a Edward Milles Purcell nezávisle na sobě popsali, že jádra magneticky aktivních atomů absorbující radiofrekvenční záření v silně magnetickém poli jsou rozdělena do povolených energetických hladin (jejich jaderný spin je kvantován). O sedm let později byli odměněni za tento poznatek Nobelovou cenou.<sup>12</sup>

Počet těchto degenerovaných energetických hladin (orientací spinu) je definován vztahem  $2s + 1$ . Toto dělení je nazýváno Zeemanův jev a u jader majících  $s = 1/2$  povoluje dvě energetické hladiny. Na nižší hladině ( $\alpha$ ) se nachází nepatrný přebytek jader, které konají precesní pohyb ve směru  $\mathbf{B}_0$ . Vyšší Zeemanova hladina ( $\beta$ ) je obsazena nepatrně menším množstvím jader, jejichž  $\mathbf{M}$  má opačný směr než  $\mathbf{B}_0$ . Velikost tohoto energetického rozdílu je daná velikostí působícího magnetického pole a gyromagnetickým poměrem sledovaného jádra (Obrázek 3). Čím větší je síla působící indukce vnějšího magnetického pole, tím větší je rozdíl mezi stavem  $\alpha$  a  $\beta$  ( $\Delta E$ ) a v důsledku toho se zvyšuje citlivost této analýzy.<sup>10, 12</sup>

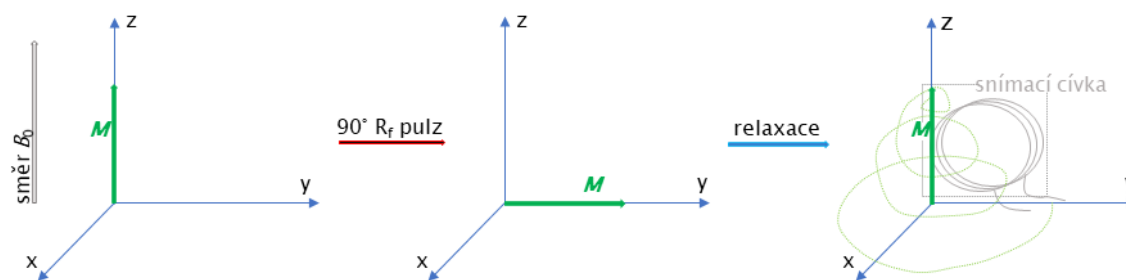


**Obrázek 3** Grafické znázornění rozdělení jaderných Zeemanových hladin v závislosti na velikosti  $\mathbf{B}_0$  (platí pro jádra  $s = 1/2$ ). Přebytek jader  $N_\alpha$  je jen názorný, skutečný přebytek je zmíněn v textu a je závislý na velikosti  $\mathbf{B}_0$

Dosažením do rovnice (3) je možné identifikovat počty jader na hladině  $\alpha$  a  $\beta$ , kde Boltzmannova konstanta  $k_B = 1,380649 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$  a  $T$  je teplota [K]. Například indukce magnetického pole o velikosti 11,74 T rozdělí jádra vodíku v rozložení 100 000 jader na hladině  $\alpha$  a 99 992 jader na hladině  $\beta$ .<sup>10</sup>

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} \quad (3)$$

Absorbují-li jádra na nižší energetické hladině  $\alpha$  elektromagnetické  $R_f$  záření o frekvenci blízké své Larmorovy precesi (představuje oscilující magnetické pole  $\mathbf{B}_1$ ), dojde k přechodu jádra z hladiny  $\alpha$  na hladinu  $\beta$  (vychýlí se směr  $\mathbf{M}$  o úhel, který je úměrný době trvání použitého pulzu). Po ozáření dochází k relaxaci jádra zpět do termodynamické rovnováhy na hladinu  $\alpha$ .<sup>10, 12, 13</sup>



**Obrázek 4** Směr  $M$  před  $R_f$  pulzem, po sklopení o  $90^\circ$  a následná relaxace  $M$  z roviny  $xy$  (kolmé na  $B_0$ ) zpět do rovnováhy podél osy  $z$ , která indukuje střídavý proud na snímací cívce (záznam amplitudy signálu volné precese klesá s časem)<sup>12</sup>

Díky příčné precesi vektoru magnetizace je možné sledovat volně indukovaný signál (free induction decay – FID) snímáný v akvizici době experimentu prostřednictvím indukce střídavého proudu na snímací cívce, která je kolmá ke směru  $B_0$  instrumentu. Signál je poté zesílen předzesilovačem a zesilovačem (signál sám o sobě je velice slabý). Převeden na kmitočet přijímačem v přijímacím zařízení (NMR konzole) a následně zobrazen programem připojeného operačního počítače.<sup>10, 14</sup>

Magnetická rezonance jádra je tedy způsobena energetickým přechodem mezi popsány hladinami, který nastane při absorpci elektromagnetického záření o určité frekvenci. Tato frekvence je rovna frekvenci precesního pohybu jádra kolem osy  $B_0$ , čímž je splněna rezonanční podmínka.<sup>10</sup>

### 1.1.1.2 Fourierova transformace v NMR spektroskopii

Fourierova transformace (FT) je matematická operace, která se v NMR spektroskopii využívá k převedení časové závislosti intenzity indukovaného proudu na měřící cívce (FID) na závislost frekvenční (NMR spektrum). Jediné omezení tohoto matematického algoritmu se týče počtu bodů, které budou transformovány (číslo musí být po vydělení dvěma celé číslo).<sup>12</sup>

V 60. letech Richard Robert Ernst (Curych) a Ray Freeman (Cambridge) a jejich kolegové přispěli zavedením FT do NMR spektroskopie. Současně vypracovali novou metodiku ozařování jader. Použili intenzivní velmi krátké radiofrekvenční pulzy (doba trvání řádově  $\mu s$ ). Tyto modifikace umožnily akumulovat skeny, čímž se výrazně zvýšila citlivosti analýzy a zjednodušila se interpretace spekter. Nastal mohutný rozmach NMR techniky. V 70. letech následoval objev dvoudimenzionální techniky měření spekter, kde zpracování probíhá dvojnásobnou FT. Profesor Ernst byl odměněn za své objevy v roce 1991 Nobelovou cenou za chemii.<sup>7, 15</sup>

### 1.1.1.3 Jednodimenzionální NMR spektrum

#### Chemický posun $\delta$ aneb vliv stínění elektronu na jádro

Elektrony mají svůj vlastní magnetický moment, jehož vektor magnetizace je orientován protichůdně vnějšímu magnetickému poli  $B_0$ . Tím dochází ke stínění působení  $B_0$  na dané atomové jádro. Takto modifikovaná magnetická indukce nese název efektivní magnetické pole  $B_{ef}$ . Velikost stínícího efektu elektronového oblaku je vyjádřena stínící konstantou  $\sigma$ , jež je závislá na velikosti indukce  $B_0$ . Rovnice (5) vyjadřuje popisovaný vztah.<sup>10, 12</sup>



$$B_{\text{ef}} = B_0 \cdot (1 - \sigma) \quad (5)$$

Právě díky tomuto efektu je NMR spektroskopie tolik využívanou analytickou metodou, neboť tento jev umožňuje odlišit jádra stejného izotopu mající odlišné chemické okolí (elektronovou hustotu). Například jsou-li  $^1\text{H}$  jádra vystavena magnetické indukci 11,74 T, nerezonují pouze s frekvencí 500 MHz, ale vlivem  $\sigma$  lze též pozorovat jemné změny v jejich frekvenci. Tento vztah popisuje rovnice (6).

$$\nu = \frac{\gamma B_{\text{ef}}}{2\pi} \quad (6)$$

Hodnota rezonance signálu v NMR spektrech se neuvádí v jednotkách její frekvence, neboť by pak interpretace byla velice dlouhá, obsahující špatně čitelná čísla, například 500 002 025 (1H, s). Hlavním důvodem nepoužívání frekvence rezonance v charakterizaci je její závislost na indukci vnějšího magnetického pole (např. rezonanční frekvence  $^1\text{H}$  atomů je 60 MHz, působí-li na ně magnetické pole o síle 1,4 T; působením pole o síle 14,1 T je pak tato frekvence 600 MHz). Pro tento účel byla zavedena stupnice parts per milion (ppm), která umožňuje porovnávání spekter získaných při různě velkých pracovních indukcích a současně značně zjednodušuje zápis popisu spekter. Rovnice (7) uvádí vztah chemického posunu jádra  $x$  ( $\delta_x$ ), rezonanční frekvence jádra  $x$  ( $\nu_x$ ) a rezonanční frekvence standardu ( $\nu_{\text{ref}}$ ).<sup>10, 13</sup>

$$\delta_x = \frac{(\nu_x - \nu_{\text{ref}})}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6 \quad (7)$$

Různé druhy NMR aktivních jader si žádají použití různých druhů referenčních sloučenin. Pro měření  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  jader je zaveden standard tetramethylsilanu (TMS), pro referenci jader  $^{15}\text{N}$  doporučuje Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) použít nitromethan, alternativou je pak roztok  $\text{NH}_3$ ; možné je použít také např. roztok močoviny.<sup>11</sup>

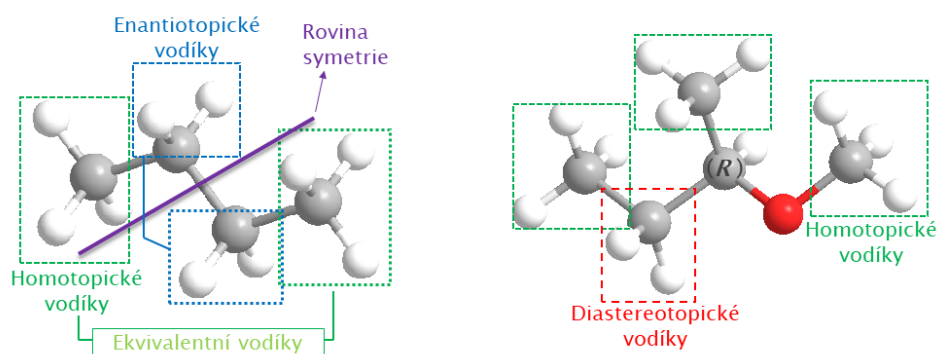
Velikost stínění sledovaných atomů ovlivňuje zejména lokální elektronová hustota (elektronegativita, indukční a mezomerní efekty) a hybridizace. Zvláštním efektem je anizotropní jev vyskytující se například u terminálního alkynového vodíku či u vyměnitelných vodíkových atomů porfyrinového skeletu.<sup>13</sup>

## Topicita

Chemicky a magneticky ekvivalentní jádra rezonují se stejnou frekvencí, což je zapříčiněno totožným chemickým a magnetickým okolím. Ve spektru je proto zřetelný signál o intenzitě úměrné počtu ekvivalentních jader, který představuje. Současně nedochází ke skalární interakci mezi těmito jádry. V  $^1\text{H}$  NMR spektru se často překrývají i signály neekvivalentních jader, což je dáno malými rozdíly v  $B_{\text{ef}}$  jednotlivých jader vodíku. Zvláštní případ nastává u magneticky neekvivalentních, avšak chemicky ekvivalentních jader, protože skalární interakce se projeví (typicky u 1,4-disubstituovaného systému, AA'BB' systém). Principem záměny lze identifikovat vodíkové atomy (Obrázek 5):<sup>10</sup>

- **Homotopické** – záměnou se nezmění stereochemie molekuly; v NMR spektrech vykazují společný signál.
- **Enantiotopické** – záměnou jednoho z vodíků za jiný atom nebo skupinu atomů vzniká chirální centrum v jinak achirální molekule; v NMR spektrech vykazují jeden signál, pokud nejsou měřena v chirálním rozpouštědle.

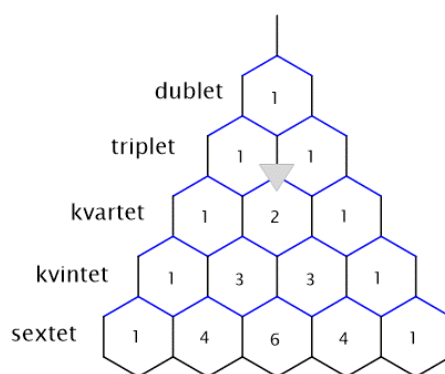
- o **Diastereotopické** – záměnou vodíku CH<sub>2</sub> skupiny vzniká další chirální centrum molekuly; jádra rezonují při jiné frekvenci a poskytují v <sup>1</sup>H NMR spektru zpravidla dva různé signály. Jedná se tedy o signály chemicky a magneticky neekvivalentní.



**Obrázek 5** Homotopické, enantiotopické a ekvivalentní atomy vodíku v molekule butanu. Diastereotopické a homotopické vodíkové atomy v molekule (*R*)-2-methoxybutanu

### Štěpení signálu neboli jeho multiplicita

Nepřímé spin-spinové interakce jsou způsobeny vazebnými elektrony, které přenášejí magnetickou polarizaci mezi navázanými atomy a způsobí tak další změnu v  $B_{ef}$ . Důsledkem je pak štěpení tvaru signálu v NMR spektru, díky kterému lze odhalit propojení spinového systému (velice užitečné při strukturní analýze). Tvar signálu je štěpen dle vztahu  $n + 1$ , kde  $n$  je počet interagujících atomů v okolí. Rozvojovou řadu intenzit dílčích signálů multipletu představuje Pascalův trojúhelník. Toto pravidlo platí pouze v případě spekter se štěpením I. řádu, štěpení ve spektrech vyšších řádů je komplikovanější.<sup>10</sup>



**Obrázek 6** Pascalův trojúhelník s vyčíslenými kombinačními čísly. Tři pole označené vnitřním šedým trojúhelníkem označují základní charakteristiku binomického rozvoje, tedy součet dvou čísel v polích vedle sebe je zapsán v poli po nimi

Velikost štěpení je definována hodnotou interakční konstanty  $J$  v jednotkách Hz (čím intenzivnější je interakce, tím větší je hodnota  $J$ ). Pomocí  $J$ -konstanty lze přibližně odlišit vzdálenost interagujících jader.<sup>10</sup>

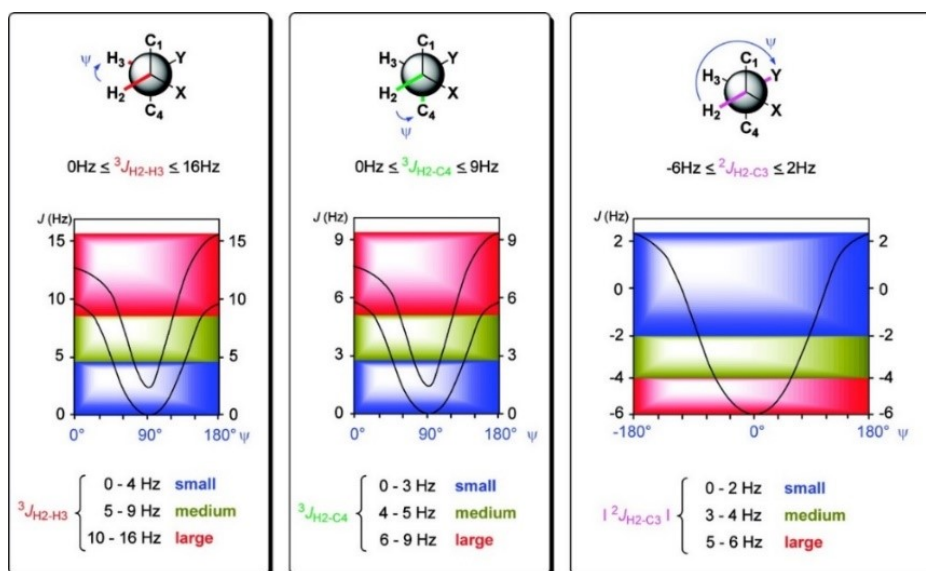
Spin-spinová interakce <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C jader je přímá, má velikost  $^1J_{CH} \geq 100$  Hz a velice znesnadňuje interpretaci uhlíkového NMR spektra. Proto jsou <sup>13</sup>C jádra měřena s širokopásmovým dekaplinkem <sup>1</sup>H jader (díky tomuto dekaplinku je dosaženo i vyšší intenzity signálu vlivem nukleárního Overhauserova efektu). Na vodíková jádra je působeno

magnetickým polem  $B_2$  vyvolaným radiofrekvenčním zářením o  $\nu \approx 500$  MHz, což vede k rychlým přechodům  $^1\text{H}$  jader, a tak je zamezeno jejich interakci s měřenými uhlíkovými jádry. Díky této modifikaci experimentu jsou v  $^{13}\text{C}$  NMR spektru zobrazeny jednotlivé uhlíky jako singlety.<sup>13</sup>

Geminální spin-spinové interakce neekvivalentních vodíkových atomů nabývají obvykle hodnot  $^2J_{\text{HH}} = 0\text{--}35$  Hz (závisí zejména na hybridizaci navázaného uhlíku; pro geminální  $\text{CH}_2$  skupinu  $\text{sp}^2$  uhlíku je  $^2J_{\text{HH}} = 0\text{--}5$  Hz).<sup>13</sup>

Pro strukturní analýzu NMR metodou mají však největší význam vodíkové vicinální interakce, jejichž hodnota závisí na velikosti dihedrálního neboli torzního úhlu  $\vartheta$ , který svírají vazebné roviny.<sup>16</sup> Martin Karplus a jeho spolupracovníci se v 60. letech této problematice intenzivně věnovali a definovali rovnici (8), kde aproximací získali hodnotu pro  $A = 4,22$ , pro  $B = -0,50$  a pro  $C = 4,50$  (tyto hodnoty byly vypočteny pro délku vazby  $1,543$  Å mezi uhlíkovými atomy v  $\text{sp}^3$  hybridizaci).<sup>17, 18</sup>

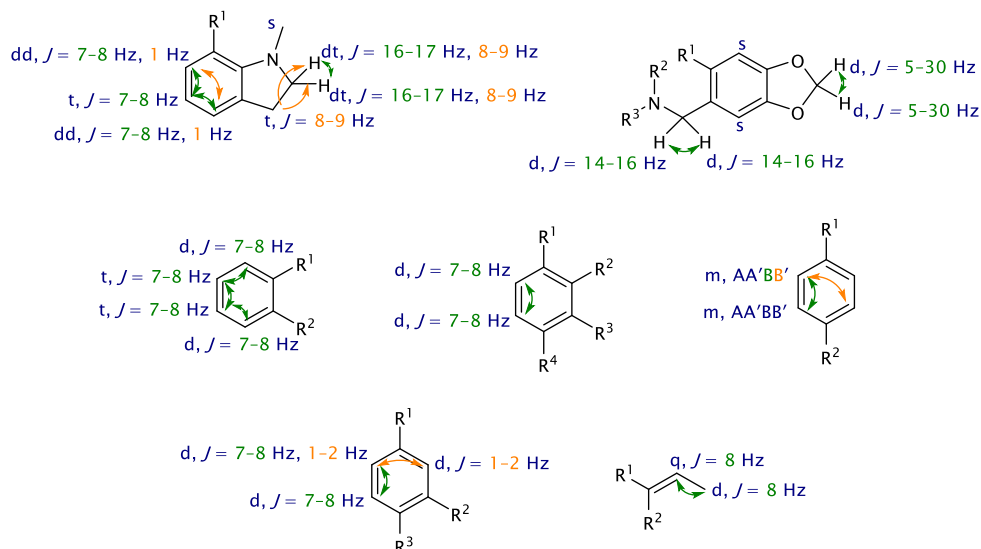
$$^3J_{\text{HH}'} = A + B \cos \vartheta + C \cos 2\vartheta \quad (8)$$



**Obrázek 7** Závislost hodnoty  $J$ -konstanty jako funkce velikosti torzního úhlu (v tomto případě označen  $\psi$ ) mezi jádry v rámci 1,2-dioxygenovaného systému (X, Y)<sup>16</sup>

Optimalizaci parametrů, které mají vliv na velikost skalární interakce, se věnovala a stále věnuje celá řada vědeckých skupin. Prokázalo se, že velikost dihedrálního úhlu je závislá na celé řadě parametrů, jako je například hybridizace vazebných uhlíkových atomů, vazebná délka, vazebný úhel, ale největší vliv má substituce a elektronegativita navázaných atomů.<sup>19</sup> Byly mimo jiné definovány modely pro štěpení různých atomů ve vicinálních polohách ( $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ , aj) pro aromatické systémy,<sup>20</sup> glykosidické vazby v nukleosidech<sup>21</sup> i cukrech.<sup>22-24</sup> Obrázek 7 představuje modifikovanou křivku pro 1,2-dioxygenovaný systém a vztahy  $^3J_{\text{HH}}$ ,  $^3J_{\text{CH}}$  a  $^2J_{\text{CH}}$  interakcí. Je zřejmé, že velikost nepřímé spin-spinové interakce má pro každý úhel mírný rozptyl hodnot, proto je nutné informace o multiplicitě signálu dále kombinovat s nukleárním Overhauserovým efektem (NOE; podstata bude diskutována dále v této kapitole) a modelací struktury s minimalizovanou energií systému pro identifikaci

trojrozměrné struktury molekuly. Avšak i taková kombinace dat nemusí zaručeně vést ke kýženému výsledku.



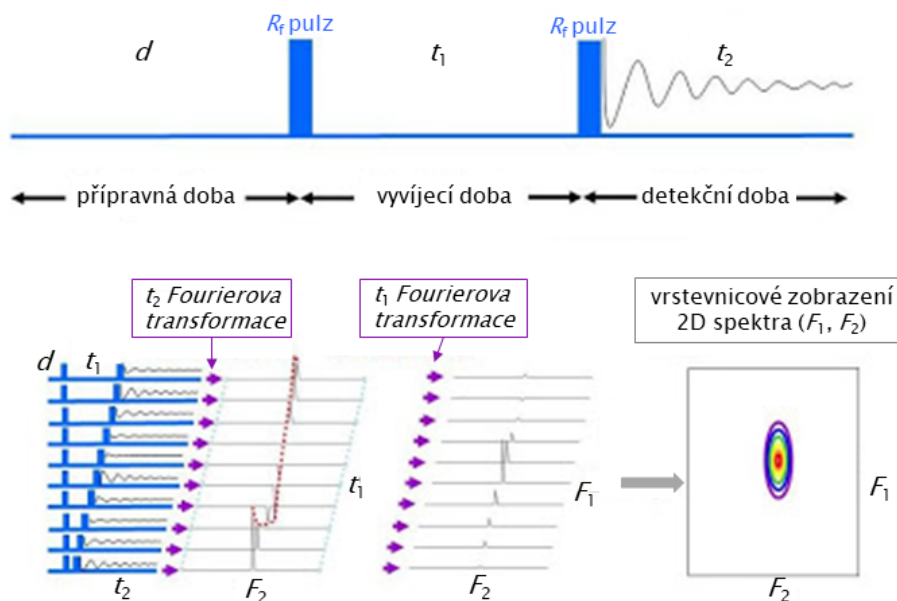
**Obrázek 8** Vybrané strukturální fragmenty Amaryllidaceae a Apocynaceae alkaloidů s typickými  $J$ -interakcemi vodíkových atomů v NMR spektru: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, dd – dublet dubletů, td – triplet dubletů, m – multiplet<sup>13</sup>

#### 1.1.1.4 Dvoudimenzionální NMR experimenty

Díky Ernstově vědeckému příspěvku je možné identifikovat molekuly ve vzorcích, u nichž není struktura známa, použitím 2D experimentů. Navázal na práci svého studenta Jeana Jeenera, který již v roce 1971 popsal, avšak nikdy nepublikoval COSY experiment.<sup>12</sup> Ve své podstatě 2D experimenty jsou modifikované 1D experimenty o vyvíjecí dobu  $t_1$ , jejíž délka trvání se mění.

2D NMR spektrum je definováno dvěma osami. Každá z os je získaná vlastní Fourierovou transformací, tedy zobrazuje závislost intenzity signálu na frekvenci. Výsledné 2D NMR spektrum je pak ve své podstatě třídimenzionální. Intenzita signálu je představována průměrem a vrstevnicemi daného krosníku ve vrstevnicové projekci spektra.

Přímo detekovaná dimenze se nazývá  $F_2$  a vychází z FT naměřeného FIDu během detekční doby  $t_2$  (první FT). Nepřímo detekovaná dimenze  $F_1$  je získána druhou FT aplikovanou na kumulovaná NMR spektra z předchozí FT  $t_2$ . Signály v 1D spektrech dimenze  $F_2$  se postupně mění s přibývajícím délkou vyvíjecí doby  $t_1$  (jedna změna doby  $t_1$  představuje jeden inkrement), která od sebe odděluje aplikované  $R_f$  pulzy v rámci experimentu. Jak jsou jádra ozařována sekvencí  $R_f$ , dochází k interakcím, které jsou detekovány. Obrázek 9 dobře vysvětluje popsanou problematiku graficky.



**Obrázek 9** Zpracování získaných FIDů během detekční doby první FT (z  $t_2$  domény, která je přímo detekovaná), kterou následuje druhá FT (z domény  $t_1$  vzniklé nepřímo z kumulovaných 1D spekter jednotlivých inkrementů). Typ zobrazení spektra je již grafickou záležitostí (převzato a upraveno z internetového zdroje<sup>25</sup>)

Jak již bylo řečeno, ke sledovaným interakcím (definované typem použitého experimentu) dochází během vyvíjecí doby  $t_1$  mezi dvěma a více pulzy. Každý druh experimentu je definovaný typem, délkou a počtem použitých  $R_f$  pulzů a vyvíjecí dobou (trvání řádově  $\mu\text{s}$  až  $\text{ms}$ ), během které vektor magnetizace jádra  $\mathbf{M}$  vykonává precesní pohyb spějící do rovnováhy. Následuje ji směšovací doba  $\tau_m$ , kdy mezi interagujícími jádry dochází k přenosu polarizace před detekcí (polarizací je míněna změna v populacích na energetických hladinách). Proces je zakončen detekční dobou  $t_2$  (řádově  $\text{s}$ ). Délka trvání  $t_1$  a  $\tau_m$  musí být optimalizována pro daný druh experimentu, aby nebyla dovolena excitovaným jádrům úplná relaxace. V rámci inkrementu je pak možné zvolit počet skenů. Vyšší počet skenů je vhodný pro analýzu málo koncentrovaných vzorků, protože takto lze efektivněji dosáhnout lepšího rozlišení signál/šum než v ekvivalentním nastavení počtu inkrementů.<sup>10, 12, 13</sup>

Komentovat všechny typy 2D NMR experimentů dalece přesahuje rámec této disertační práce, uvedeny budou pouze ty nejdůležitější v NMR spektroskopii přírodních látek.

### Homokorelovaná 2D NMR spektra

Přenos polarizace je detekován mezi stejnými izotopy, jejichž interakce (signál, korelace, krospektr) je zobrazena na ose  $F_1$  a  $F_2$ .

#### COSY (z anglického correlation spectroscopy)

Spektrum je specifické diagonálními a mimodiagonálními korelacemi. Interakce získané v COSY experimentu doplňují informace o spinovém systému z 1D spekter (skalární interakce). Záznam krospektru dvou až třívazebné interakce představuje přenos polarizace mezi jádry v okolí sdílející stejnou  $J$ -konstantu (obvykle  $J \geq 3 \text{ Hz}$ ). Tento experiment má řadu různých modifikací: gCOSY – gradientová forma (obecně gradientové experimenty mají zpravidla lepší poměr signál/šum v kratším čase, čehož je dosaženo vytvořením gradientu působení  $\mathbf{B}_0$  pomocí zvláštních cívek v NMR sondě), DQ-COSY – dvou kvantově filtrované

fázově odlišené COSY vede k eliminaci korelací singletových signálů na diagonále (vhodné u překryvů singletů a pro vzájemně „kaplované“ vodíky na ose blízko u sebe), LR-COSY – krospíky identifikují vzájemnou interakci atomů s velmi malou interakční konstantou, čehož je dosaženo nastavením prodlevy okolo druhého pulzu v sekvenci (čím delší je prodleva, tím menší odhalí skalární interakci  $J < 1,5$  Hz přes více než tři vazby).

#### TOCSY (z anglického *totally correlated spectroscopy*)

Během experimentu dochází k přenosu polarizace celým spin-spinovým systémem molekuly. Výsledkem je spektrum podobné COSY spektru s větším množstvím mimodiagonálních korelací.

Pro účely identifikace dále diskutovaných alkaloidů nebylo TOCSY zpravidla měřeno kvůli absenci větších spinových úseků v molekule.

#### INADEQUATE (z anglického *incredible natural-abundance double-quantum transfer experiment*)

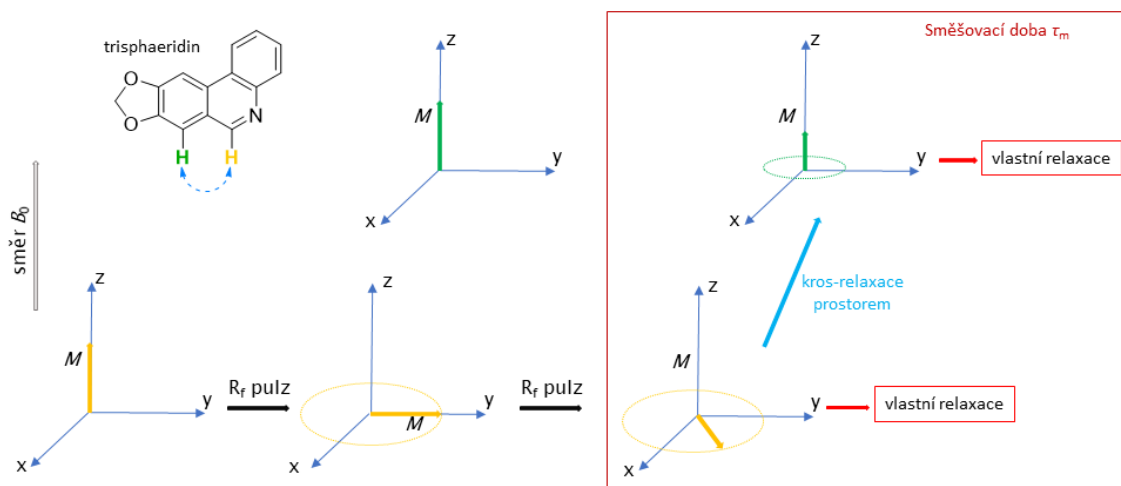
Metoda zobrazující korelace uhlíkových atomů, které spojuje kovalentní vazba. Problémem této techniky je nízká instrumentální citlivost způsobená nízkým přírodním zastoupením izotopu  $^{13}\text{C}$ , jehož přítomnost je ve spinovém systému detekována. Pro úspěšný experiment je proto nezbytné použít vzorek o dostatečné koncentraci, či obsahující izotopem  $^{13}\text{C}$  obohacenou látku, protože mnohdy ani nastavení dlouhé experimentální doby (dané počtem skenů v inkrementu a celkovým počtem inkrementů v rámci experimentu) nepřinese požadované výsledky.<sup>13</sup>

Analyzované alkaloidy nebyly vzhledem k malému izolovanému množství podrobeny tomuto experimentu.

#### NOESY (z anglického *nuclear Overhauser effect spectroscopy*)

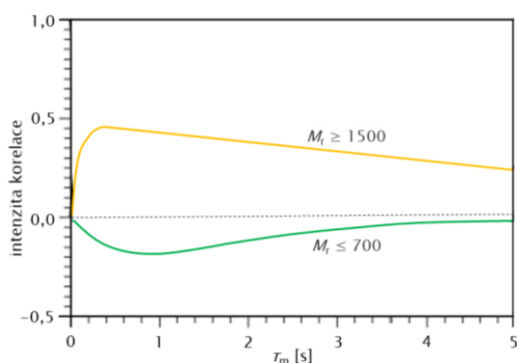
Pomocí NOESY je sledována v roztoku velice krátká dipól-dipólová interakce blízkých atomů (zpravidla se měří vodíkové), kdy jeden z nich je excitován (saturován) a druhý je v rovnováze. Pak nastává přenos polarizace mechanismem kros-relaxace mezi těmito prostorově blízkými protony (do 5 Å, což je 0,5 nm), viz obrázek 10.<sup>13</sup>

Detekci interakce ovlivňuje zejména molekulová hmotnost, viskozita deuterovaného rozpouštědla (např. směs s perhalogenovanými uhlovodíky<sup>26</sup>) a rychlost relaxace vodíkového jádra. Během  $\tau_m$  jsou interagující atomy vystaveny dalšímu  $R_f$  pulzu. Délka trvání této doby hraje v tomto případě velice důležitou roli v zachycení signálu příslušné interakce.<sup>12</sup>



**Obrázek 10** Přenos polarizace mezi prostorově blízkými vodíky v molekule trisphaeridinu (znázorněny zeleně a žlutě) během směšovací doby. U ovlivněného atomu, pak probíhá návrat do rovnováhy stejně jako u ozářených atomů<sup>12</sup>

Volba délky  $\tau_m$  je ovlivněna především velikostí molekuly (Obrázek 11).  $M_r$  měřené látky současně ovlivňuje fázi, ve které bude korelace zobrazena.



**Obrázek 11** Vliv velikosti  $M_r$ , rychlosti relaxace jádra na intenzitu kros-píku. Korelace látek s malou  $M_r$  mají opačnou fázi k diagonálním kros-píkům (velké molekuly naopak) a přenos polarizace atomů těchto látek (zelená křivka) má obecně maximální velikost při  $\tau_m \approx 800 \mu\text{s}$  (převzato a upraveno z knihy Encyclopedia of Magnetic Resonance<sup>27</sup>)

NOESY bylo také použito při identifikaci alkaloidů (malá molekulová hmotnost), které budou popsány v kapitole Výsledky s komentářem. Pro takové látky je doporučováno nastavení délky směšovacího času v rozmezí 0,5 až 1 sekunda, neboť vzdálenosti bývají větší než ve velkých molekulách typu proteinu.

### ROESY (z anglického rotating-frame Overhauser effect spectroscopy)

Jedná se o experiment analogický 2D NOESY, který zobrazuje korelace vždy s opačnou fází než jsou kros-píky diagonály. Ve spektrech také bývá patrných více artefaktů a za stejný experimentální čas je získán zpravidla horší poměr signál/šum v porovnání s NOESY. Použití tohoto experimentu je vhodné pro molekuly se střední a vysokou  $M_r$ .

### Heterokorelovaná 2D NMR spektra

Dvoukanálové sondy umožňují získat heterokorelované experimenty. Kanálem je myšlena nezávislá měřící cívka pro jedno a pro druhé měřené jádro. Obvyklé jsou sondy s cívkou



pro  $^{13}\text{C}$  blíží květě a vnější je pak  $^1\text{H}$  (a  $^{19}\text{F}$ ) cívka, což je přizpůsobeno přirozenému výskytu atomu a tudíž citlivosti analýzy (u inverzních sond je opačné uspořádání).<sup>10</sup>

### HSQC (z anglického heteronuclear single quantum coherence)

Pomocí  $^1J$ -interakce  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  je umožněno přiřadit vodíky methinových, methylenových a methylových skupin k uhlíkovým atomům, na které jsou kovalentně vázány. Nepřímo lze odlišit kvarterní uhlíky. Před detekcí se přenáší polarizace mezi  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  se společnou, velkou interakční konstantou odpovídající přímé  $J$ -interakci. Korelace skupin s lichým počtem protonů mohou být fázově odlišeny od korelací skupin  $\text{CH}_2$ .<sup>13</sup>

### HMBC (z anglického heteronuclear multiple bond correlation)

Tímto experimentem jsou detekovány interakce  $^1\text{H}$  s  $^{13}\text{C}$  atomem přes dvě, tři, čtyři a zřídka pět vazeb. Je to neúčinnější nástroj v řešení konstituce molekuly, avšak ke zjevnému rozptylu vzdáleností přenosu polarizace musí být naměřené korelace konfrontovány s dalšími 2D spektry tak, aby bylo dosaženo ideálně souladu identifikovaných korelací z naměřených experimentů. Intenzita korelace v HMBC spektrech bývá zpravidla největší u přenosu polarizace přes tři vazby. Interakční konstanta zvolená k danému měření ovlivňuje zachycení interakce. Standardně je použita  $J = 8 \text{ Hz}$ , která se hodí k hledaným  $^3J_{\text{CH}}$ , existují však i výjimky.<sup>28</sup>

### H2BC (z anglického heteronuclear two bond correlation)

Korelace ve spektru představují  $^2J$  interakce mezi  $^1\text{H}$  a sousedícími protonovanými  $^{13}\text{C}$  atomy, kde bohužel nejsou pozorovány korelace protonu s kvarterními uhlíkovými atomy. Experiment slouží jako doplňkový k HMBC a COSY experimentu.<sup>29</sup>

### 1,1/1,n-ADEQUATE (z anglického adequate sensitivity double-quantum spectroscopy)

Experimentem lze získat krosplíky definující vztahy  $^2J_{\text{CH}}$ . Částečně tak napomáhá zobrazení uhlíkového řetězce, avšak kvarterní uhlíky jsou korelovány pouze v případě vazby na protonovaný atom. Tento experiment však stále patří k těm z méně citlivých, proto není běžně měřen a většinou se dostává ke slovu až při řešení komplikovaných struktur, např. při revizi struktury kryptospirolepinu.<sup>14</sup>

## 1.1.1.5 Izomerie v NMR spektroskopii

Izomery jsou látky se stejným sumárním vzorcem. Jednotlivé atomy jsou v případě konstitučních (strukturních) izomerů jinak propojeny kovalentními vazbami. Takové látky jsou pomocí NMR spektroskopie zpravidla dobře rozlišitelné již v 1D spektrech (toto se netýká dynamické tautomerní formy, která závisí na rozpouštědle, pH prostředí, aj).

Komplikovanější situace nastává u konfiguračních izomerů (stereoizomerů), které mají stejnou konstituci molekuly a jsou jinak orientovány v prostoru. Dalším problémem mohou být meso formy molekul, které obsahují dvě a více chirálních center, ale díky rovině symetrie je počet výsledných stereoizomerů redukován.

### Stereoizomerie na asymetrickém $\text{sp}^3$ uhlíkovém atomu

Jeden chirální atom se čtyřmi různými substituenty poskytuje dvě izomerní orientace, dva enantiomery mající zrcadlovou konfiguraci  $R$  a  $S$ . Stereodeskriptor  $D$ ,  $L$  je dle IUPAC povoleno používat jen pro označení aminokyselin a cukrů. Enantiomery se liší ve směru

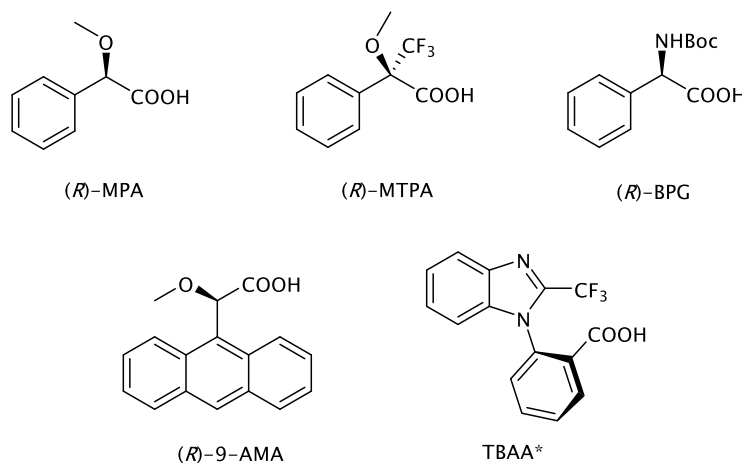


stáčení roviny polarizovaného světla a mohou se lišit biologickou aktivitou v živém systému. Z toho vyplývá, že enantiomery jsou pomocí NMR analýzy nerozeznatelné bez použití dále diskutovaných metod a pro jejich identifikaci je nutné použít chiroptické metody nebo rentgenovou analýzu monokrystalu.

Je-li chirálních uhlíků v molekule více, je počet možností orientace molekuly v prostoru definován jako  $2^n$ . V tomto množství jsou zastoupeny izomery typu výše popsaných enantiomerů a dále diastereomerů. Druhý typ optického izomeru vykazuje odlišné vlastnosti, jak chemické a fyzikální, tak biologické. Diastereomery je možné rozeznat pomocí NMR spektroskopie.

### Identifikace enantiomerů pomocí NMR

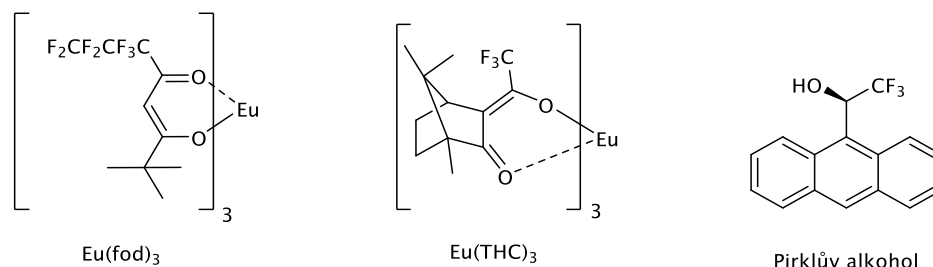
**Přímá detekce** enantiomeru je umožněna derivatizační reakcí, kdy acylace vhodné skupiny zavede chirální centrum o známé konfiguraci do zkoumané molekuly. Toto je jediná metoda NMR analýzy, která umožňuje zjistit absolutní konfiguraci látky (v tomto případě má rentgenová krystalografie navrch). Bohužel NMR analýza přírodních látek přináší jisté omezení pro aplikaci této metody. Tou je nutnost dostatečné navážky pro reakci derivatizované molekuly s ideálně jednou skupinou vhodnou pro acylaci. Nehledě na to, že produkt reakce již nemůže být následně použit pro biologické testování ani další analýzu. Derivatizačních činidel je celá řada, viz obrázek 12. Vědecká skupina kolem Harryho Stone Moshera patřila mezi pionýry v této oblasti. V roce 1969 prezentovali své výsledky,<sup>30</sup> kde popsali chování diastereomerů získaných reakcí sekundárních alkoholů/aminů s každým enantiomerem 2-methoxy-2-trifluormethylfenoctové kyseliny (MTPA).<sup>31-34</sup>



**Obrázek 12** Strukturální vzorce vybraných chirálních derivatizačních činidel. (R)-MPA: (R)-2-methoxy-2-fenoctová kyselina, (R)-MTPA: (R)-2-methoxy-2-(trifluormethyl)fenoctová kyselina, (R)-BPG: (R)-N-Boc-fenylglycin, (R)-9-AMA: (R)-2-(9-anthryl)-2-methoxyoctová kyselina a \*označuje jeden z atropoizomerů TBBA, známý jako 2-(2-trifluormethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)benzoová kyselina<sup>35</sup>

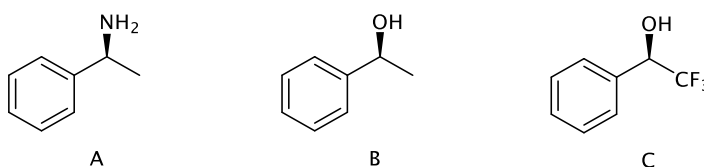
Pro **nepřímou detekci** enantiomerů pomocí nekovalentních interakcí je možné použít chirální posunové činidlo, které se používá pouze k určení přebytku enantiomerů. Jak ale nastiňují některá vědecká data,<sup>36</sup> může tato metoda v určitých případech vést až k identifikaci absolutní konfigurace molekuly. Mezi nejčastěji používaná posunová činidla patří komplexotvorná lanthanoidová činidla (LSR), která je potřeba přidat k roztoku (titrace LSR dokud není zjevné oddělení signálů enantiomerů). Bohužel paramagnetické vlastnosti LSR (obsahují nepárový

elektron) vedou k rozšíření signálů, což může komplikovat interpretaci spekter. Jiná situace nastává s použitím Pirklova činidla (2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol), kterého se přidávají minimálně tři ekvivalenty (nadbytek je nutný k dostatečné solvataci molekuly) a nerozšiřuje spektrální šířku signálů.<sup>32, 37-39</sup>



**Obrázek 13** Posunová činidla:  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ : tris(6,6,7,7,8,8,8-heptafluor-2,2-dimethyl-3,5-oktadionáto)europitý komplex,  $\text{Eu}(\text{THC})_3$ : tris[3-(trifluormethylhydroxymethylen)-kamforato]europitý komplex a Pirklov alkohol: (*R*)-2,2,2-trifluor-1-(9-anthryl)ethanol

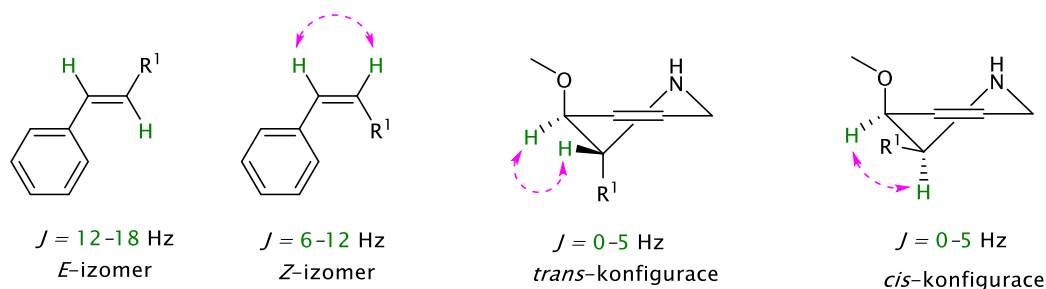
Mezi další nepřímé metody zjištění enantiomerní čistoty patří použití chirálních rozpouštědel, prostředí chirálních tekutých krystalů<sup>40</sup> či iontových kapalin<sup>41</sup>. Tato rozpouštědla nejsou deuterovaná, proto je nutné přidat do kyvety malé množství deuterované látky, aby bylo možné naladit NMR spektrometr.



**Obrázek 14** Příklady používaných chirálních rozpouštědel. A: (*S*)-1-fenylethan-1-amin, B: (*S*)-1-fenylethanol, C: (*R*)-1-fenyl-2,2,2-trifluoroethanol

### Cis/trans izomery a izomerie na dvojně vazbě

*E/Z* izomery jsou pomocí NMR spektroskopie většinou dobře rozlišitelné. Identifikace je možná zjištěním velikosti *J*-konstanty (Karplusova křivka vicinálních interakcí) a s pomocí NOESY experimentu, ať už v jeho jednorozměrné nebo dvourozměrné formě. V případě určení *cis/trans* izomerie substituce na polycyklických molekulách nebo částečně nenasycených cyklech může být výsledek této analýzy zavádějící, neboť na zmíněných chirálních centrech dochází vlivem konformace k deformaci vazebných úhlů. Například když mají substituenty *trans* orientaci, pak sledované vodíky se nacházejí v pseudodiekvatoriálním uspořádání, a tím pádem vykazují malou velikost skalární interakce a mají krospek v NOESY experimentu. Tyto argumenty pak mohou vést k mylnému určení *cis*-konfigurace, ač jsou ve vzájemném *trans*-uspořádání.



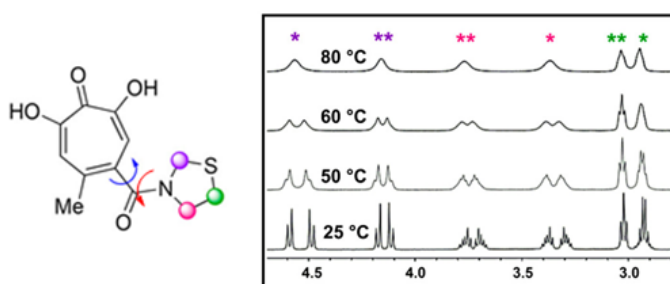
**Obrázek 15** *E/Z* izomery na dvojně vazbě s odlišnou skalární interakcí a NOESY korelace. Pseudodiaxiální uspořádání substituentů na tetrahydropyridinu se skalární interakcí a pozorovaná NOESY korelace<sup>13</sup>

## Konformační izomerie

Tento druh izomerie se nachází ve strukturách, které na první pohled nemají chirální centrum, avšak kvůli stericky objemným substituentům dochází k omezení rotace kolem některé z vazeb. Tranzitní stavy jednotlivých izomerů mají mezi sebou vyšší energetickou bariéru, která umožňuje rozeznat rotamery a atropoizomery v NMR spektrech. Stabilita atropoizomerů dokonce umožňuje ve velké většině případů dané konformery izolovat.

### Atropoizomery

Jedná se o specifický typ konformační izomerie kolem osy, která vzniká omezením rotace kolem vazby (zejména ze sterických důvodů). Projevuje se například u 2,6-disubstituovaných diarylaminů (klonidin, bosutinib), 2,6-disubstituovaných diaryletherů (vankomycin, tafenočin), 2,2',6,6'-tetrasubstituovaných bifenyľů (sildenafil, valsartan), aj. Na první pohled neškodná izomerie může mít velký vliv na výslednou biologickou aktivitu molekuly, proto v dnešní době lékové autority povolují registrace léčiv s dostatečně stabilními nebo naopak rychle se překlápějící atropoizomery za fyziologických podmínek v lidském těle. Pro zjištění této vlastnosti se využívá techniky dynamické NMR analýzy, která umožňuje definovat aktivační energii pro překonání energetické bariéry mezi dvěma a více izomery pomocí nalezení teploty koalescence, kdy signály měřených izomerů při zvyšující se teplotě splynou v jeden.<sup>42-46</sup>



**Obrázek 16** Vliv teploty na uvolnění rotace vazby Ar-CONR tropolonamidu. Z <sup>1</sup>H NMR spektra v DMSO-*d*<sub>6</sub> je patrné, že signály atropoizomerů se postupně sjednocují a mezi 60/80 °C je dosaženo koalescence a rotace přestává být omezená (obrázek převzat a upraven<sup>47</sup>)

### 1.1.2 Metody chiroptické analýzy

Jedná se druh spektroskopických analýz, kterými lze dokázat odlišit enantiomery, což je dáno jejich vlastností, díky nimž v roztoku stáčejí rovinu polarizovaného světla o určitý úhel.

Jsou zavedeny různé metody (polarimetrie, optická rotační disperze, Ramanova spektroskopie a cirkulární dichroismus) lišící se v technickém provedení i výsledném spektru. Dále budou popsány metody aplikované na izolované alkaloidy popisované v této práci.

### 1.1.2.1 Polarimetrie

Polarimetrie je analytická metoda využívající stáčení polarizovaného světla v roztoku měřené chirální látky. Specifická optická otáčivost  $[\alpha]_{\lambda}^T$  je vypočítána z dobře známé rovnice (9), kde  $T$  je teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ];  $\lambda$  je použitá vlnová délka 589,3 nm z D-linie sodíkové výbojky;  $\alpha$  je naměřený úhel otočení polarizovaného světla [ $^{\circ}$ ];  $c$  je udávaná hmotnostní koncentrace měřené látky v roztoku [g/100 ml] a  $l$  je délka kyvety [dm]:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{100 \alpha}{c l} \quad (9)$$

Kladná hodnota  $[\alpha]_{\lambda}^T$  představuje pravotočivý optický izomer (stáčí polarizované světlo po směru hodinových ručiček) a záporná hodnota levotočivý (D a L stereodeskriptor používaný v chemii aminokyselin a cukrů nesouvisí s touto vlastností!). Je-li měřen roztok dvou opticky aktivních látek, pak se hodnoty jejich optické otáčivosti sčítají.

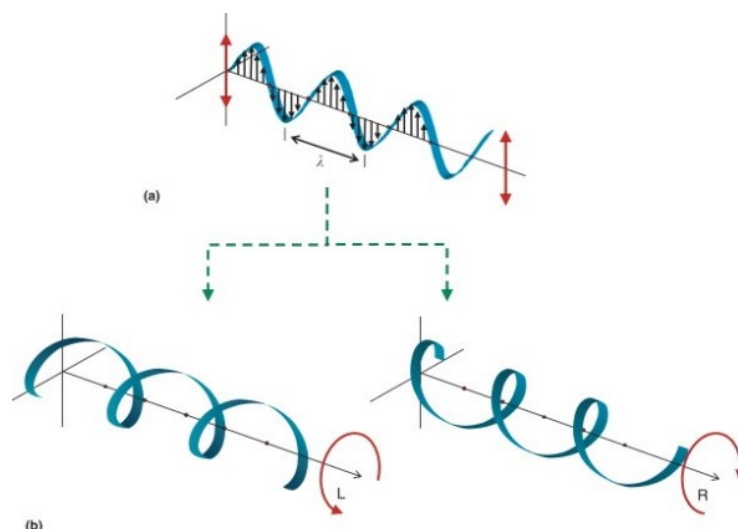
Některé látky, ač jsou opticky aktivní, mohou vykazovat nulovou otáčivost. Potom lze uvažovat o poměru enantiomerů ve vzorku 1 : 1.

Hodnotu specifické optické otáčivosti je vždy nutné uvádět s danou koncentrací roztoku a s teplotní hodnotou, při které bylo měření prováděno. Neboť na těchto údajích je hodnota  $[\alpha]_{\lambda}^T$  závislá. Samozřejmě největší vliv na tuto veličinu má hodnota vlnové délky použitého světla. Obvykle se však používá  $\lambda = 589,3$  nm, proto tato specifikace měření dané látky uváděna není a specifická optická otáčivost je uváděna jako  $[\alpha]^{25}$  nebo  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ .

### 1.1.2.2 Cirkulární dichroismus

V této analýze je použito polarizované světlo s kruhovou modifikací, které je absorbováno měřenou látkou.

Projde-li paprsek tohoto světla s určitou vlnovou délkou  $\lambda$  roztokem chirální látky, ve výsledném spektru je zaznamenáno, která ze dvojice kruhově polarizovaného světla (pravotočivé nebo levotočivé rotace úhlu záření) byla absorbována sledovanou látkou. Interakce se projeví rozdílem hodnot absorpance levotočivého ( $A_L$ ) a pravotočivého ( $A_R$ ) kruhového elektromagnetického záření v absorpčním pásu dané vlnové délky (Rovnice (10)).



**Obrázek 17** (a) představuje lineárně polarizované světlo, (b) rozdělení elektromagnetického vlnění na fázi R a L během měření CD spekter (převzato z knihy *Comprehensive Chirality*)<sup>48</sup>

Spektrum *R*- a *S*-enantiomeru má tedy přesně opačnou hodnotu rozdílu absorbancí  $\Delta A$ , potažmo hodnotu absorpčního koeficientu  $\Delta \varepsilon$  (vyjadřuje intenzitu absorpce světla). Proto ve struktuře látky musí být přítomný chromofor, který splní podmínku absorpce viditelného světla látkou. Tento strukturní fragment je také zodpovědný za barvu látky, která u popisovaných alkaloidů byla nejčastěji nažloutlá až hnědá.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (10)$$

Rozdíl absorbance se převádí na absorpční koeficient  $\Delta \varepsilon$  pomocí vztahu (11) a (12), kde  $\varepsilon_L$  a  $\varepsilon_R$  jsou molární absorpční koeficienty (specifické pro danou  $\lambda$ ),  $c$  molární koncentrace a  $l$  značí délku dráhy světla [cm].

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l \quad (11)$$

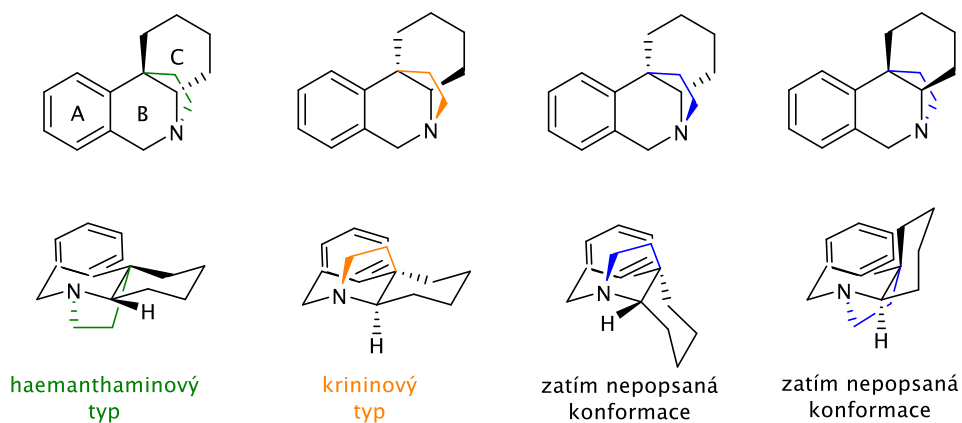
$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R [\text{dm}^{-3} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \quad (12)$$

CD spektrum jako takové pak zobrazuje závislost  $\Delta \varepsilon$  na vlnové délce světla  $\lambda$ .

V této spektroskopii je též historicky zavedená hodnota molární elipticity  $[\theta]$ , přepočít vychází z hodnoty  $\Delta \varepsilon$  dle rovnice (13).

$$[\theta] = 3298,3 \Delta \varepsilon \quad (13)$$

Tato analýza je stěžejním důkazem orientace ethylenového můstku u 5,10b-ethylenfenanthridinového strukturního typu a odlišení strukturního typu. Kondenzované kruhy B/C jsou v dosud popsáných látkách tohoto typu identifikovány jako *trans*-izomery (Obrázek 18). Kruhy napojené v *cis*-konfiguraci se potom nacházejí u homolykorinové a lykoreninové strukturní skupiny, která však postrádá ethylenový můstek.<sup>49</sup>



**Obrázek 18** Možné prostorové orientace ethylenového můstku a kruhů B/C 5,10b-ethylenfenanthridinového strukturního typu

CD spektra mají oblast pozitivního a negativního maxima absorbovaného světla v charakteristických oblastech:<sup>49</sup>

- **Haemanthaminový typ:** pozitivní maximum při 290 nm, negativní maximum při 240 nm.
- **Krininový typ:** pozitivní maximum v okolí 240 nm, negativní maximum při 290 nm.

## 1.2 Rostliny a jejich alkaloidy

Rostlinné alkaloidy jsou organické látky, které lze nalézt u zástupců většiny rostlinných čeledí. Tyto produkty sekundárního metabolismu rostlin mají obvykle zásaditý charakter. Samozřejmě lze nalézt i alkaloidy neutrální či dokonce slabě kyselé. Těchto odlišných acidobazických reakcí se využívá mj. při izolaci z rostlinného materiálu.

Nejčastěji jsou tyto většinou vysoce biologicky aktivní sloučeniny děleny dle biosyntetické cesty vzniku:<sup>50</sup>

- Právě alkaloidy – obsahují atom dusíku vázaný v heterocyklickém fragmentu molekuly. Výchozími látkami jejich vzniku jsou různé aminokyseliny:
  - ✓ atropin, morfin, galantamin.
- Protoalkaloidy – atom dusíku není vázaný v heterocyklu, a současně aminokyselina je výchozí látkou biosyntézy:
  - ✓ kolchicin, paklitaxel, efedrin.
- Pseudoalkaloidy – atom dusíku je vázán v heterocyklu, avšak nevzniká z aminokyseliny:
  - ✓ purinové alkaloidy – např. kofein, theobromin, theofylin,
  - ✓ steroidní alkaloidy – např. solanidin, veratridin,
  - ✓ deriváty piperidinu – např. koniin, piperin.
- Peptidové alkaloidy.<sup>51</sup>
- Polyaminové alkaloidy.<sup>52</sup>

Tato disertační práce se zabývá NMR analýzou alkaloidů izolovaných z rostlin čeledi Amaryllidaceae a Apocynaceae, které obohatily současnou medicínu o mnoho významných léčivých látek. V klinické praxi se dnes využívá galantaminu jako kompetitivního, reverzibilního inhibitoru acetylcholinesterasy (AChE), jehož podávání zlepšuje kvalitu života u pacientů s Alzheimerovou chorobou. I jeho dalším účinkům je věnována pozornost mnoha výzkumných skupin.<sup>53</sup>

Izolace prezentovaných alkaloidů probíhala na Katedře farmaceutické botaniky týmem profesorky Cahlíkové, jejichž výzkum se soustředí na problematiku Alzheimerovy choroby. Vzhledem k tomuto zaměření se dlouhodobě zabývají izolací alkaloidů z různých druhů zejména čeledi Amaryllidaceae jako například *Nerine bowdenii* W. Watson, *Zephyranthes robusta* Baker, aj.

Při hledání nových látek k léčbě zmíněného neurodegenerativního onemocnění byl do předběžného screeningu biologických aktivit zařazen extrakt z barvínku menšího. Tento extrakt prokázal inhibiční vliv na butyrylcholinesterasu (BuChE), což je jeden z klíčových enzymů, jehož změněné koncentrace v těle souvisí s onemocněním Alzheimerovou chorobou.<sup>53</sup> Proto se kolegové na spolupracující katedře zaměřili na izolaci jednotlivých alkaloidů z tohoto rostlinného druhu.

Některé alkaloidy byly úspěšně rozpoznány již MS analýzou a/nebo na základě jejich fyzikálně chemických vlastností zjištěných při izolaci. Do laboratoře NMR byly následně předány vzorky s předpokládanou strukturou, pokud byla určena. U některých vzorků byla potvrzena predikovaná struktura, avšak větší část obdržených vzorků si žádala větší

pozornost, neboť naměřená jednorozměrná spektra se neshodovala s referenčními spektry predikovaných molekul. Tato referenční data byla převzata z literatury nebo od dříve zjištěných látek v naší laboratoři s potvrzenou strukturou 2D NMR experimenty. Následně bylo nutné tyto neznámé struktury molekul v obdržených vzorcích kompletně identifikovat (viz Výsledky s komentářem), v ideálním případě určit i absolutní konfiguraci.

Následuje krátký popis rostlin, ze kterých byly popisované vzorky izolovány: *Narcissus pseudonarcissus* var. *Carlton*, *Zephyranthes citrina* Baker a *Vinca minor* L. Také budou představeny některé, z již publikovaných struktur alkaloidů izolovaných z těchto rostlin nebo z jejich rodu.



### 1.2.1 *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton

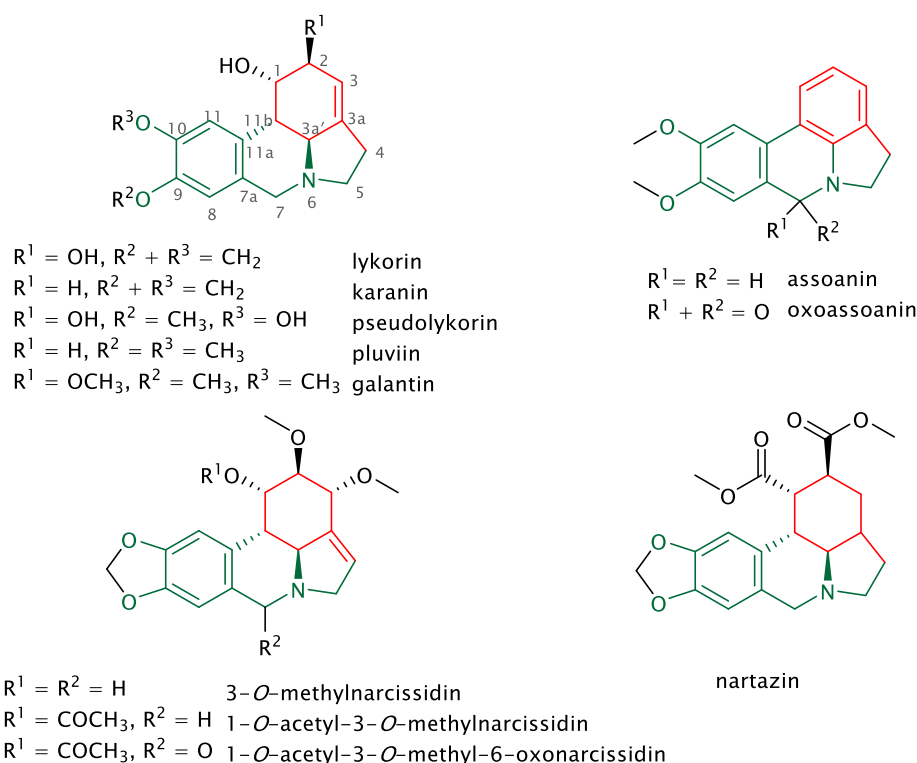
Jednoděložné rostliny rodu *Narcissus* L. jsou pravděpodobně nejznámějším rodem čeledi Amaryllidaceae. Rostlinné druhy tohoto rodu se snadno kříží, čehož se využívá k produkci kultivarů pro okrasné účely. Přírodním místem výskytu narcisu je Evropa.<sup>54</sup> Některé z kultivarů jsou využívány i pro komerční získávání galantaminu, což je právě příklad variety Carlton. Složitá a nákladná příprava (-)-galantaminu<sup>55-61</sup> syntetickou cestou je důvodem, proč jsou stále hledány rostliny s vysokým obsahem tohoto alkaloidu. Cena způsobu jeho získávání z rostlinného materiálu je také vysoká (40 000 USD/kg jak uvádí Mucke<sup>62</sup>), proto se mnoho výzkumníků soustředí na vývoj různých metod získávání této léčivé látky. Výzkum Ferdausi a spol.<sup>63</sup> dokonce popisuje získávání galantaminu z *in vitro* tkáňové kultury narcisu této variety. Tato metoda ovšem vede k mnohem nižšímu zisku galantaminu oproti klasické metodě pěstování v půdě.



**Obrázek 19** *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton – květ (převzato z internetového zdroje)<sup>64</sup>

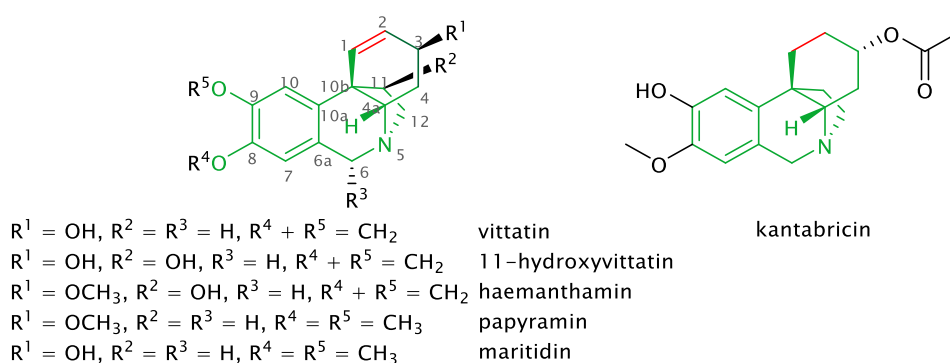
*Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton (Narcis velkokorunný Carlton) je charakteristický svým velkým květem i cibulí, která je větší než u příbuzných druhů a je bohatší na alkaloidní látky, které se strukturálně liší a lze je dělit do několika skupin. Jejich biosyntéza je velmi dobře popsána ve velkém množství prací z 60.–70. let. Aminokyseliny L-fenylalanin a L-tyrosin jsou prekurzory popisovaných alkaloidů. Specifické rostlinné enzymy je modifikují za vzniku derivátů norbelladinu. Tento protoalkaloid je výchozí sloučeninou kaskády enzymatických reakcí biosyntézy Amaryllidaceae alkaloidů (AA). Na následujících obrázcích jsou zobrazeny strukturální typy alkaloidů izolovaných z rodu *Narcissus* L. s barevně odlišenými modifikacemi ve strukturách jednotlivých skupin. Ty jsou rozděleny podle strukturálních podobností do 12 strukturálních skupin AA podle Berkova a spol.,<sup>65</sup> kteří jich dohromady prezentují 18, ale ne všechny byly izolovány přímo z rodu *Narcissus*.<sup>66</sup>

**Lykorinový strukturální typ** je specifický nenasyceným fenanthridinovým skeletem, na který je v pozici [3a,6] připojen ethylenový můstek (Obrázek 20). Jedná se o nejpočetnější skupinu AA. Podle Berkova a spol.<sup>65</sup> je známo 119 látek tohoto typu, avšak u některých lze polemizovat, zda se nejedná spíše o izolační artefakty. Jelikož jsou AA dlouhodobě studovány, byly u alkaloidů této skupiny testovány nejrůznější potenciální biologické aktivity.<sup>67</sup>



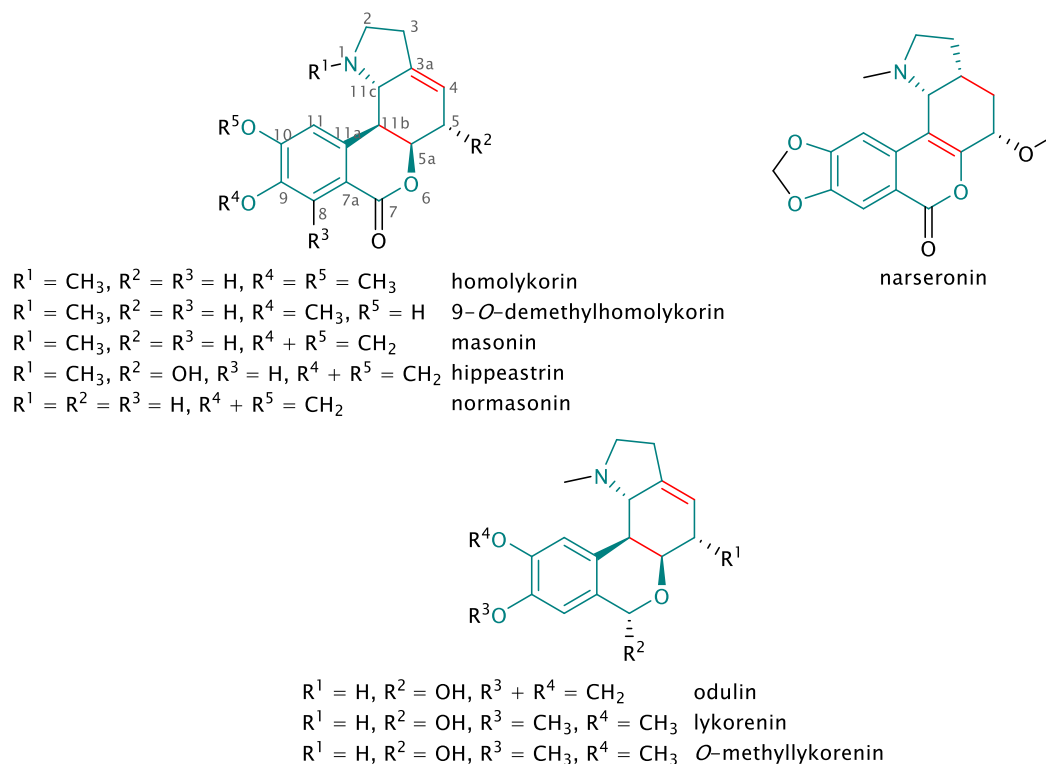
**Obrázek 20** Lykorinový strukturální typ Amaryllidaceae alkaloidů<sup>66, 68-70</sup>

**Skupina haemanthaminových** alkaloidů má podobný strukturální základ, avšak ethylenový můstek je napojen v pozici [5,10b] fenanthridinového fragmentu, viz obrázek 21.



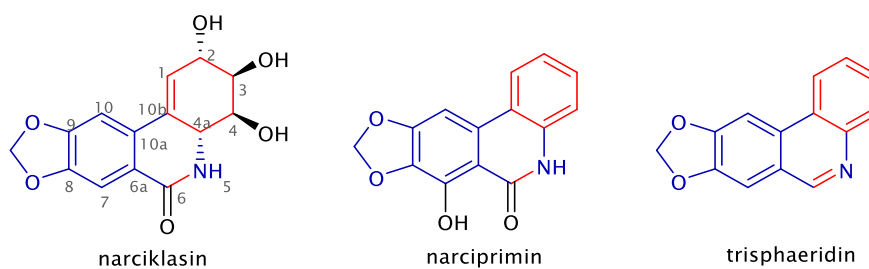
**Obrázek 21** Haemanthaminový strukturální typ izolovaný z rodu *Narcissus* L.<sup>66, 71</sup>

**Homolykorinový/lykoreninový skelet** (Obrázek 22) obsahuje isochromen kondenzovaný s částečně nebo úplně nasyceným indolovým fragmentem. Tyto látky byly podrobeny mnohým biologickým testům jako například pro cytotoxické a vasodilatační účinky či antimykotickou aktivitu. Hippeastrin dokonce účinně inhiboval v populaci hojně rozšířený vir *Herpes simplex* typu 1 (HSV-1).<sup>67</sup>



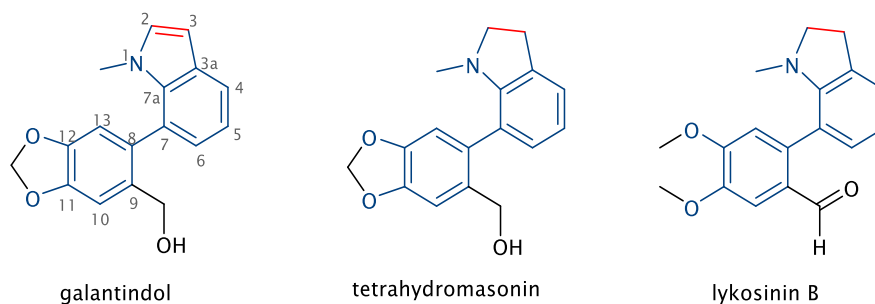
**Obrázek 22** Homolykorinový (nahore) a lykoreninový (dole) strukturní typ Amaryllidaceae alkaloidů<sup>66, 69, 72, 73</sup>

Částečně nasycený fenanthridin je také součástí struktur **narciklasinového typu** (Obrázek 23). U těchto alkaloidů byla zkoumána především cytotoxická aktivita (pankratistatin, který není zobrazen, neboť nebyla popsána izolace z rodu *Narcissus*, byl zařazen do preklinického hodnocení léčiv). Trisphaeridin pak prokázal významnou antiretrovirální aktivitu.<sup>67</sup>



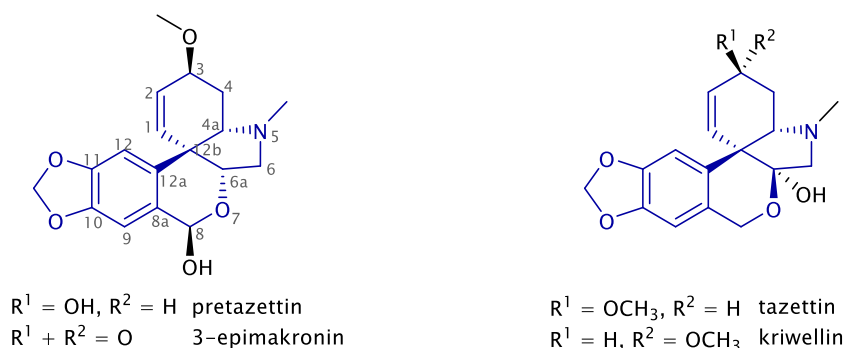
**Obrázek 23** Narciklasinový strukturní typ Amaryllidaceae alkaloidů izolovaných z rodu *Narcissus* L.<sup>53, 74</sup>

**Galantindolový strukturní typ** je charakteristický 7-arylindolovým skeletem (Obrázek 24). U těchto látek byla popsána atropoizomerie bisarylového uskupení.<sup>75</sup> De Andrade a spol.<sup>76</sup> uvádí ve své práci možnost, že tento strukturní typ je artefaktem vznikajícím z homolykorinových alkaloidů při izolaci.



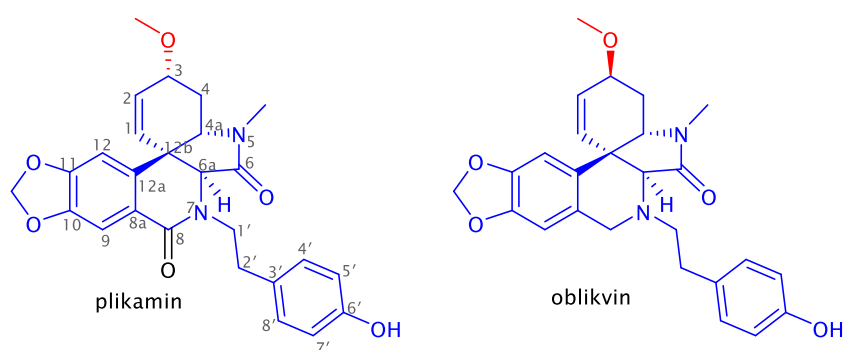
Obrázek 24 Alkaloidy galantindolového strukturního typu izolované z rodu *Narcissus* L.<sup>53, 72, 73</sup>

**Skupina pretazettinových** alkaloidů má společný 2-benzopyrano[3,4-*c*]indolový skelet (Obrázek 25). Předpokládá se, že poloacetalová skupina pretazettinu poskytuje v rámci pH-dependentní izolace intramolekulární přesmyk za vzniku tazettinu, který je pak možné při izolaci získat v mnohem větším množství než pretazettin.<sup>76</sup>



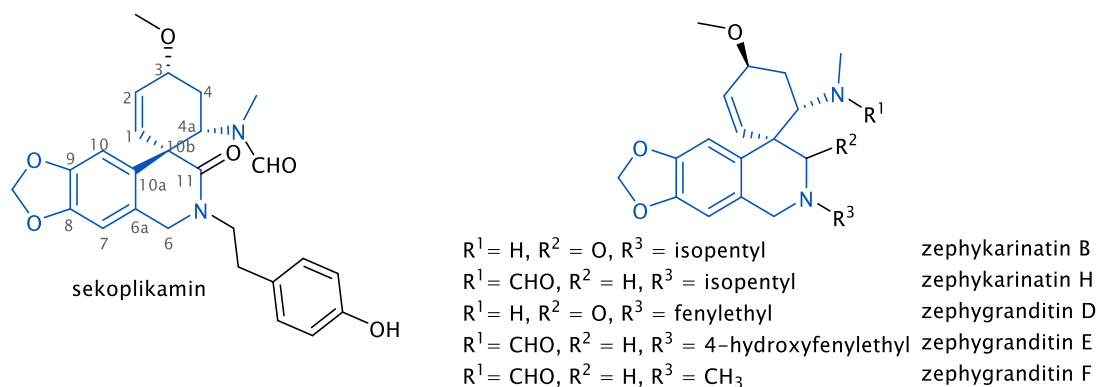
Obrázek 25 Pretazettinový strukturní typ izolovaný z rodu *Narcissus* L.<sup>66, 68</sup>

**Plikaminový typ** je složen z fragmentu částečně nasyceného indolo[3,3a-*c*]izochinolinu, jenž je substituovaný 4-hydroxyfenylethylem, jak je patrné z obrázku 26. Tato skupina spolu se sekoplikaminovým typem obsahuje v molekule dva dusíkové atomy, což je u AA vysoce neobvyklé.



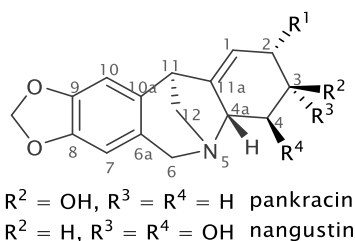
Obrázek 26 Plikaminový strukturní typ izolovaný z rodu *Narcissus* L.<sup>76</sup>

**Sekoplikaminová skupina** čítá pouhých osm alkaloidů, z nichž šest bylo izolováno z rodu *Narcissus a Zephyranthes* (Obrázek 27). Vyznačuje se spirocyklem, což je pro AA velice atypické strukturní uspořádání.<sup>65</sup>



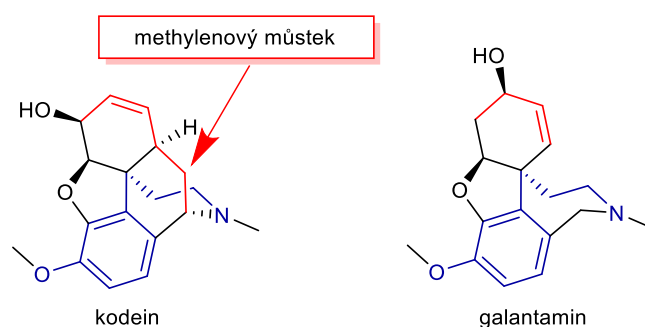
**Obrázek 27** Sekoplikaminový typ izolovaný z rodu *Narcissus* L. a *Zephyranthes* (číslování převzato)<sup>76</sup>

Dibenzo[*b,e*]azepinový skelet je charakteristický pro **montaninovou skupinu**, která patří k minoritním AA (Obrázek 28). Cedrón a spol.<sup>77</sup> ve svém článku popisují intramolekulární přesmyk haemanthaminu a haemanthidinu na látky montaninového typu za použití  $\text{SOCl}_2$  v DCM za refluxu.



**Obrázek 28** Alkaloidy montaninového typu, které byly izolovány z rodu *Narcissus* (číslování převzato)<sup>68, 78</sup>

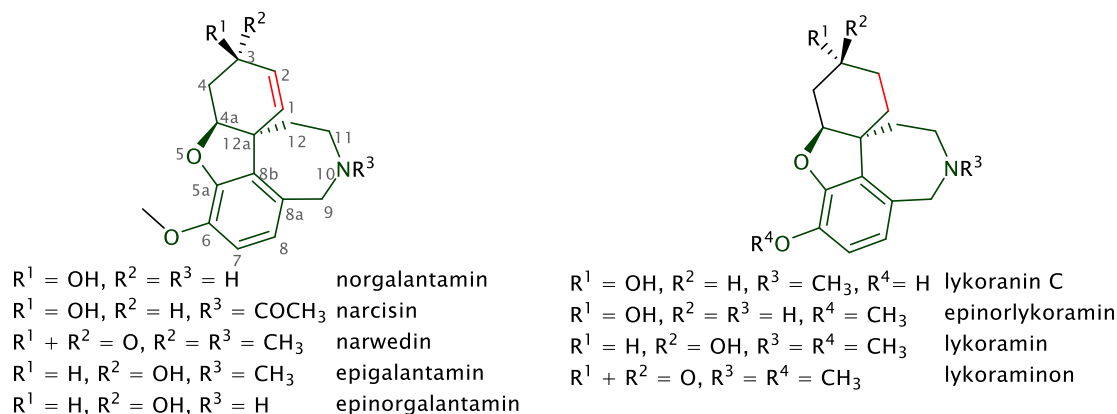
Taktéž polykondenzovaná struktura **galantaminových derivátů** se vymyká běžným strukturálním typům AA (Obrázek 29, Obrázek 30). Benzo[2,3]benzofuro[4,3-*cd*]azepinový skelet je na první pohled velice strukturálně podobný derivátům morfinanu (morfin, kodein). V literatuře lze skutečně nalézt články popisující totální syntézu těchto alkaloidů vycházející ze stejné výchozí látky.<sup>59, 60</sup> Obrázek 29 představuje zmíněnou strukturální podobnost.



**Obrázek 29** Porovnání struktur kodeinu a galantaminu: **červeně** označené jsou strukturální rozdíly těchto léčivých látek a **modře** označený je *O*-metylovaný společný opioidní farmakofor

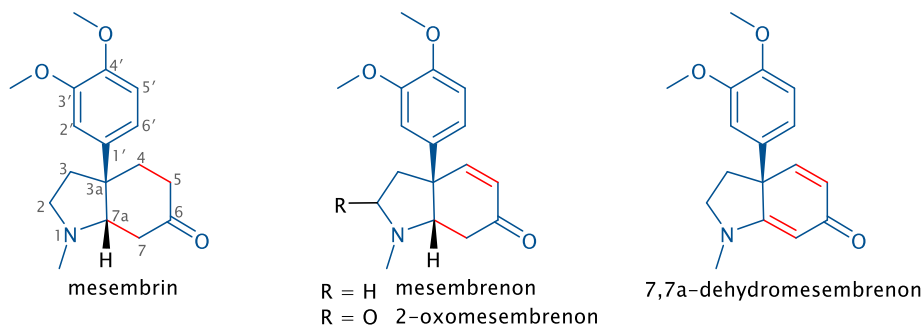
Opioidní farmakofor v podobě 3-hydroxyfenylpropylaminu přináší i galantaminu analgetické<sup>79</sup> až anestetické účinky. Prvně dokumentované použití (1955) jako reverzibilního inhibitoru neuromuskulární blokády navozené látkami podobnými tubokurarinu bylo publikováno ruským vědcem Mashkovskiiem (galantamin byl poprvé izolován v Rusku

z *Galanthus woronowii*). Vzhledem k tomu, že na počátku byl galantamin používán zejména v zemích Ruské federace, není možno nalézt mnoho dat z klinických studií.<sup>80</sup> V následujících letech byla u galantaminu prokázána inhibice AChE, méně BuChE a alosterická modulace nikotinových receptorů.<sup>81</sup>



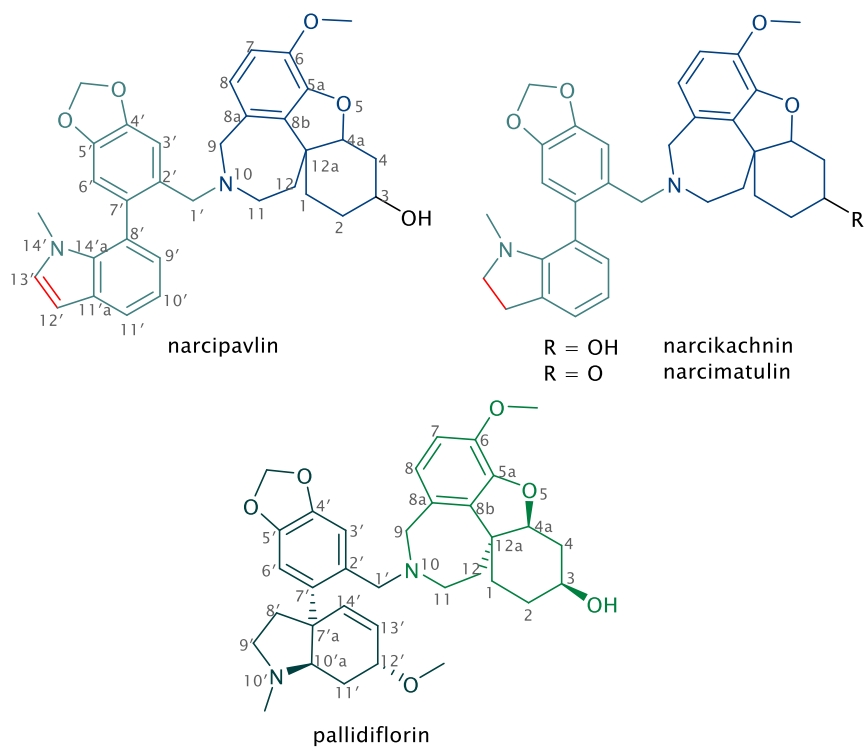
**Obrázek 30** Galantaminový strukturální typ alkaloidů izolovaných z rodu *Narcissus*<sup>56, 72, 82</sup>

**Skeleciový strukturální typ** (Obrázek 31), vyznačující se úplně nebo částečně nasyceným indolovým kruhem substituovaným v pozici 3a fenylem, nepatří mezi typické AA (izolováno pouze z *Narcissus triandrus* L.<sup>83</sup>). Poprvé byly získány tyto alkaloidy z rostliny *Scelletium tortuosum*, v níž jsou obsaženy ve vyšší koncentraci než ve zmíněné rostlině čeledi Amaryllidaceae. Sušením nebo fermentací nadzemní části této sukulentní rostliny se získává kana, která obsahuje zejména mesembrin a mesembrenon. Jihoafrická tradiční medicína ji využívá jako mírné analgetikum a modulátor nálady. Proto byly u alkaloidů tohoto typu testovány zejména biologické aktivity spojené s patologií deprese. Prokázalo se, že mesembrin, mesembrenon a mesembrenol inhibují zpětné vychytávání serotoninu v nanomolárních koncentracích, což je srovnatelné s účinky fluoxetinu, tedy klinicky podávaného selektivního inhibitoru zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Současně byla u látek testována inhibice fosfodiesterázy-4 (PDE4), která u mesembrenonu měla hodnotu  $0,47 \mu\text{mol.l}^{-1}$  v porovnání s  $0,13 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u preklinicky testovaného rolipramu (bohužel má nízké terapeutické okno, neboť se již v nízkých dávkách vyskytují závažné vedlejší emetické účinky, proto jeho testování bylo zastaveno<sup>84</sup>). Komerční trh nabízí standardizovaný extrakt získaný ze *Scelletium tortuosum* Zembrin®, který byl také podroben testování na několika dobrovolnících.<sup>85</sup>



**Obrázek 31** Alkaloidy skeleciového typu izolované z rostliny *Narcissus triandrus* L.<sup>83</sup>

**Heterodimerní alkaloidy** obsahují substrukturální fragment galantaminového typu a liší se substitucí na dusíkovém atomu azepinového kruhu (Obrázek 32). V molekule narcikachninu, narcimatulinu a narcipavlinu je navázán fragment galantindolové skupiny a v případě pallidiflorinu se jedná o substituci fragmentem skeleciového typu.



**Obrázek 32** Heterodimerní strukturní typy alkaloidů izolovaných z rodu *Narcissus* L.<sup>72, 73, 86</sup>

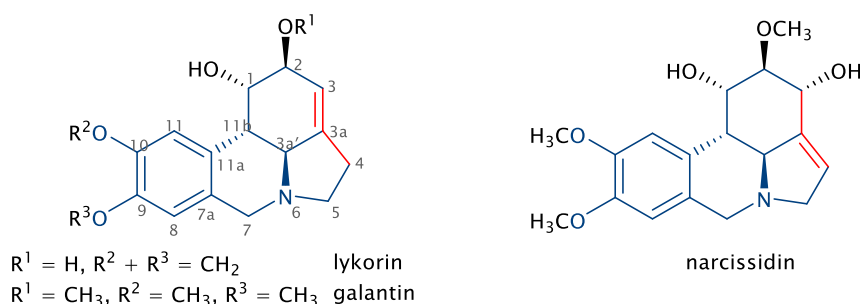


## 1.2.2 *Zephyranthes citrina* Baker



**Obrázek 33** *Zephyranthes citrina* Baker (převzato z internetového zdroje)<sup>87, 88</sup>

Cibulovina taktéž z čeledi Amaryllidaceae, původem z Yucatánu a Kuby, je v současné době hojně pěstovaná v mírném i tropickém podnebném pásu pro svůj jemný a zářivý vzhled. Dobře prospívá na vlhkém stanovišti a kvést začíná po prvních jarních deštivých dnech. Kvete drobným jasně žlutým květem. K izolaci alkaloidů z rostlin této čeledi se nejčastěji používá čerstvá cibule. Jak však popisuje Herrera ve své práci<sup>89</sup>, pro účel jejich fytochemické analýzy byla použita celá rostlina o hmotnosti suché drogy pouhých 193 g. Bylo izolováno osm alkaloidů, z nichž jeden (oxomaritidin) byl izolován poprvé z přírodního zdroje. Obrázky 34 a 35 představují alkaloidy získané v této práci.



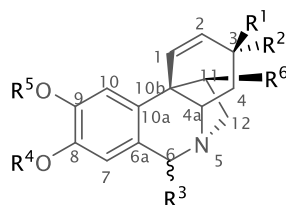
**Obrázek 34** Dříve izolované alkaloidy lykorinového typu ze *Zephyranthes citrina* Baker<sup>89, 90</sup>

Z rodu *Zephyranthes* již však byla získána celá řada alkaloidů lykorinového (Obrázek 20, Obrázek 34), haemanthaminového (Obrázek 21, Obrázek 35), homolykorinového (Obrázek 22), narciklasinového (Obrázek 23), plikaminového (Obrázek 26), sekoplikaminového (Obrázek 27), galantaminového (Obrázek 30), krininového (Obrázek 36), isminového (Obrázek 37) a zephykandidin A (Obrázek 38, detekován jen na MS, izolovat se jej nepodařilo).

Izolace oxomaritidinu z extraktu zaujala kolegy na spolupracujícím pracovišti Katedry botaniky. Připravili vlastní souhrnný alkaloidní extrakt z této rostliny, u kterého byly



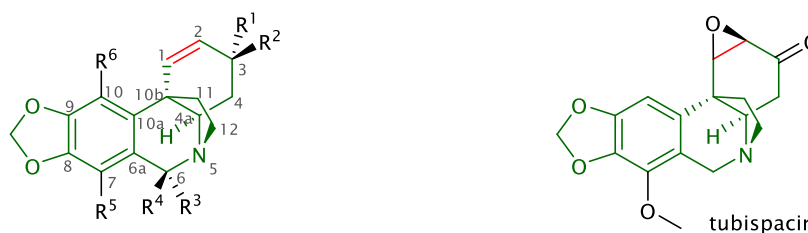
následně testovány inhibiční aktivity AChE a BuChE. Extrakt vykazoval žádoucí inhibici, proto bylo započato hlubší zkoumání obsahových látek. Fytochemická analýza byla uskutečněna z množství 35 kg čerstvé cibule (v této rostlinné části jsou alkaloidy zastoupeny nejhodněji). Identifikace vybraných izolovaných alkaloidů bude diskutována v části Výsledky s komentářem.



$R^1 + R^2 = O, R^3 = H, R^4 = R^5 = CH_3, R^6 = H$	oxomaritidin
$R^1 = OH, R^2 = R^3 = H, R^4 = R^5 = CH_3, R^6 = H$	maritidin
$R^1 = OCH_3, R^2 = R^3 = H, R^4 + R^5 = CH_2, R^6 = OH$	haemanthamin
$R^1 = OCH_3, R^2 = H, R^3 = OH, R^4 + R^5 = CH_2, R^6 = OH$	haemanthidin (C6-epimery)
$R^1 = OH, R^2 = R^3 = H, R^4 + R^5 = CH_2, R^6 = H$	vittatin

**Obrázek 35** Dříve izolované alkaloidy haemanthaminového typu ze *Zephyranthes citrina* Baker<sup>89, 90</sup>

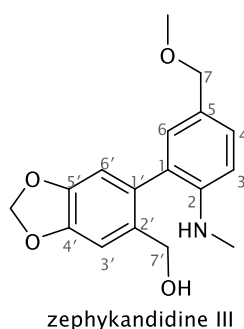
**Krininový typ** (Obrázek 36) se strukturálně liší od haemanthaminového orientací ethylenového můstku na fenanthridinovém skeletu.



$R^1 = OH, R^2 = R^3 = R^4 = H, R^5 = OCH_3, R^6 = H$	powellin
$R^1 = H, R^2 = OCH_3, R^3 = R^4 = R^5 = H, R^6 = OH$	hippeastidin
$R^1 = H, R^2 = OCH_3, R^3 = OH, R^4 = R^5 = H, R^6 = OH$	6 $\alpha$ -hydroxyhippeastidin
$R^1 = H, R^2 = OCH_3, R^3 = H, R^4 = OH, R^5 = H, R^6 = OH$	6 $\beta$ -hydroxyhippeastidin
$R^1 = H, R^2 = OCH_3, R^3 = OH, R^4 = R^5 = R^6 = H$	10-deoxy-6 $\alpha$ -hydrohippeastidin

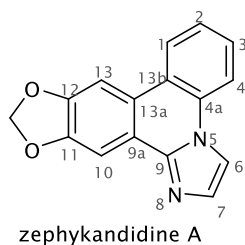
**Obrázek 36** Alkaloidy krininového strukturního typu izolované z jiných druhů rodu *Zephyranthes*<sup>90</sup>

U **isminového strukturního typu** (Obrázek 37) byla prokázána omezená rotace kovalentní vazby spojující bisarylové uskupení.<sup>65</sup>



**Obrázek 37** Zephykandidine III jako isminový strukturní typ izolovaný z rodu *Zephyranthes*<sup>65</sup>

Imidazo[1,2-f]fenanthridinový skelet zephykandidinu A je unikátním strukturním typem (Obrázek 38). Tato molekula byla poprvé publikována v roce 2006 jako produkt one-pot syntézy.<sup>91</sup> Teprve o deset let později byla látka izolována z rostliny *Zephyranthes candida* Lindl., čímž byla potvrzena existence tohoto sekundárního metabolitu jako produktu rostlinné biosyntézy.<sup>92</sup>



**Obrázek 38** Molekula zephykandidinu A izolovaného ze *Zephyranthes candida* Lindl.<sup>90, 92</sup>

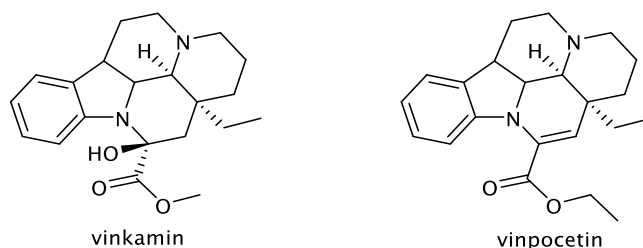
### 1.2.3 *Vinca minor* L.



**Obrázek 39** Nákres<sup>93</sup> a fotografie<sup>94</sup> *Vinca minor* L. (převzato z internetového zdroje)

Tato rostlina je známá pod názvem barvínek menší nebo také brčál menší. Domovinou mu je oblast Evropy. Jedná se o stálezelenou půdokryvnou vytrvalou rostlinu. Je-li rostlina hojně zastříhována, může s oporou vytvořit keř do výšky jednoho metru. Bohatě kvete fialovým květem od pozdního jara až do léta, jde tedy o vyhledávanou okrasnou rostlinu. V tradiční medicíně je nať používána pro své vasodilatační účinky zejména v oblasti cévního zásobení mozku, kde se současně využívá i podpůrného vlivu na metabolismus neuronů.<sup>95</sup> Grujić a spol.<sup>96</sup> zkoumali také antimikrobiální účinky a antifungální účinky různých částí extraktu získaného z *Vinca minor* (současně byl sledován vliv místa sběru extraktu).

Jedná se zejména o účinky alkaloidu vinkaminu, který je v rostlině nejvíce zastoupen. Jeho derivátem (dehydratace a transesterifikace) je vinpocetin, jehož neuroprotektivní účinky s úspěchem využívá současná klinická medicína u cerebrovaskulárních onemocnění (v České republice je současně na trhu Vinpocetin Covex® a Cavinton®).<sup>97</sup>

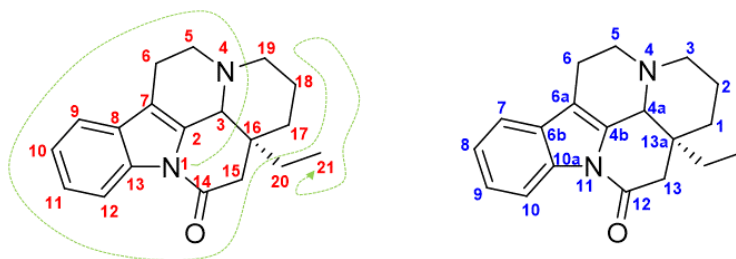


**Obrázek 40** Přírodní vinkamin a jeho syntetický derivát vinpocetin

Avšak úplně první takzvané vinka alkaloidy (indolový skelet; terpenová biosyntetická cesta) byly izolovány v padesátých letech 19. století z barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus* L., synonymum *Vinca rosea* L.), který patří do stejné čeledi jako *V. minor* L. Rozšířené používání této rostliny v rámci tradiční čínské a ájurvédské medicíny bylo inspirací pro fytochemický rozbor této rostliny. Vzhledem k tomu, že rostlina byla používána jako hypoglykemikum a antimalarikum, byly získané látky testovány na králících, kterým

byla sledována hladinu cukru v krvi. Nejenže nedošlo k očekávaným změnám glykémie, ale u testovaných zvířat se začala projevovat septikémie. Příčinou tohoto stavu byla identifikována leukopenie po podání vinka alkaloidů. Díky tomuto pokusu byly postupně objeveny dimerní (bisindolové) sloučeniny vinblastin a vinkristin, dnes klinicky podávaná léčiva v onkologii. Vinka alkaloidy byly podrobeny různým strukturním obměnám. Například deriváty vinorelbin, vindesin a vinflunin prošly úspěšně sérií klinických hodnocení a v současnosti patří mezi dobře známá chemoterapeutika. Mechanismem účinku zde jmenovaných alkaloidů je inhibice funkce mikrotubulu a následná ztráta možnosti mitózy pro buňku.<sup>98, 99</sup>

Ovšem barvínek menší není příliš bohatý na bisindolové alkaloidy (Obrázek 49) v porovnání s barvínkovcem růžovým.<sup>100</sup> Z *V. minor* byla izolovaná řada alkaloidů, v literatuře je uváděno více jak 50 látek,<sup>100</sup> avšak toto číslo bude pravděpodobně vyšší, neboť tato rostlina byla předmětem fytochemických analýz už od padesátých let. Vinkamin byl prvním popsáním alkaloidem z této rostliny.<sup>101</sup> Na následujících řádcích budou představeny pouze některé strukturní typy zejména pak ty, které byly v této práci identifikovány. Charakteristickým znakem je indolové nebo indolinové jádro kondenzované s polycyklickým uskupením. Velice nepříjemnou součástí celé problematiky vinka alkaloidů je desítky let zažité číslování struktury podle biogeneze. Toto číslování nerespektuje směrnice IUPAC a velmi znesnadňuje orientaci v už tak strukturně velmi složitých látkách. Na molekule eburnamoninu je tento problém vyobrazen (Obrázek 41). Dalším zádrhelem řešeršní práce týkající se těchto alkaloidů je časté zdvojení nebo dokonce ztrojení názvu pro totožnou molekulu (v případě eburnamoninu je to vinkamon a vinburnin), pak také některé práce uvádí různé konfigurace pod jedním názvem. Toto je jen stručný výčet problematiky vinka alkaloidů.

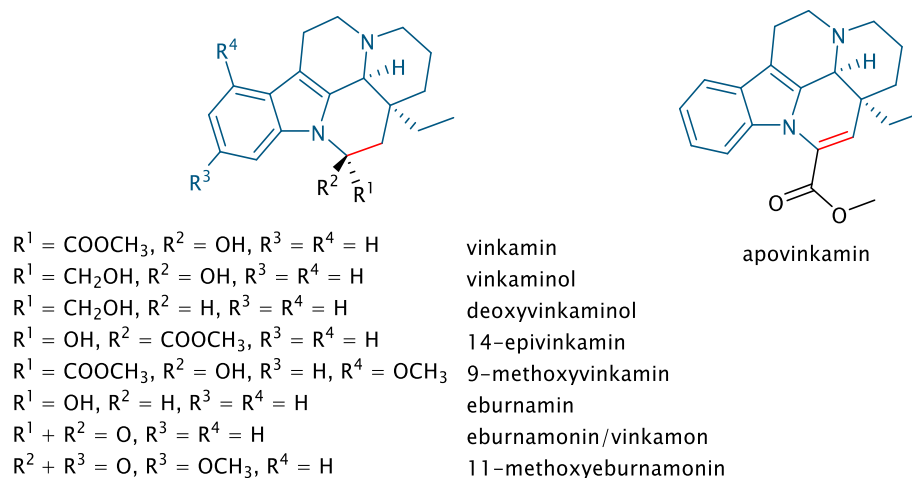


**Obrázek 41** Srovnání číslování struktury eburnamoninu: **červeně** očíslované dle biogeneze historicky zažité (existují i jiné verze), **modře** očíslované dle IUPAC<sup>102</sup>

Domnívám se, že v současné době již bohužel není možné zjednat nápravu a přečíslovat všechny izolované alkaloidy této čeledi podle náležitostí IUPAC systému. Zásadní problém by se vyskytl u látek, jejichž název byl vytvořen od strukturně blízkého alkaloidu s vyjádřením lokantu modifikace. Například pro 14-epivinkamin by takové číslování vycházelo na pozici C12 a název by pak byl 12-epivinkamin. Proto v této práci je uvedeno číslování odvíjející se od již použitých pro různé strukturní typy vinka alkaloidů (Výsledky s komentářem).

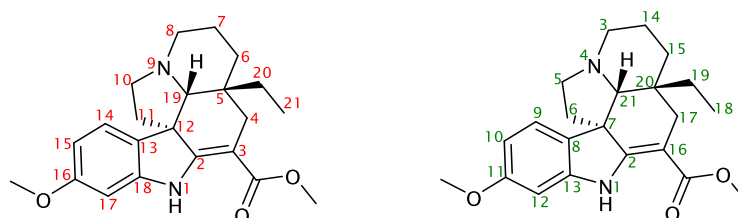
**Eburnanová skupina** má pentacyklický indolo[3,2,1-*de*]pyrido[3,2,1-*ij*][1,5]naftyridinový skelet (Obrázek 41, Obrázek 42). Patří mezi nejzastoupenější alkaloidy v barvíнку menším. U těchto alkaloidů byla zkoumána celá řada biologických účinků. Jak již bylo výše zmíněno,

vinkamin, jehož koncentrace v této rostlině jsou nejvyšší z vinka alkaloidů, dal za vznik polosyntetickému derivátu vinpocetinu, který je registrovanou léčivou látkou.

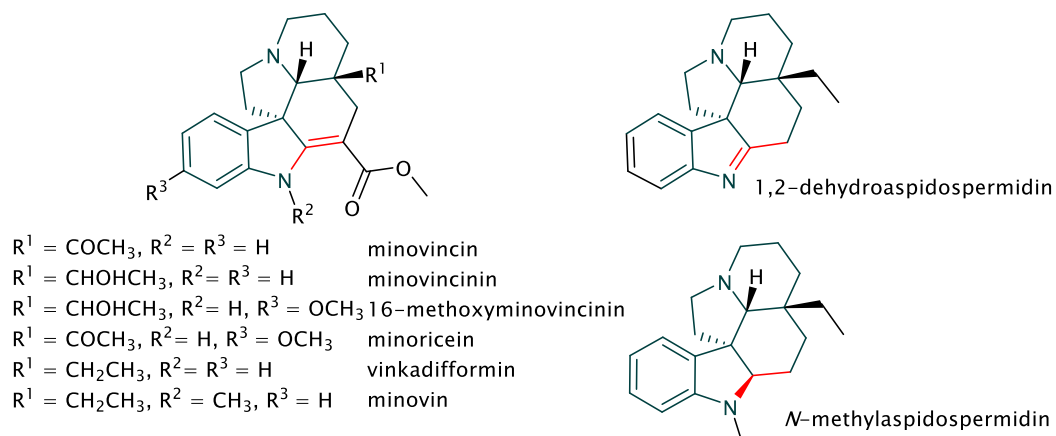


**Obrázek 42** Vinka alkaloidy eburnamoninového typu izolované z *Vinca minor* L.<sup>9, 95, 103–106</sup>

Na molekule 16-methoxyvinkadiforminu (Obrázek 43) je představen problém číslování v **aspidosperminové skupině** alkaloidů. Číslování dle IUPAC by v tomto případě bylo problematické vzhledem k pozici dvojné vazby, která může být součástí indolového fragmentu nebo být v konjugaci s esterovou skupinou v rámci  $\alpha,\beta$ -nenasyčeného methylesteru či je nahrazena jednoduchou vazbou (zobrazeno červeně na molekulách alkaloidů aspidosperminové skupiny, viz obrázek 44).

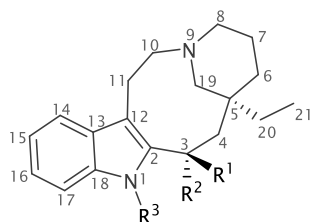


**Obrázek 43** Porovnání číslování na molekule 16-methoxyvinkadiforminu často používané<sup>107</sup> označené **červeně**, **zeleně** je zobrazeno číslování použité v práci Farahanikia a spol.<sup>95</sup> (ve zmíněné publikaci je představeno na molekulách minovinu, minovincinu a vinkaminu)



**Obrázek 44** Další vinka alkaloidy aspidosperminového typu izolované z *Vinca minor* L.<sup>9, 95, 108, 109</sup>

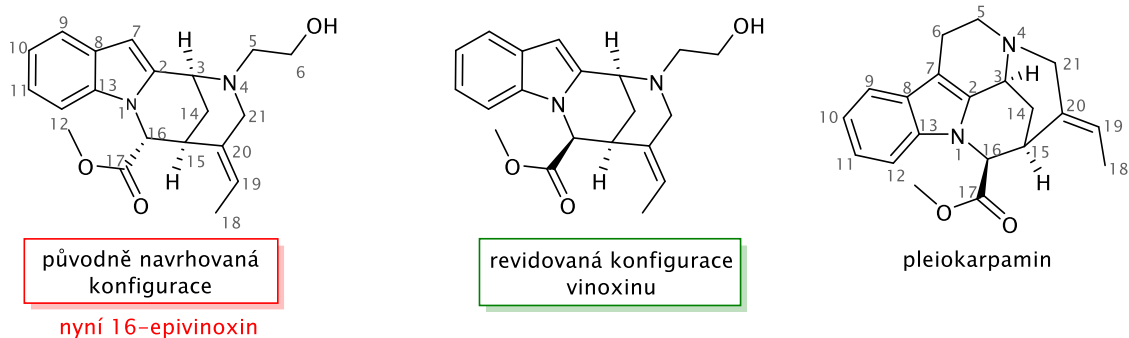
**Kebračaminový typ** je další skupinou těchto indolových alkaloidů (Obrázek 45). Někteří autoři tyto alkaloidy uvádí jako součást aspidosperminového strukturního typu (Tan a spol.<sup>110</sup>). Jejich syntéze se v 70. letech věnoval Kutney a spol.<sup>111</sup>, který uvedl vinkaminorein a vinkaminorin jako C3-epimery, avšak jak se postupně ukázalo, jejich skutečná C3 konfigurace je opačná (totální syntéza vinkaminorinu, kterou uvádí Tan a spol.<sup>110</sup>). Naopak Farahanikia<sup>95</sup> ve své práci tyto alkaloidy uvádí se správnou konfigurací, ale používá velice zvláštní číslování struktury (pravděpodobně pro ilustraci strukturní podobnosti s předchozím typem, který také popisuje ve svém článku). Sporné vyjadřování ať už relativní, nebo absolutní konfigurace provází téměř všechny alkaloidy izolované z této rostliny.



$R^1 = \text{COOCH}_3$ , $R^2 = \text{H}$ , $R^3 = \text{CH}_3$	vinkaminorein
$R^1 = \text{H}$ , $R^2 = \text{COOCH}_3$ , $R^3 = \text{CH}_3$	vinkaminorin
$R^1 = \text{H}$ , $R^2 = \text{COOCH}_3$ , $R^3 = \text{H}$	vinkadin
$R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$	kebračamin
$R^1 = R^2 = \text{H}$ , $R^3 = \text{CH}_3$	<i>N</i> -methylkebračamin

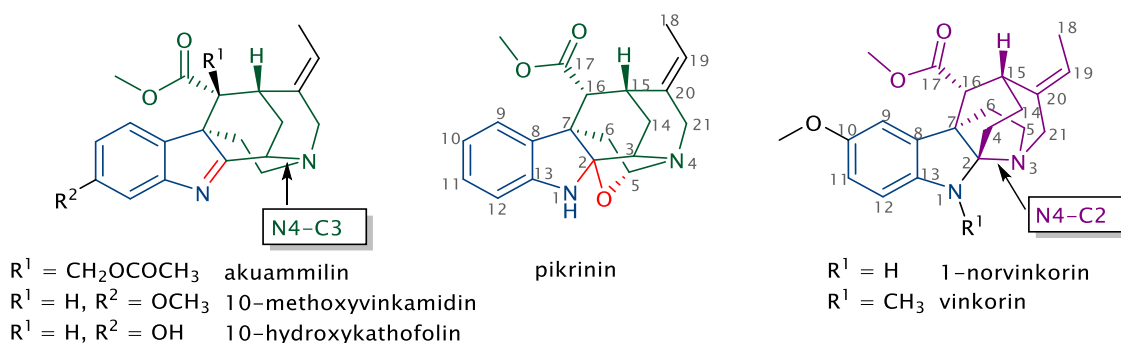
**Obrázek 45** Kebračaminový strukturní typ identifikovaný ve *Vinca minor* L.<sup>95, 108, 112</sup>

V roce 1967 byl otištěn článek, kde Mokřý a spol.<sup>108</sup> zmiňují izolaci nového alkaloidu s názvem vinoxin, jehož struktura se zásadně liší od dosud popsaných vinka alkaloidů. Na základě UV analýzy bylo identifikováno indolové jádro, podle IČ dat předpověděli esterovou skupinu a disubstituované benzenové jádro. Mýlili se pouze v absenci volného hydroxyly. Původně byl vinoxin uváděn jako (*R,S,S*)-izomer<sup>113</sup> a v současnosti je považován za (*S,S,S*)-izomer na základě srovnání CD spekter s pentacyklickým analogem pleiokarpaminem (strukturní typ C-mavakurinový), jehož konfigurace byla ověřena totální syntézou.<sup>114</sup> Již Proksa ve své práci z roku 1991<sup>105</sup> také prezentuje správnou konfiguraci vinoxinu, avšak bez jakékoli zmínky o přehodnocení konfigurace z Votického práce.<sup>113</sup> Původně navrhovaný diastereomer byl pojmenován 16-epivinoxin (opět je na obrázku 46 aplikováno biogenetické číslování).



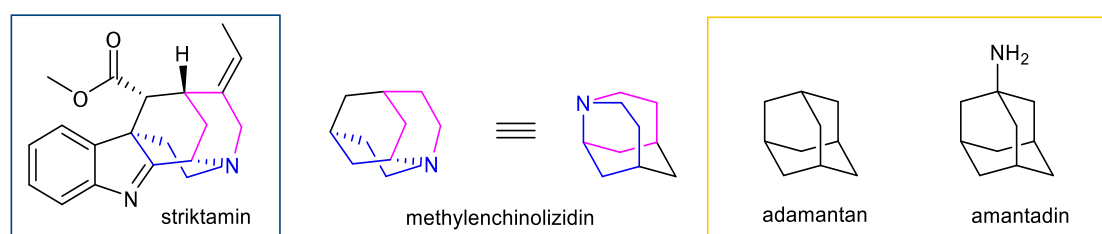
**Obrázek 46** Molekula vinoxinu a revidovaná konfigurace na základě srovnání s pleiokarpaminem<sup>114</sup>

Indolochinolizidin, který je ještě propojený methylenovým můstkem, se skrývá v **akuammilinovém skeletu** (Obrázek 47). Druhá strukturální varianta, která se vyskytuje u vinkoranového subtypu je pyrrolo[1,3-*ab*]azepin. Tento substrukturální fragment se často nachází u bisindolových heterodimerních vinka alkaloidů (zde uváděný vinkarubin, obrázek 49). Dohromady čítá akuammilinová skupina více jak 60 monoterpenických alkaloidů izolovaných z čeledi Apocynaceae, na jejichž komplikované struktúře pracoval v 70. letech Dolby a spol.<sup>115, 116</sup> Na tento výzkum navázala Bennasar<sup>117</sup> v roce 1988 a další práce týkající se těchto alkaloidů se začaly objevovat až v posledních 20 letech.<sup>118-123</sup>



**Obrázek 47** Další vinka alkaloidy akuammilinového typu izolované z barvínku menšího.<sup>9, 105, 124</sup> Znárodněno je odlišné propojení kruhů N4-C2 a N4-C3 dle Adamse a spol.<sup>125</sup>

Přehledová práce Eckermanna a Gaichové<sup>126</sup> uvádí zajímavou analogii s adamantanem, viz obrázek 48. Také uvádí vaničkovou konformaci chinolizidinového fragmentu jako pravděpodobný důvod, proč nebyla molekula striktaminu (syn. vinkamidin) dlouho připravena totální syntézou, ačkoli testované biologické aktivity těchto látek jsou více než zajímavé. Nabízí se i homologie s tricyklickým aminem amantadinem, léčivem mající široké spektrum aplikací podle mechanismu účinku: od inhibice proteinu M (zabrání odpláštění virionu) chřipkového viru typu A, přes antagonistické účinky na glutamátových NMDA receptorech (léčba patologického extrapyramidového syndromu Parkinsonovy choroby, který může být i lékově navozen některými neuroleptiky) až po zmírnění únavových příznaků roztroušené sklerózy (tato indikace je zatím mimo rámec schváleného registrovaného použití, v roce 2019 byla publikována práce ze třetí fáze klinického testování pro tuto indikaci<sup>127</sup>). Dle SÚKL je v současné době na trhu hydrochlorid amantadinu (Viregyt-K®) a jako amantadin-sulfát (PK-Merz®).

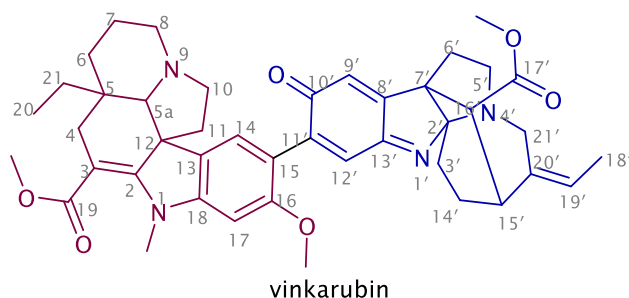


**Obrázek 48** Na struktúře striktaminu je demonstrován **modrou** a **růžovou** barvou chinolizidinový bicyklus, který ve spojení s methylenovým můstkem může být vnímán jako dusíkový analogon adamantanu<sup>126</sup> nebo homologon adamantinu (označeny **žlutě**)



Toto krátké představení vinka alkaloidů uzavírá cytotoxický vinkarubin, který byl izolován a identifikován Proksou a spol.<sup>128, 129</sup> Skutečný obdiv je nutno vyjádřit k jejich práci, neboť dokázali navrhnout strukturu se sumárním vzorcem  $C_{43}H_{50}N_4O_6$  ( $M_r = 718.9$ ) tehdejšími prostředky, kdy měli k dispozici Bruker AM 300 pro měření NMR spekter, jehož senzitivita je v porovnání s našimi instrumenty 2,2–2,8krát nižší. Jedinou výtkou může být vinkarubin prezentovaný v novějším článku,<sup>128</sup> kde jistě nedopatřením došlo k posunu ethylové skupiny 11-methoxy-1-methylvinkadiforminového fragmentu z pozice C20' na pozici C16'.

V **dimerní molekule** vinkarubinu lze nalézt modifikovaný fragment 1-norvinkorinu, jehož součástí je 2,3-dihydroindol-5-on a 11-methoxy-1-methylvinkadiformin, jak uvádí Proksa<sup>129</sup> (v literatuře lze pro stejnou konstituci jakou má zde 11-methoxy-1-methylvinkadiforminový fragment nalézt alkaloid s názvem *N*-methylervincein,<sup>130</sup> nebo byla také tato látka popsána jako jeden z meziproduktů během přípravy vindolinu<sup>131</sup>). Strukturně podobnou látkou je flexikorin izolovaný z rostliny *Rauwolfia reflexa* (Apocynaceae).<sup>132</sup>

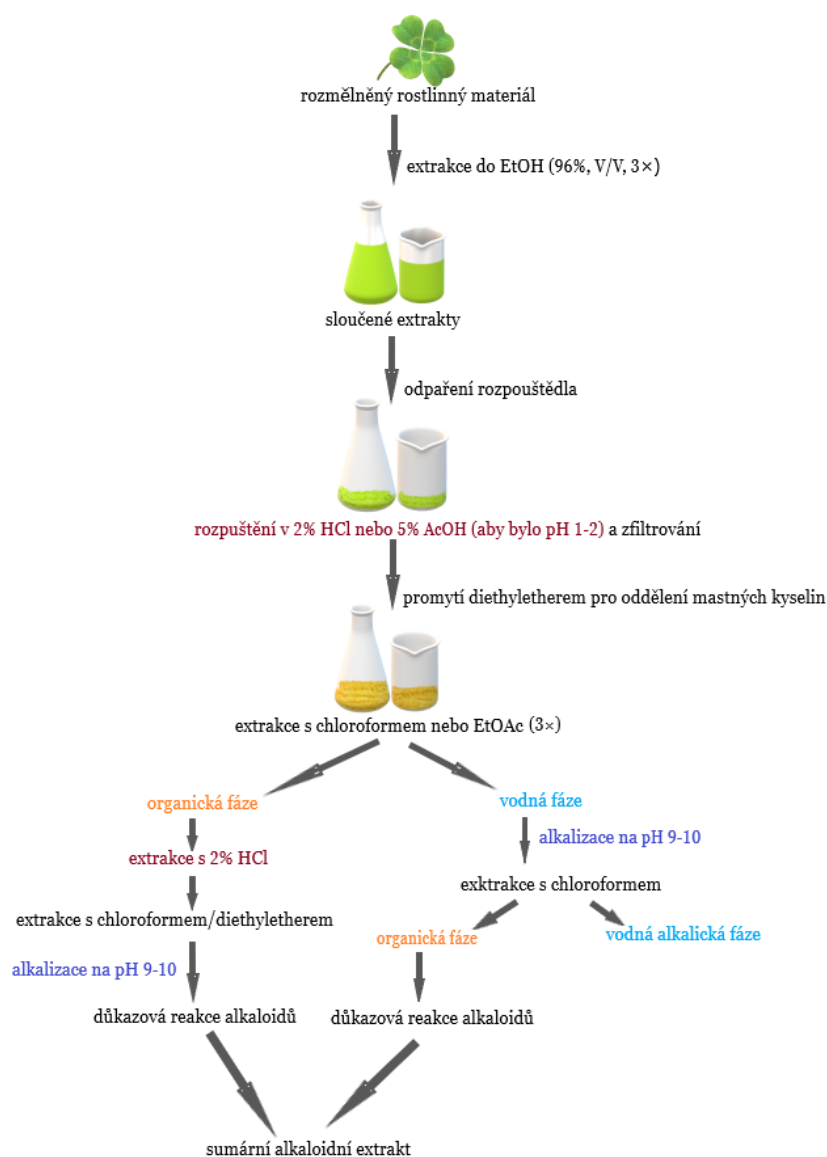


**Obrázek 49** Vinkarubin, zatím jediný publikovaný bisindolový alkaloid izolovaný z *Vinca minor* L. (**červeně**: fragment 11-methoxy-1-methylvinkadiformin, **modře**: modifikovaný fragment 1-norvinkorinu)<sup>129</sup>

Poznámka: Bahadori<sup>133</sup> v článku uvádí existenci vinkalutinu, reference odkazují na zde zmíněnou práci o vinkarubinu<sup>128</sup>, aniž by tam o něm byla zmínka. Ani ostatní dostupné zdroje takový název neznají.



## 1.2.4 Základy izolace alkaloidů



**Obrázek 50** Obecný postup při získávání alkaloidních látek z rostlinného materiálu (použitá rozpouštědla, druhy kyselin a důkazové činidlo jsou uvedena jen pro příklad).

Sbíraná droga může být použita nesusšená (cibule) nebo sušená (nař *V. minor* L.). Pro efektivní extrakci je nutné materiál rozmělnit, aby rozpouštědlo snadněji pronikalo rostlinnou tkání. Dekokcí, macerací nebo jejich kombinací je získán ethanolový výluh (tři opakování), který je následně spojen a odpařen. Následně je odparek rozpuštěn ve slabě kyselém roztoku např. 2 % HCl (acidobazická reakce se zásaditými alkaloidními látkami) a filtrací jsou odděleny pevné části rostlinného materiálu. Pak je filtrát vytřepán s diethyletherem (pro oddělení mastných kyselin; soli alkaloidů jsou rozpuštěny ve vodné fázi). S oddělenou vodnou fází je opakována násobná extrakce s jiným organickým rozpouštědlem ( $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, diethylether, atd). Následně je zvlášť upravována **organická** a **vodná** fáze.

Stále slabě kyselá **vodná fáze** je alkalizována na pH 9–10 (nejčastěji 10 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), aby soli alkaloidů přešly zpět na formu volné báze, která je vytřepána do organického rozpouštědla a následně oddělena.

**Organická** fáze je odpařena (primární alkaloidní extrakt), poté vytřepána se slabým roztokem kyseliny a následně několikrát přečištěna pomocí extrakce.

Alkaloidy jsou v průběhu detekovány srážecími nebo barevnými důkazovými reakcemi pro alkaloidy (důkazy sekundárních a terciárních aminů a kvarterních amoniových solí). K nejpoužívanějším patří Dragendorffovo činidlo (roztok  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , kyseliny vinné a KI) a Mayerovo činidlo (roztok  $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$ ).

Výběr rozpouštědel, kyselin a zásad, ale i modifikace celkového postupu je ryze individuální záležitostí, která závisí na zkušenostech výzkumníka. Obrázek 50 je pouze ilustrativní.

Sumární alkaloidní extrakt je obvykle dále separován pomocí sloupcové, flash, TLC chromatografie či dalších separačních metod. Také analýza preparativní vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) je často zahrnuta do metodiky, stejně jako klasická purifikační metoda např. krystalizace.

## 2 CÍL PRÁCE

---

Hlavním cílem této disertační práce bylo identifikovat strukturu sekundárních metabolitů izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky z různých rostlinných druhů. K dosažení tohoto cíle bylo zapotřebí provést rozsáhlou rešerši dosud identifikovaných alkaloidů, porovnání dostupných interpretací jejich NMR a dalších analytických dat. Izolací alkaloidů se neúnavně věnovalo mnoho fytochemiků, kteří ještě před nástupem NMR spektroskopie prováděli rozsáhlé série degradačních reakcí na izolovaných alkaloidech. Produkty následně analyzovali v té době dostupnými metodami (MS, IČ, UV, atd). Právě tato historie značně komplikovala dosažení cíle práce, neboť často nejsou zveřejněna NMR data, která by se dala použít jako reference, ač struktury jako takové jsou publikované.

Nástroje k dosažení cíle práce:

- určení konstituce molekuly;
- určení relativní konfigurace molekuly, bylo-li možno;
- rešerše interpretací NMR dat pro molekuly se známou strukturou, v ideálním případě data potvrzená rentgenovou analýzou nebo totální enantioselektivní syntézou;
- porovnání relevantních analytických údajů z literatury pro jednotlivé identifikované sekundární metabolity;
- shrnutí získaných informací a aplikace na problematiku struktury daného alkaloidu.

Ve Výsledcích s komentářem jsou představeny jednak alkaloidy, jejichž struktura dosud nebyla publikována, jednak takové alkaloidy, u kterých není možné nalézt v literatuře relevantní NMR data, která by umožnila jednoznačné potvrzení konstituce molekuly. Jedná se o alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae, druhu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton a *Zephyranthes citrina* Baker, a také alkaloidy čeledi Apocynaceae druhu *Vinca minor* L.

V řadě případů bylo možno určit i relativní konfiguraci molekuly pomocí NOESY experimentů, velikosti spin-spinové interakce či srovnáním s daty uvedenými v literatuře u strukturně podobných látek.

Odkazovala-li literatura na přítomnost racemické směsi, byl proveden experiment s posunovým činidlem.

Problematika diastereomerů je řešena zejména v souvislosti s osovou chiralitou, která se neočekávaně objevila u nově identifikovaných AA dimerního původu.

### 3 VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

---

Veškeré prezentované látky byly získány ze spolupracujícího pracoviště Katedry farmaceutické botaniky, kde byly izolovány. U vzorků byla předem stanovena molekulová hmotnost pomocí hmotnostní spektrometrie. V některých případech byla známa predikce struktury alkaloidu nebo zařazení do strukturní skupiny dle EI-MS fragmentace. Nutno podotknout, že v některých případech naměřená molekulová hmotnost neodpovídala skutečné  $M_r$ .

Poznámka: pro zápis číselných hodnot je dále použita desetinná tečka pro oddělení řádů nikoli čárka, jak by bylo správné z hlediska pravidel české interpunkce (zejména z důvodu lepší čitelnosti). Pro ilustraci:

$\delta_H$  4,07, dq,  $J = 9,7$  Hz,  $J = 7,1$  Hz; 3,70 dq,  $J = 9,7$  Hz,  $J = 7,1$  Hz

151,4 (C12), 148,5 (C11), 138,7 (C7a')

vs.

$\delta_H$  4.07, dq,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 7.1$  Hz; 3.70 dq,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 7.1$  Hz

151.4 (C12), 148.5 (C11), 138.7 (C7a')

Identifikované alkaloidy jsou rozděleny do podkapitol podle rostliny, ze které byly izolovány.

### 3.1 Látky izolované z *Narcissus pseudonarcissus* var. *Carlton*

Identifikace molekul ze vzorků izolovaných z rostlinného materiálu kolegou Abdullahem Al Mamunem přinesla identifikaci pěti nových AA **1a–5a** s novým strukturním skeletem (první tři již byly prezentovány v časopise *Biomolecules*<sup>53</sup>). Látka **6a** také nebyla doposud v literatuře popsána a patří k zajímavému narcikachninovému strukturnímu typu AA. Struktura molekuly **7a** byla potvrzena rentgenovou analýzou, neboť NMR data prezentovaná v literatuře se neshodovala se získanými signály v <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektrech pro danou konstituci. Látky **7a**, **9a** a **10a** nebylo možné potvrdit referencemi z literatury, protože nebyly do NMR laboratoře pravděpodobně doručeny ve formě volné báze. Zvláštní případ nastal u látky **8a**, která byla před NMR analýzou považována za molekulu totožnou s **7a**. Rozdíly budou komentovány v příslušné části.

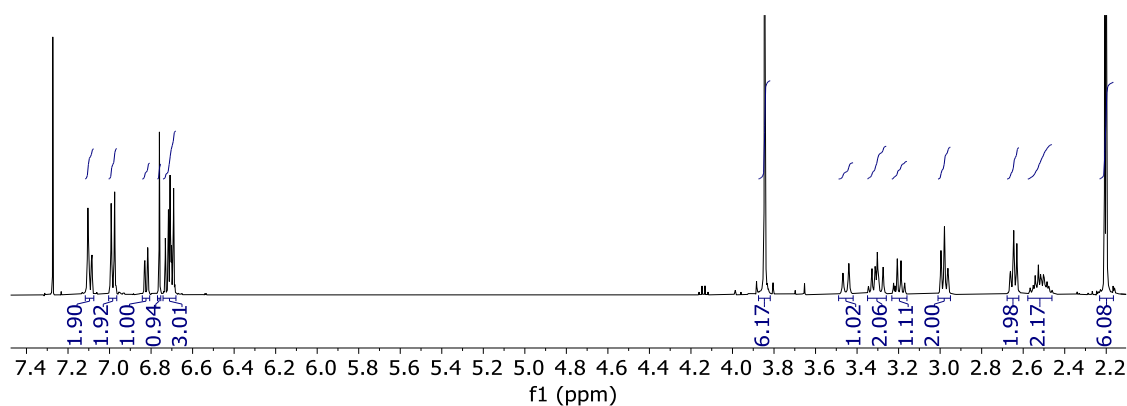
Dále bylo pomocí NMR analýzy identifikováno 13 dalších izolovaných látek, jejichž struktura byla potvrzena shodou s referenčními <sup>13</sup>C NMR daty nalezenými ve vědeckých člancích, a to:

- galantaminový typ:  
(-)-galantamin,<sup>134</sup> (-)-lykoramin;<sup>135</sup>
- galantindolový typ:  
lykosinin B;<sup>136</sup>
- haemanthaminový typ:  
(+)-apohaemanthamin (pravděpodobně izolační artefakt),<sup>137</sup> (+)-haemanthamin,<sup>138</sup>  
(+)-vittatin;<sup>138</sup>
- homolykorinový typ:  
(+)-homolykorin,<sup>139</sup> (+)-9-*O*-demethylhomolykorin,<sup>139</sup> (+)-masonin;<sup>140</sup>
- lykoreninový typ:  
(+)-odulin,<sup>140</sup> (+)-lykorenin;<sup>141</sup>
- lykorinový typ:  
(-)-galantin;<sup>142</sup>
- narciklasinový typ:  
trisfaeridin.<sup>136</sup>

Na následujících stránkách budou popsány jednotlivé identifikace molekul v literatuře dosud nepopsaných AA, a též alkaloidy, pro které nebyla nalezena publikovaná referenční <sup>13</sup>C NMR spektra.

**U1C-B (1a)** $M_r = 432.6$ ;  $m = 10.0$  mg $C_{27}H_{32}N_2O_3$ 

Prvotně určená molekulová hmotnost 323 nepředpovídala nic neobvyklého. Avšak  $^1H$  NMR spektrum vypadalo velice atypicky pro AA. Oblast vyšší frekvence spektra obsahovala dva signály se štěpením vyššího řádu charakteristickým pro AA'BB' spinový systém ( $\delta_H$  7.00–6.96 a 6.72–6.68) a dva singletové signály ( $\delta_H$  7.10 a 6.76), z nichž odstíněnější byl překryt dubletem dubletů ( $\delta_H$  7.09). Posledními dvěma signály v aromatické části byly triplet ( $\delta_H$  6.72) spolu s dubletem dubletů ( $\delta_H$  6.82) se stejně velkou interakční konstantou  $J = 7.4$  Hz (velikost štěpení byla shodná se štěpením pro  $\delta_H$  7.09), která svědčila o provázanosti jejich spinového systému. Dále byl ve spektru zřejmý signál se stejnou frekvencí pro dvě methoxy skupiny na aromatickém kruhu a další dva singlety odpovídající dvěma methylům v oblasti okolo 2.2 ppm, která je u AA typická pro signály  $NCH_3$  skupiny. Další alifatické signály v této oblasti  $^1H$  NMR spektra působily neurčitě, viz obrázek 51.



**Obrázek 51**  $^1H$  NMR spektrum karltoninu A se zobrazenými integračními křivkami

V  $^{13}C$  NMR spektru se objevily čtyři odstíněné signály aromatických uhlíků, sedm signálů protonovaných  $sp^2$  uhlíků (dva z nich měly násobně vyšší intenzitu – AA'BB' systém) a pět signálů pro kvarterní  $sp^2$  uhlíky; sedm odstíněných signálů v alifatické části spektra a dva další signály alifatických uhlíků.

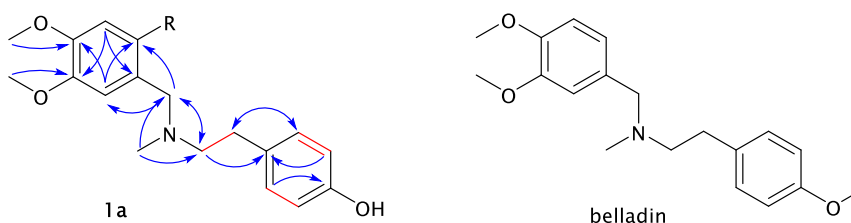
Již jen sečtením všech uhlíkových atomů byla odpovídající molekulová hmotnost vyšší než ta určená hmotnostní spektroskopií. Zjištění finální  $M_r$  bylo založeno na analýze charakteristických posunů skupin vázaných na heteroatomy a výsledcích 2D NMR experimentů.

Pomocí fázově odlišeného HSQC experimentu byly přiřazeny jednotlivé vodíkové signály k uhlíkovým atomům, na kterých byly vázány.

Korelace v COSY experimentu byly v souladu s krosplíky z experimentu H2BC a současně byly podpořeny velikostí odpovídajících  $J$ -konstant v jednotlivých spinových systémech  $H1/H2$ ,  $H2''/H3''$ ,  $H4''/H5''/H6''$  a AA'BB'.

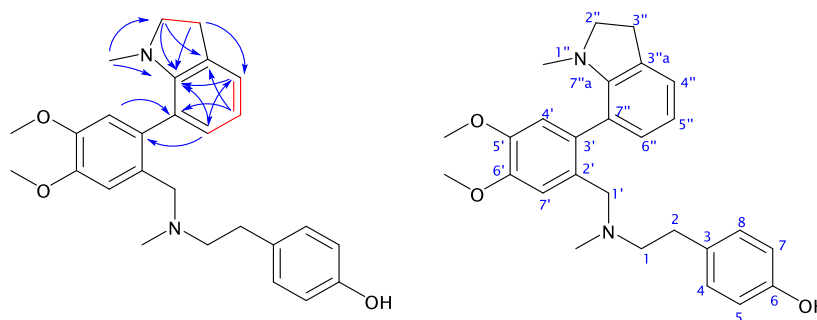
Interakce zobrazené v HMBC experimentu umožnily plně popsat uspořádání celé molekuly, které nebylo zvlášť komplikované. Krosplík  $H2$  s  $C4/C8$ , respektive  $H1$  s  $C3/C1'$ , potvrdil navázání 1,4-disubstituovaného jádra na aminoethylový můstek, přičemž v *para* poloze

jádra byl vázán pravděpodobně volný fenolický hydroxyl (vyplývá z posunu  $\delta_{C6}$  154.0 a absence korelace vodíků teoretického substituentu). Na dusík aminoethylové skupiny byl vázán methyl  $\delta_H$  2.20, což prokázala jeho korelace na C1 a na C1' benzylové pozice. Od této odstíněné  $CH_2$  skupiny byl dále určen 1,2,4,5-tetrasubstituovaný fragment fenylového jádra pomocí korelací z HMBC spekter (Obrázek 52).



**Obrázek 52** Důležité HMBC, COSY a H2BC korelace fragmentu **1a**, který lze přirovnat ke struktuře belladinu

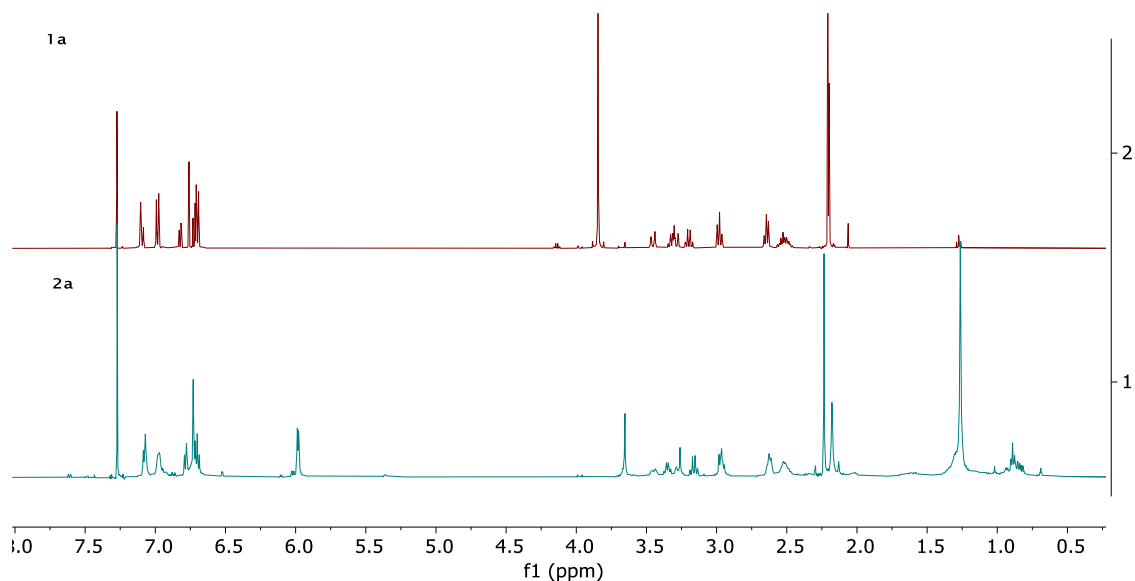
Zbývající substituent tetrasubstituovaného aromatického jádra byl určen jako *N*-methylindolin, jehož substituce v poloze 7'' byla definována díky korelaci H6''/C3' a H4'/C7'' a přítomnosti spinového systému H4''/H5''/H6'', viz obrázek 53.



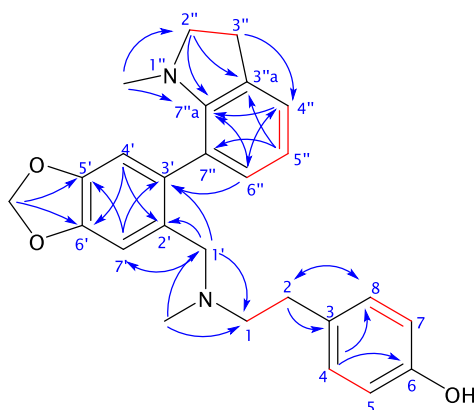
**Obrázek 53** Dokončení HMBC, COSY a H2BC korelací na molekule **1a** a znázornění použitého číslování, které vychází z číslování skeletu belladinu

Odlišná molekulová hmotnost zjištěná při NMR identifikaci, byla následně potvrzena HRMS analýzou, kde byl zřejmý protonovaný molekulový pík  $[M+H]^+$   $m/z$  433.2488 odpovídající dle NMR určenému sumárnímu vzorci  $C_{27}H_{32}N_2O_3$ . Je potřeba zmínit, že alkaloidy se dvěma dusíky jsou pro AA velice atypické.

Tento alkaloid s názvem karltonin A byl prezentován v práci Al Mamun a spol.<sup>53</sup>

**U1b (2a)** $M_r = 416.5$ ;  $m = 6.7$  mg $C_{26}H_{28}N_2O_3$ **Obrázek 54** Porovnání  $^1\text{H}$  NMR spekter vzorku **1a** a **2a**

Kvůli nízké koncentraci zkoumané látky ve vzorku měla 1D NMR spektra horší rozlišení, avšak bylo možné identifikovat podobnost se spektry látky **1a**. Stejný trend byl patrný u  $^{13}\text{C}$  spekter. Jediný rozdíl byl v absenci signálu methoxy skupiny a v přítomnosti signálu charakteristického pro velice odstíněnou methylenovou skupinu 1,3-benzodioxolu, jehož fragment se často nachází ve strukturách AA. Důležité korelace z 2D NMR experimentů jsou zobrazeny na obrázku 55.

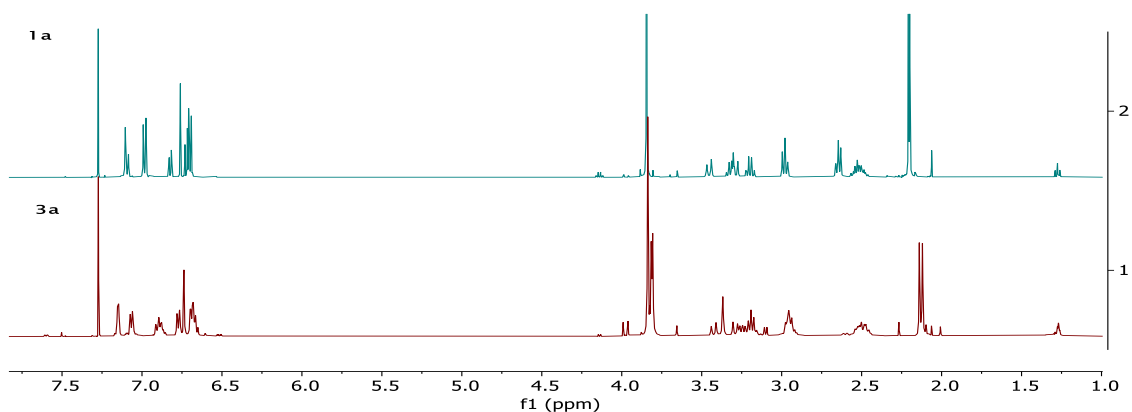
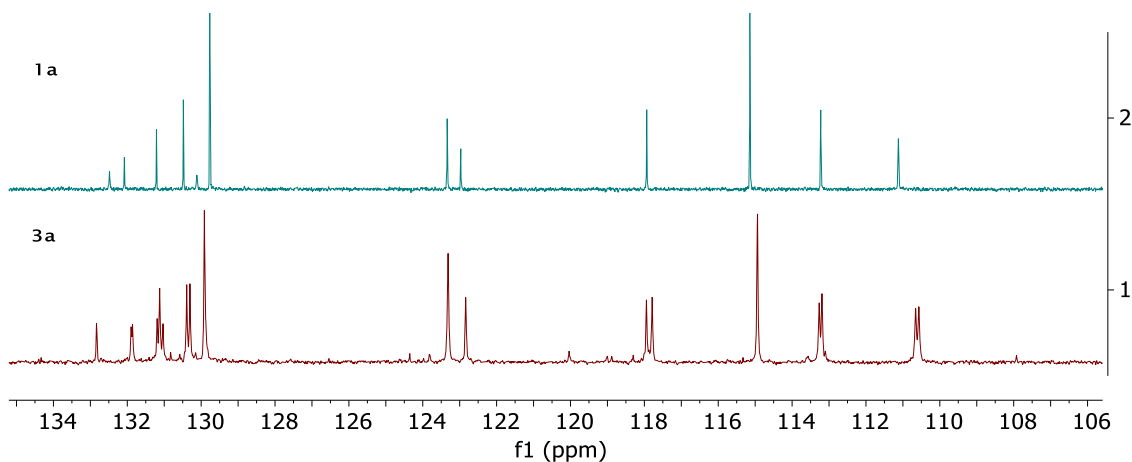
**Obrázek 55** HMBC, COSY a H2BC korelace, které vedly k určení konstituce molekuly **2a**

Výsledky identifikace tohoto alkaloidu pojmenovaného karltonin B byly prezentovány v práci Al Mamun a spol.<sup>53</sup>

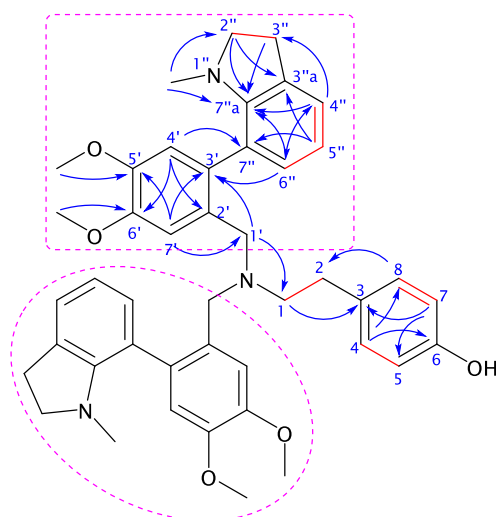


**U1A-B (3a)** $M_r = 699.9$ ;  $m = 12.0$  mg $C_{44}H_{49}N_3O_5$ 

Na základě 1D NMR spekter byla u vzorku s  $M_r = 699$  předpovězena struktura podobná **1a**. V  $^{13}C$  NMR spektru bylo ale zřejmé zdvojení signálů (Obrázek 57), jež byly s pomocí HSQC experimentu přiřazeny jednotlivým skupinám. Velice zajímavé bylo zdvojení signálu *N*-methylu ( $\delta_H$  2.14 a 2.12) a methoxy skupin ( $\delta_H$  3.84 (6H), 3.82 (3H), 3.81 (3H)) v  $^1H$  NMR spektru (Obrázek 56).

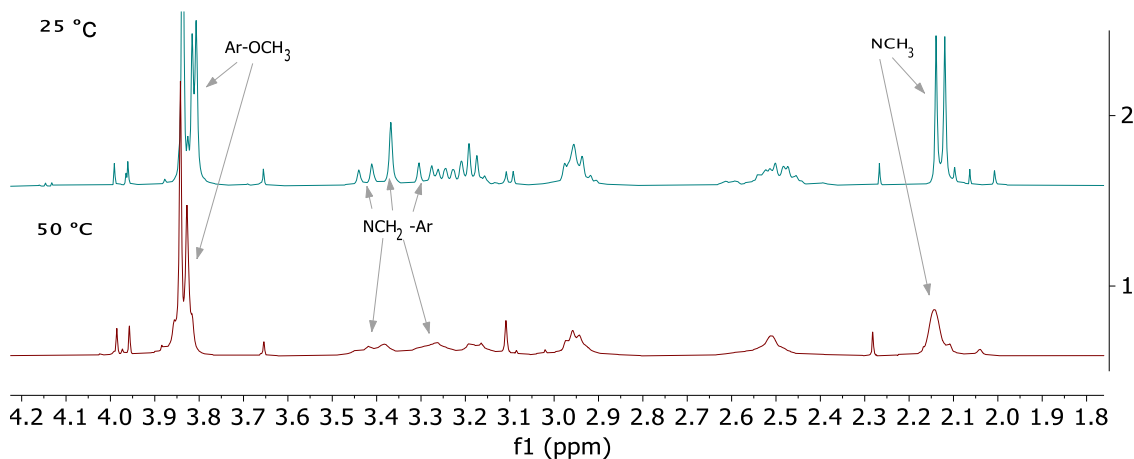
Obrázek 56 Porovnání **1a** a **3a**  $^1H$  NMR spekterObrázek 57 Vybraná část  $^{13}C$  NMR spektra látky **1a** a **3a**, ve které je dobře viditelné zdvojení některých signálů u **3a**

Prokázalo se, že centrální terciární dusíkový atom je substituovaný 4-ethylfenolem a dvěma totožnými fragmenty, 4,5-dimethoxy-2-(*N*-methylindolin-7-yl)fenylmethyl. Pokud by však byly chemicky i magneticky ekvivalentní, měly by jednotlivé atomy mít totožné rezonanční frekvence, což se v 1D NMR spektrech nepotvrdilo. Další zvláštností byly posuny vodíků na C1', které vykazovaly jak signály diastereotopických dubletů s *J*-interakcí 14.5 Hz ( $\delta_H$  3.43 a 3.29), tak singlet  $\delta_H$  3.37.



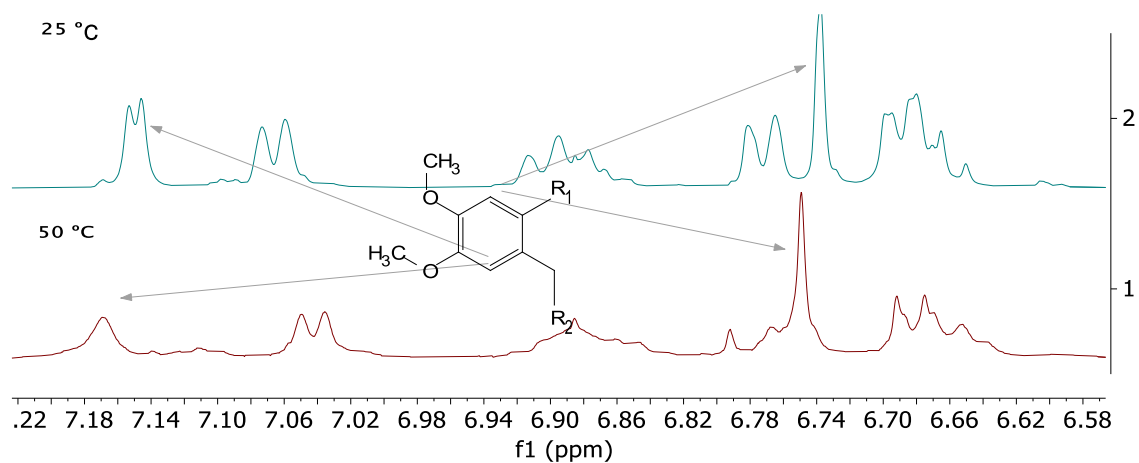
**Obrázek 58** Konstituce molekuly **3a** určená pomocí **HMBC**, **COSY** a **H2BC** experimentů s naznačeným číslováním. Ohraničené úseky stejné fragmenty 4,5-dimethoxy-2-(*N*-methylindolin-7-yl)fenylmethylu

Proč byly signály zdvojeny bylo zjištěno teplotním experimentem, který potvrdil osovou chiralitu (atropoizomerii) u této látky. Vzorek byl změřen v  $\text{CDCl}_3$  při  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a následně při  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , čímž byla dodána energie vazbám pro překonání bariéry ve volné rotaci jednoduchých vazeb, která byla stericky blokována. Bohužel během tohoto experimentu se látka začala rozkládat; zároveň nebylo za daných podmínek dosaženo teploty koalescence, což bylo dáno vysokou energetickou bariérou a nízkou teplotou varu použitého deuterovaného rozpouštědla ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Obrázek 59** Alifatická část  $^1\text{H}$  NMR spektra **3a** měřená při  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a při  $50\text{ }^\circ\text{C}$

Molekuly, jejichž atomy vykazují ve spektrech rozdílné rezonance mají díky stericky objemným substituentům na dusíku omezenou rotaci. Projevují se pak jako diastereomery, ač molekula **3a** žádný chirální uhlík neobsahuje. Na obrázku 59 je zřejmé, že při vyšší teplotě jsou zdvojené signály methylových skupin spojeny do jednoho signálu. Obrázek 60 zobrazuje stejný trend u signálů tetrasubstituovaného aromatického jádra.

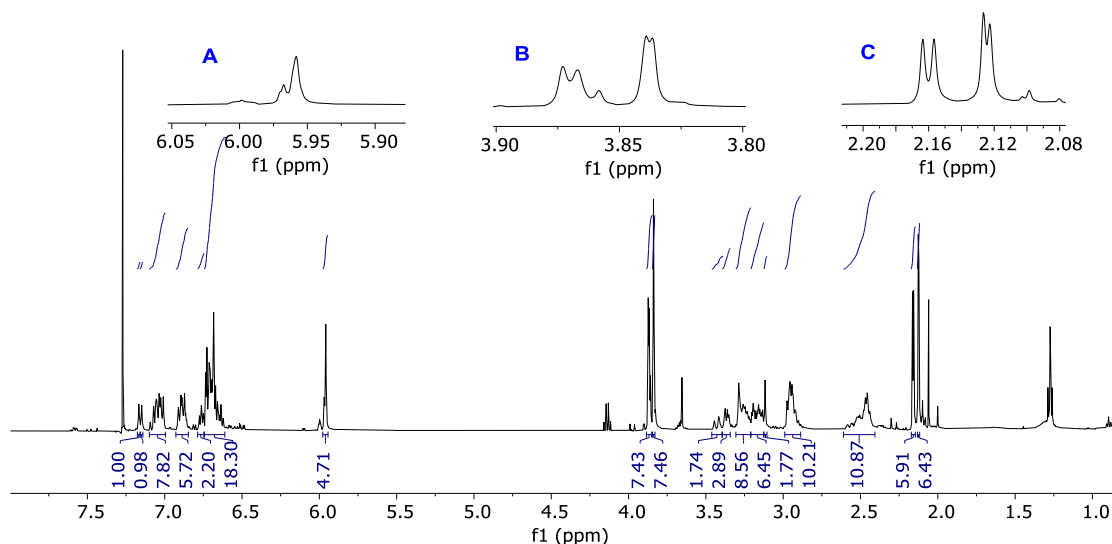


**Obrázek 60** Oblast vyšších rezonančních frekvencí části <sup>1</sup>H NMR spektra **3a** měřená při 25 °C a při 50 °C

Výsledky této identifikace byly prezentovány v práci Al Mamun a spol., kde tato molekula nese název karltonin C.<sup>53</sup>

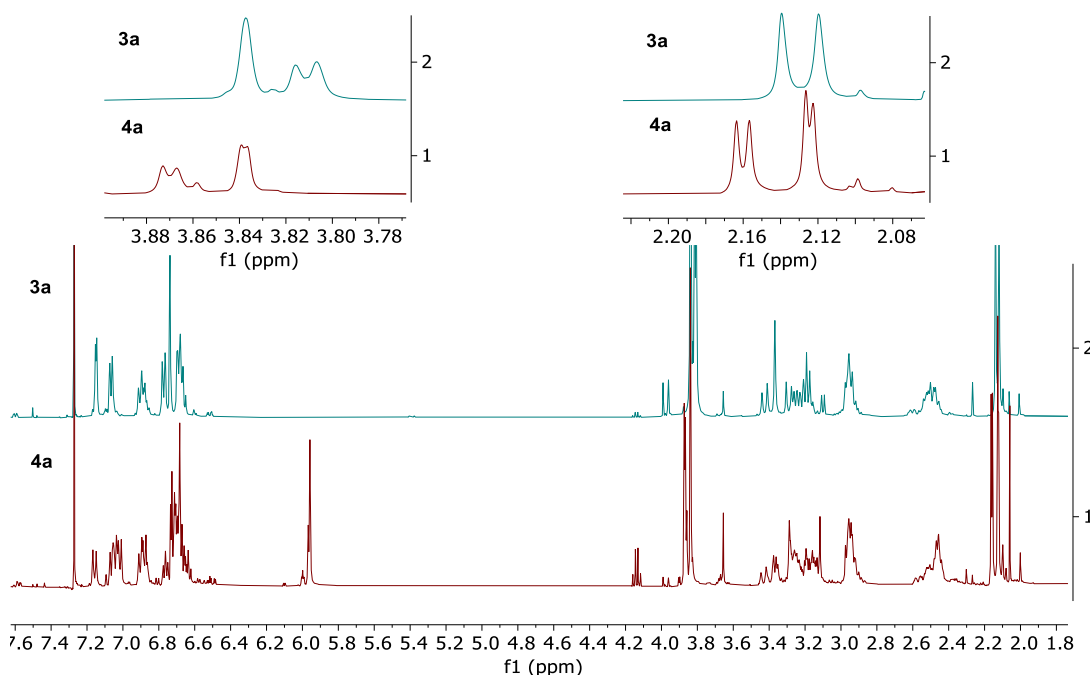
**U1A-A (4a)** $M_r = 683.9$ ;  $m = 6.0$  mg $C_{43}H_{45}N_3O_5$ 

Naměřené  $^1H$  NMR spektrum obsahovalo na první pohled signály alkaloidu s vyšší molekulovou hmotností spolu s dalšími nečistotami. Jak je patrné z obrázku 61, většina signálů se překrývala, ale rezonance některých protonů byly lépe oddělené a navíc zdvojené. To je dobře zřetelné zejména na signálech methylových skupin přiblížených oblastí. Nabízelo se tedy, že vzorek obsahuje diastereomery molekuly **4a**.



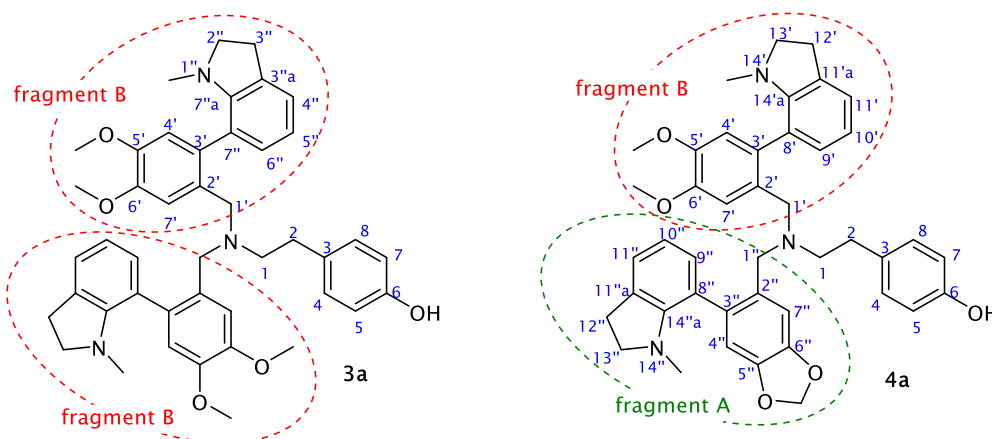
**Obrázek 61**  $^1H$  NMR spektrum vzorku U1A-A s přiblíženými signály charakteristických chemických posunů: (A) methylenedioxy skupiny, (B) methoxy skupin, (C) *N*-methylových skupin

Již pouhé porovnání  $^1H$  NMR spektra látky **3a** a **4a** odhalilo strukturální podobnost těchto látek, viz obrázek 62. Největší odlišnost byla v přítomnosti signálu methylenedioxy skupiny a čtyř signálů *N*-methylové skupiny.



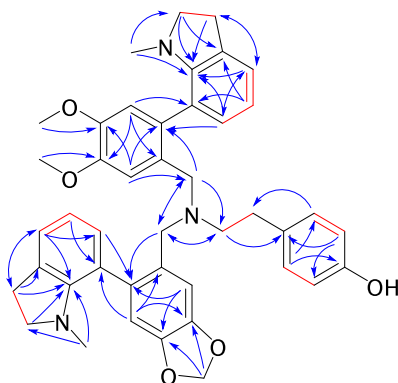
**Obrázek 62**  $^1H$  NMR spektra alkaloidů **3a** a **4a**, ve kterých jsou přiblíženy signály methylových skupin

Krospíky v HMBC spektrech byla lokalizována CH<sub>2</sub> skupina methylenedioxy uskupení na jednom z fragmentů *N*-(methylindolin-7-yl)fenylmethylu (**fragment A**). Druhý identifikovaný fragment byl pak shodný s fragmenty 4,5-dimethoxy-2-(*N*-methylindolin-7-yl)fenylmethylu (**fragment B**) v látce **3a**. Oba tyto substrukturální fragmenty byly vázány na dusík, což je prokázáno mimo jiné i chemickým posunem C1' ( $\delta$  55.93, 55.04) a C1'' ( $\delta$  55.21). Třetím substituentem terciárního dusíkové atomu bylo přes ethylenový můstek vázané *p*-hydroxyfenylové jádro, opět shodně s **3a**. Velice podobné chemické posuny vodíků a uhlíků obou diastereomerů znesnadňovaly objasnění umístění jednotlivých skupin ve struktuře. Zejména skupiny v indolinovém fragmentu nebylo možné odlišit, jak pro každý z diastereomerů, tak pro fragment A a fragment B. Rozdíl ve struktuře, kvůli kterému bylo za potřebí zvolit i jiné číslování, znázorňuje obrázek 63.



**Obrázek 63** Struktura látek **3a**, obsahující dva **fragmenty B** vázané na centrální terciární dusíkový atom, a **4a**, která obsahuje **fragment A** a **B** vázaný na centrální terciární dusíkový atom. Obě byly izolovány z *Narcissus pseudonarcissus* var. Carlton ve směsi atropoizomerů

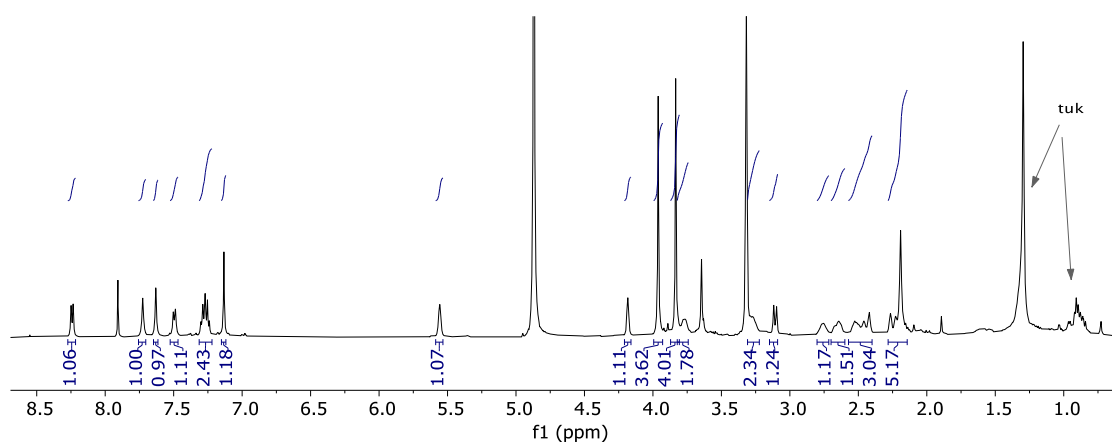
Pomocí 2D NMR experimentů byla objasněna nová struktura alkaloidu **4a**, viz obrázek 64.



**Obrázek 64** Znázornění korelací z HMBC a H2BC spekter na struktuře **4a**

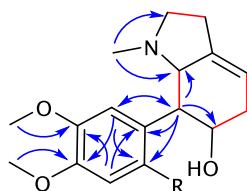
**U1c1 (5a)** $M_r = 432.5$ ;  $m = 12.0$  mg $C_{26}H_{28}N_2O_4$ 

Identifikovaná struktura **5a** měla opět v 1D NMR spektrech atypické rezonance pro obvyklé strukturní typy AA (zejména množství signálů v aromatické oblasti). V  $^1H$  NMR spektru byly identifikovány tři singlety ( $\delta_H$  7.73, 7.63, 7.13), odstíněný dublet s  $J$ -konstantou 7.7 Hz při  $\delta_H$  8.24, další dublet s  $J$ -konstantou 7.7 Hz ( $\delta_H$  7.49) a dva multiplety při  $\delta_H$  7.31–7.22 a 5.58–5.52. V alifatické části vodíkového spektra byl zobrazen multiplet *O*-methinové skupiny ( $\delta_H$  4.20–4.17), dva singlety methoxy skupiny ( $\delta_H$  3.96 a 3.83), jeden pro *N*-methylovou skupinu ( $\delta_H$  2.19), šest signálů diastereotopických vodíků a další dva signály. Veškeré popsání signálů lze nalézt na obrázku 65. V uhlíkovém spektru se objevila velice neobvyklá rezonance pro AA při  $\delta_C$  194.8, odpovídající rezonanci aromatického ketonu.



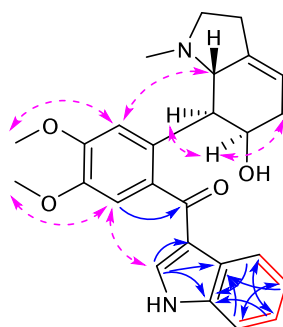
**Obrázek 65** Vodíkové spektrum látky **5a** měřené v deuterovaném methanolu

2D NMR experimenty umožnily určit fragment částečně nasyceného fenylindolu, viz obrázek 66. Některé očekávané korelace však chyběly. Například korelace mezi H6 a H7 nebyla v COSY experimentu nalezena, stejně jako jakákoli korelace v HMBC mezi pozicemi 3, 3a, 4, 5, 6. Nicméně byly nalezeny krospektry H5/H6 a H6/H7 v NOESY spektrech, což vypovídá o orientaci H6 a H7 na stejnou stranu. Absence interakce H7/H7a v prostoru a štěpení signálů těchto vodíků s  $J = 10.5$  Hz vypovídá v rámci částečně nasyceného kruhu o jejich *trans*-uspořádání.



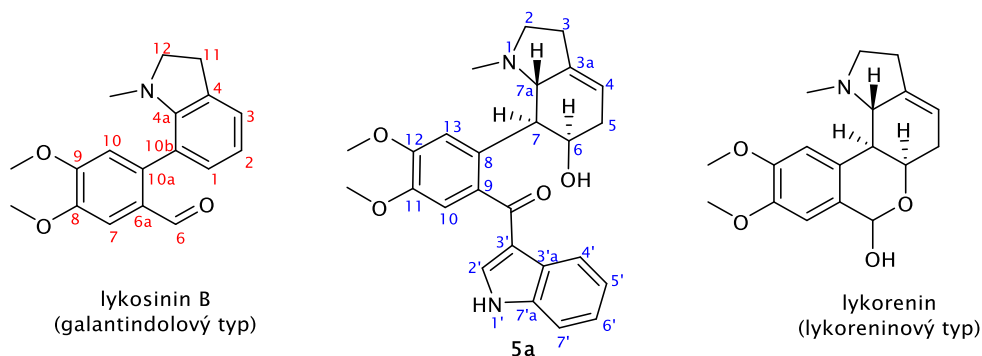
**Obrázek 66** HMBC, COSY a H2BC korelace ze spekter látky **5a**

Substituce v poloze 2 tetrasubstituovaného benzenového jádra byla objasněna korelací H10 na karbonylový uhlík (Obrázek 67). Keton byl dále vázán v poloze 3 indolového fragmentu, což bylo prokázáno korelacemi z HMBC, COSY, H2BC i NOESY spekter.



**Obrázek 67** HMBC, COSY, H2BC korelace zbývajícího fragmentu a korelace získané během NOESY experimentu zobrazena na struktuře molekuly **5a** s představenou relativní konfigurací

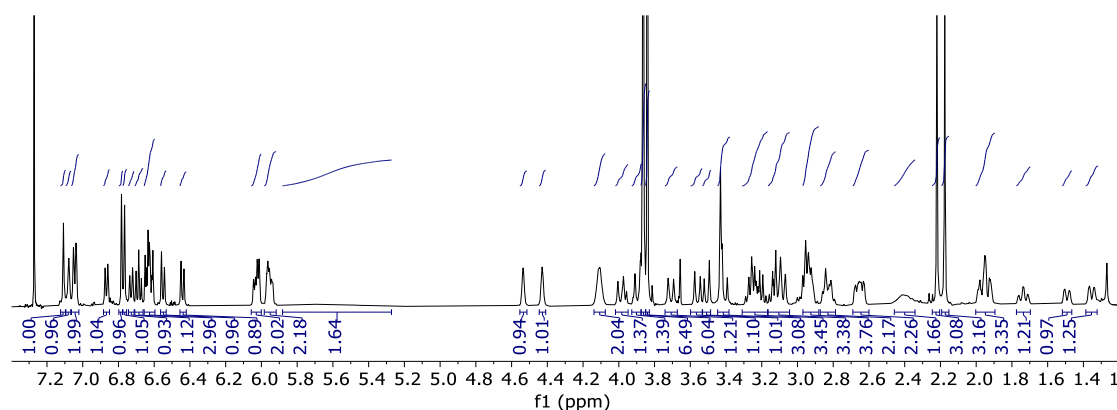
Vzhledem k tomu, že žádná podobná látka nebyla doposud izolována ani připravena, byl zvolen typ číslování, který neodpovídá biogenetické cestě, jak je například používáno u galantindolových alkaloidů (znázorněno na obrázku 68).<sup>65</sup> Jako základní skelet je určen 7-fenyl-2,3,5,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indol. Možným prekurzorem látky **5a** se jeví lykorenin, jehož isochromanový kruh s poloacetalovým uskupením je acidobazicky labilní.



**Obrázek 68** Na lykosininu B je demonstrováno číslování dle biosyntézy strukturně podobného galantindolového typu AA. Prostřední struktura patří popisované molekule **5a** se znázorněným použitým číslováním. Lykorenin je vyobrazen jako jeden z možných prekurzoru látky **5a**

**U2B (6a)** $M_r = 540.7$ ;  $m = 10.0$  mg $C_{33}H_{36}N_2O_5$ 

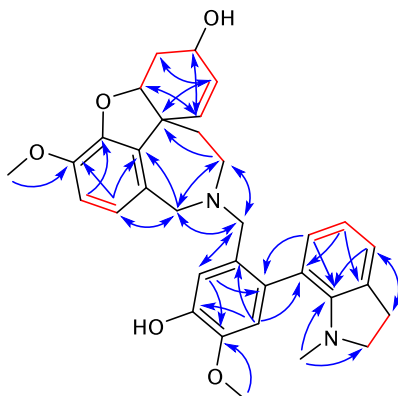
U vzorku U2B byla zjištěna neobvykle velká molekulová hmotnost látky  $M_r = 540$ , díky které bylo předpokládáno, že obsažená molekula má sudý počet dusíkových atomů. Po naměření  $^1H$  NMR spekter bylo zřejmé, že nepůjde o jednoduchou identifikaci (Obrázek 69). Na první pohled bylo patrné, že ve vzorku jsou dvě látky v poměru zhruba 1 : 1. Tento poznatek potvrdilo i  $^{13}C$  NMR spektrum. Vše nasvědčovalo o obsahu dvou diastereomerů.



**Obrázek 69**  $^1H$  NMR spektrum naměřené od vzorku U2B rozpuštěného v  $CDCl_3$

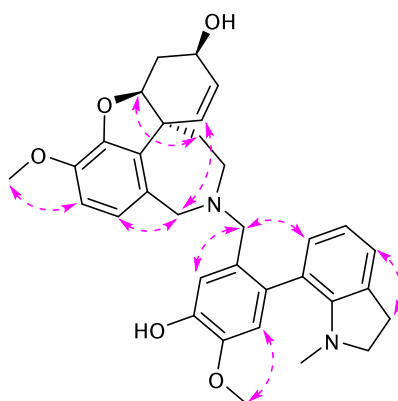
Naměřené 2D NMR experimenty umožnily určit komplikovanou strukturu látky **6a**. V HSQC spektrech byly přiřazeny jednotlivé vodíky uhlíkovým atomům. V některých případech nebylo možné jednoznačně přidělit signály každému ze stereoizomerů, a tím oddělit chemické posuny specifické pro obě z látek. Podařilo se určit konstituci heterodimerního alkaloidu.

Korelace v HMBC, COSY a H2BC pomohly identifikovat galantindolový strukturní fragment vázaný přes methylenový můstek navázaný na dusíkový atom tetrahydroazepinového kruhu galantaminového fragmentu. Obrázek 70 znázorňuje ty nejdůležitější korelace.



**Obrázek 70** Nejdůležitější korelace z HMBC, COSY, H2BC spekter vedoucí k identifikaci látky **6a**

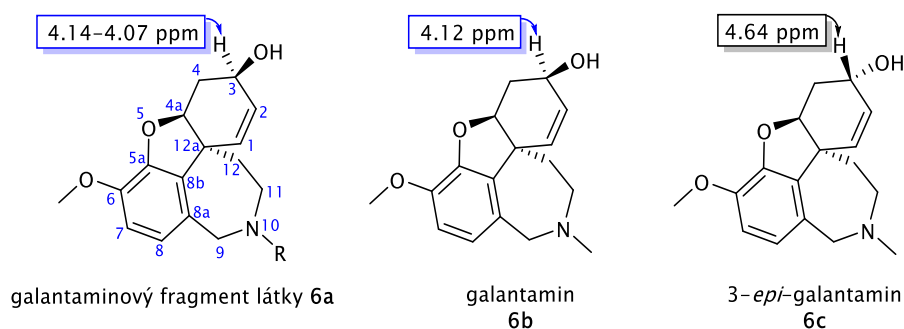




Obrázek 71 Nejdůležitější NOESY interakce vodíků heterodimerního alkaloidu **6a**

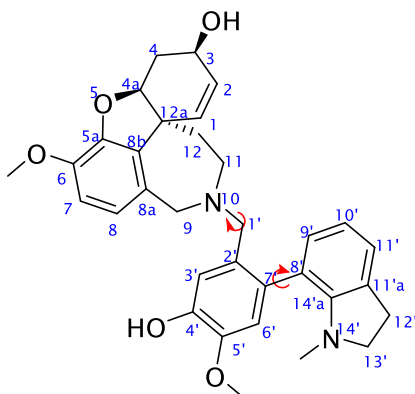
Pomocí krosníků v NOESY spektrech (Obrázek 71) a porovnáním posunů galantaminu a jeho C3-epimeru byla určena relativní konfigurace. Metoda porovnávání byla zahrnuta kvůli chybějící korelaci H3/H4a. Největší rozdíl v chemických posunech  $^{13}\text{C}$  atomů byl patrný na C2/C3/C4, a právě atomu H3 pocházejícího z jednoho ze stereocenter.<sup>143</sup>

**Tabulka 3-1** Porovnání posunů  $^{13}\text{C}$  signálů fragmentu látky **6a** (chemické posuny izomerů zprůměrovány pro přehlednost), galantaminu a 3-*epi*-galantaminu (považován za izolační artefakt). Nejvýznamnější rozdíly uhlíkových posunů kolem pozice 3. Dále je na strukturách zobrazen důležitý posun H3 signálu porovnávaných látek, kdy v případě **6a** a **6b** je vodík orientován axiálně (nižší ppm), a pro **6c** pak ekvatoriálně (vyšší ppm)<sup>143</sup>



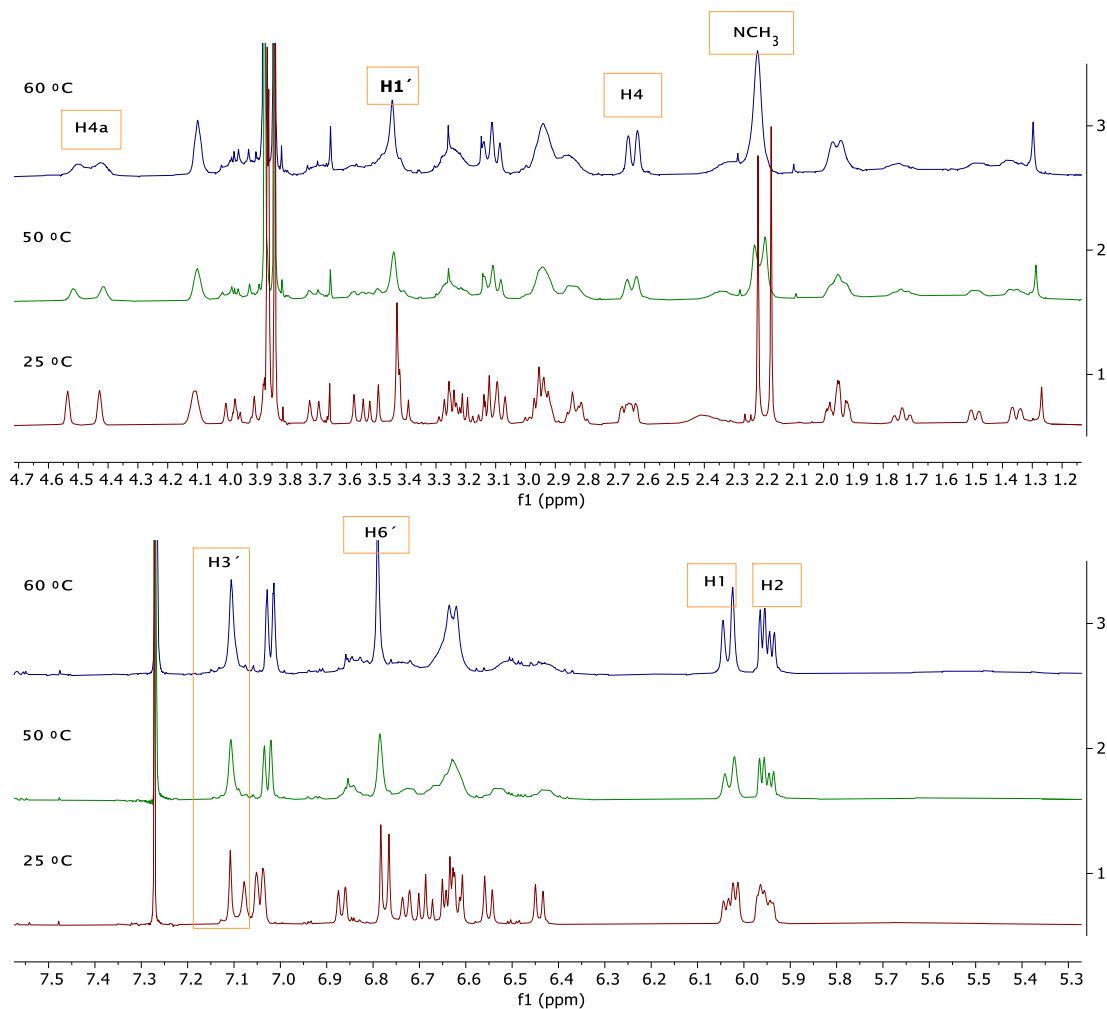
pozice	fragment <b>6a</b>	<b>6b</b>	<b>6c</b>
1	127.3	126.7	126.3
2	127.3	127.4	131.9
3	62.1	61.7	63.1
4	29.9	29.8	32.4
4a	88.7	88.4	88.4
5a	145.7	145.7	146.8
6	143.9	143.8	144.1
7	111.1	111.1	111.1
8	121.9	121.7	121.6
8a	130.3	129.2	128.4
8b	133.3	132.8	132.9
9	58.3	60.3	60.2
11	51.6	53.6	53.9
12	34.4	33.6	34.1
12a	48.3	47.9	48.1
6-OCH <sub>3</sub>	56.0	55.7	55.9
NCH <sub>3</sub>	-	41.9	41.6

Oříškem bylo vysvětlení původu zdvojení některých signálů. Protože rozdíly v chemických posunech  $^{13}\text{C}$  signálů nebyly příliš velké, nebyla pravděpodobná jiná orientace substituentů chirálních uhlíků. Významné rozdíly mezi izomery byly patrné v  $^1\text{H}$  spektrech v hodnotách rezonancí vodíků (pro H4a je to 54.0 ppm), tvar signálu zůstával ve většině případů zachován až na  $\text{CH}_2$  skupinu ( $\text{C}1'$ ) napojenou na dusík azepinového jádra galantaminu. Tento methylenový můstek měl pro jeden z izomerů tvar singletu ( $\delta_{\text{H}}$  3.43) a pro druhý z nich, pak byly ve spektru dva diastereotopické signály se skalární interakcí velikosti 13.7 Hz.



**Obrázek 72** Identifikovaná struktura s naznačenými sigma vazbami (červené šipky), které mají pravděpodobně omezenou rotaci a stojí tak za vznikem prokázané atropoizomerie látky **6a**. Obrázek také představuje použité číslování pro tento heterodimerní alkaloid, kde hlavním skeletem je galantaminový fragment, na nějž je přes methylenový můstek navázán galantindolový skelet

Všechny tyto indicie podporovaly domněnku, že velikost substituentů omezuje rotaci kolem sigma vazeb a vznikají tak optické izomery s osovou chiralitou. Atropoizomerie byla již u struktur s diazepinovým a fenylindolovým uskupením pozorována.<sup>42</sup> Byl proto proveden teplotní experiment, kdy byl změřen  $^1\text{H}$  NMR experiment (pro zajímavost bylo měřeno i uhlíkové spektrum) látky **6a** při 25 °C, 50 °C a 60 °C (měřeno v  $\text{CDCl}_3$ ). Teploty koalescence bylo téměř dosaženo. Nicméně rezonance *O*-methinových H4a byly i při nejvyšší aplikované teplotě stále rozdílné, viz obrázek 73.



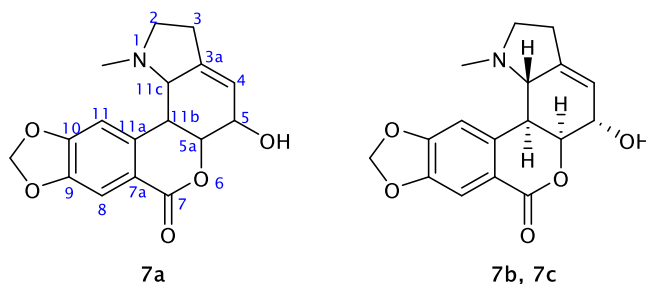
**Obrázek 73**  $^1\text{H}$  NMR spektrum (nahore alifatická oblast frekvencí, dole aromatická oblast spektra) zobrazující rozdílné rezonanční frekvence vodíků při teplotě 25 °C, 50 °C a 60 °C. Například methyly  $\text{NCH}_3$  měly ještě při 50 °C nesjednocenou rezonanci, a při zvýšení teploty o dalších deset stupňů Celsia se jejich signály spojily. Je patrné, že při nejvyšší použité teplotě je ve většině případů překonána energetická bariéra. Jen signály H4a jsou stále dobře rozeznatelné

Bohužel během analýzy při vyšší teplotě se látka **6a** začala rozkládat. Nicméně konstituce této molekuly byla i s relativní konfigurací určena. Fenomén osové chiralitě byl objasněn jako původce signálů diastereomerů v NMR spektrech. Jednotlivé signály se nepodařilo přiřadit jednotlivým stereoizomerům kvůli častým překryvům.

**U1c2 (7a)** $M_r = 315.3$  (volná báze);  $m = 15.0$  mg $C_{17}H_{17}NO_5$ 

Tento vzorek byl přijat do NMR laboratoře s predikcí struktury dle GC-MS jako hippeastrin, která se zdála být správná podle 1D NMR spekter. Referenční NMR data byla nalezena v několika článcích. První zmínku o  $^{13}C$  NMR chemických posunech uvádí Jeffs a spol.<sup>139</sup> Ze srovnání  $^{13}C$  chemických posunů **7b** v tabulce 3-2 jsou patrné rozdíly (C3a, C4, C11a, C11b). Článek Almanza a spol.<sup>144</sup> konfrontuje zmíněnou interpretaci s tím, že byly zřejmě zaměněny uhlíky C3a a C11a. Což sníží počet rozdílných posunů o víc jak 1ppm na C3a, C4 a C11b. Další ze článků zmiňující interpretace NMR dat hippeastrinu (nesprávně prý poprvé kompletní NMR studii pro tento alkaloid) uvádí bohužel pouze čtyři uhlíkové atomy z celkových 17.<sup>145</sup> Poslední a nejnovější (2013) ze článků s NMR daty hippeastrinu obsahuje tyto informace pouze ve formě neokótovaných spekter v doplňkovém materiálu, která se v takové formě použít nedají.<sup>146</sup>

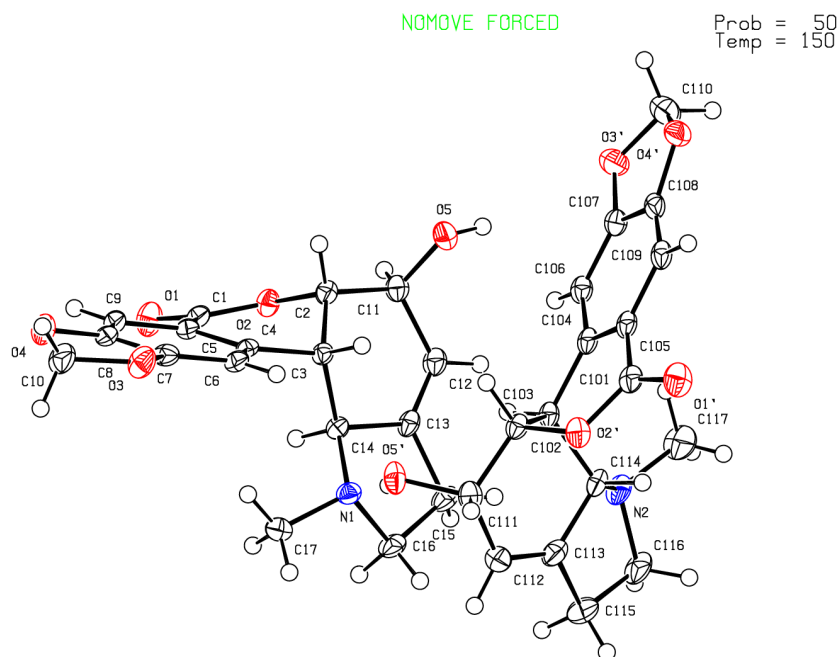
**Tabulka 3-2** Srovnání  $^{13}C$  chemických posunů a specifické otáčivosti získané látky **7a** a referenčních dat hippeastrinu **7b** a **7c**



pozice	<b>7a</b>	<b>7b</b> * <sup>139</sup>	<b>7c</b> <sup>144</sup>
2	56.0	56.0	55.9
3	27.8	27.7	27.3
<b>3a</b>	145.3	139.0	142.4
<b>4</b>	118.2	119.5	119.4
5	66.9	66.8	67.1
5a	82.3	82.2	82.2
7	164.7	164.7	165.0
7a	118.5	118.6	118.0
8	109.8	110.0	109.8
9	147.9	148.2	148.0
10	151.8	152.1	151.9
11	108.7	108.9	108.5
11a	139.4	143.4	138.8
<b>11b</b>	40.0	38.7	38.4
11c	67.1	67.4	67.1
-OCH <sub>2</sub> O-	102.1	102.3	102.1
NCH <sub>3</sub>	43.6	43.3	42.9
[α] <sub>b</sub>	+90.2 ° ( <i>c</i> = 0.35 g/100ml, CH <sub>3</sub> OH, 25 °C)	-	+142.0 ° ( <i>c</i> = 0.5, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, 22 °C)

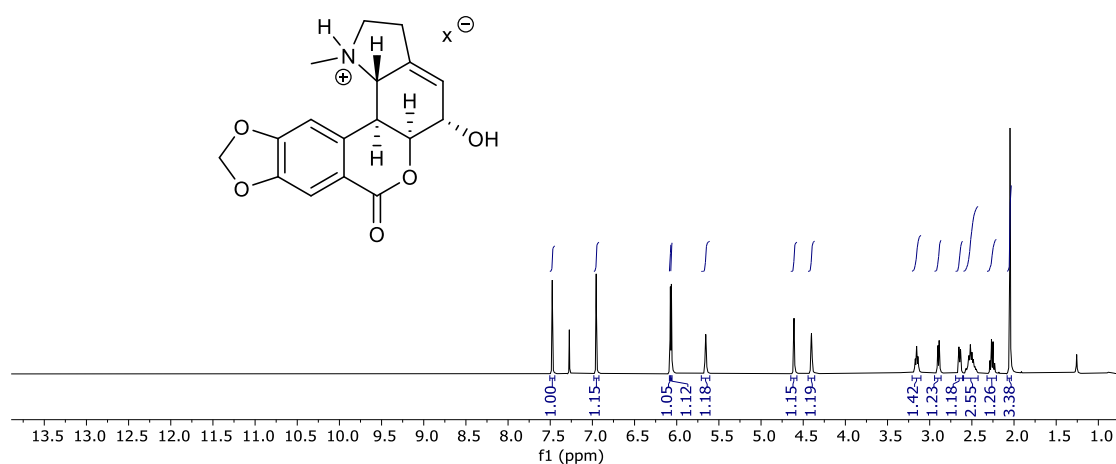
\* Jeffs a spol.<sup>139</sup> uvádí referencované spektrum na 76.9 ppm signálu CDCl<sub>3</sub>; pro srovnání byly tyto posuny navýšeny o hodnotu 0.1, protože interpretovaná spektra jsou referencována k 77.0 ppm pro CDCl<sub>3</sub>

Z důvodu nesrovnalostí získaných z referenčních  $^{13}\text{C}$  NMR dat byla provedena rentgenová strukturní analýza, jejíž výsledek potvrdil konstituci a konfiguraci dříve popsaného (5*S*,5*aS*,11*bS*,11*cS*)-hippeastrinu, viz obrázek 74. Výsledky rentgenové analýzy tohoto alkaloidu dosud prezentovány nebyly.



**Obrázek 74** Struktura molekuly **7a** s absolutní konfigurací získaná rentgenovou analýzou

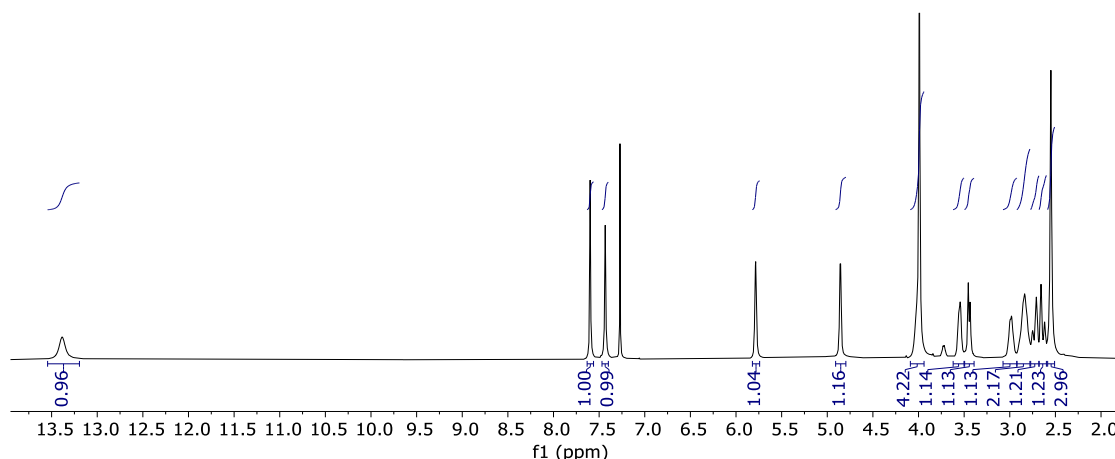
Jedním z důvodů odlišných  $^{13}\text{C}$  posunů by pak mohla být ionizovaná forma soli hippeastrinu. Proti této možnosti však hovoří  $^1\text{H}$  NMR spektrum (Obrázek 75). Není zde detekován typický signál vodíku hydrochloridu, a též odlišnosti v chemických posunech z tabulky 3-2 nejsou vázány k teoreticky ionizovanému terciárnímu dusíku tetrahydropyrrolového fragmentu, ale nachází se u uhlíků izolované dvojné vazby a  $\text{sp}^3$ -uhlíku benzylové pozice.



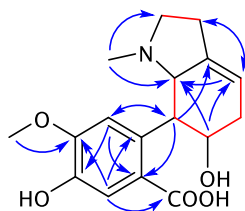
**Obrázek 75**  $^1\text{H}$  NMR spektrum **7a**

**Fw-2 other (8a)** $M_r = 319.4$ ;  $m = 12.0$  mg $C_{17}H_{21}NO_5$ 

Nejintenzivnější pík v ESI-MS spektru byl 302.2 odpovídající  $[M+H]^+$  pro molekulu 9-*O*-demethylhomolykorinu (shodné s látkou **9a** diskutovanou dále). Již z výsledků měření  $^1H$  NMR spekter byly patrné odlišnosti od referenčních signálů. Zejména pak široký singlet při 13.38 ppm typický pro vodík karboxylové skupiny nebo amoniové soli. Zajímavé je, že nebyl pozorován signál fenolického ani alkoholového vodíku, viz obrázek 76.

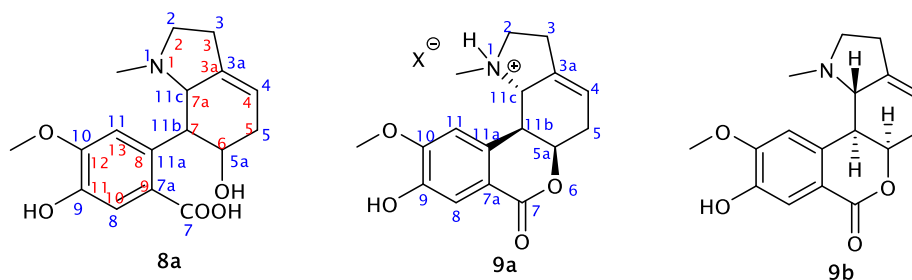
**Obrázek 76** Vodíkové spektrum vzorku **8a**

Rezonance v  $^{13}C$  NMR spektrech opět vykazovaly výrazné odlišnosti od těch uvedených u anorganické soli **9a** 9-*O*-demethylhomolykorinu, viz tabulka 3-4. HSQC experiment pomohl přiřadit jednotlivé vodíky k jejich uhlíkům. Experimenty interakcí přes více vazeb osvětlily konstituci molekuly, která je zobrazena na obrázku 77.

**Obrázek 77** Významné korelace přes více vazeb z **HMBC**, **COSY**, **H2BC** experimentů látky **8a**

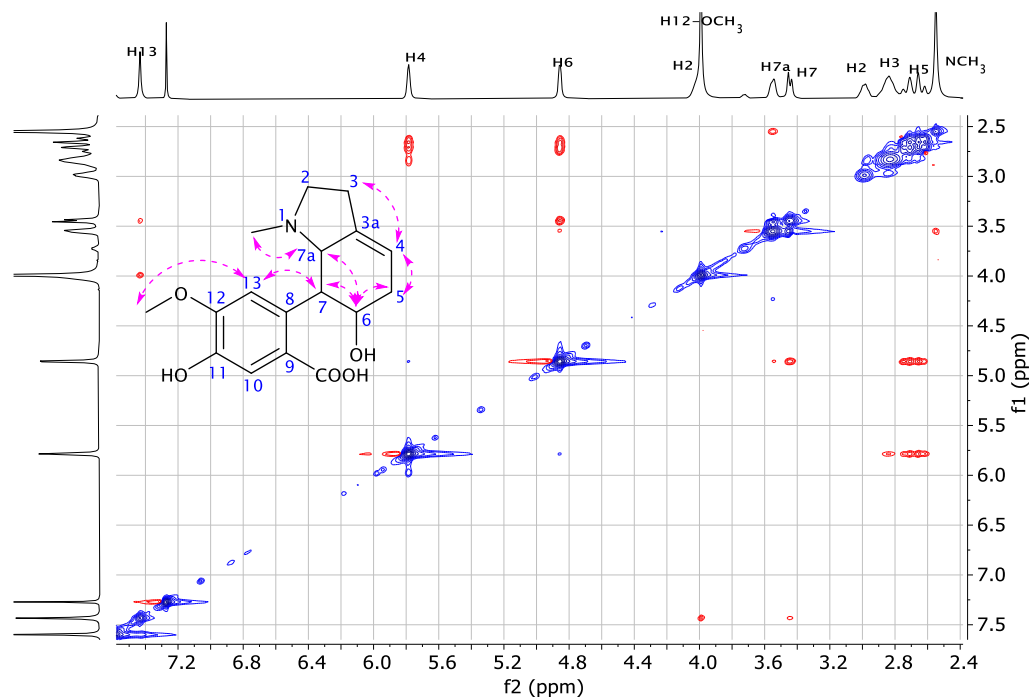
Velmi zajímavý byl výsledek z GC-MS analýzy. Neboť nebyl detekován molekulový pík, ale pouze pík odpovídající eliminaci sekundární hydroxy skupiny a uzavření laktonového kruhu během hmotnostní analýzy, tedy odpovídající konstituci 9-*O*-demethylhomolykorinu ( $M_r = 301.3$ ). Proto byla porovnána NMR spektra látky **8a** s 9-*O*-demethylhomolykorinem **9b**, a také s látkou **9a** (Tabulka 3-3). Výsledkem porovnání bylo potvrzení rozdílných  $^{13}C$  chemických posunů pro známý alkaloid **9b** a **8a**. Největší rozdíl se pak nachází na uhlících C3a a C4. Vzhledem ke struktuře **8a** by bylo možné předpokládat větší rozdíly posunu karbonylového uhlíku laktonu a karboxylové kyseliny, a taktéž výraznější rozdíl v chemických posunech skupiny OCH.

**Tabulka 3–3** Porovnání posunů signálů v  $^{13}\text{C}$  NMR spektru **8a** s homolykorinovým typem alkaloidu **9a** a **9b**<sup>139</sup>, které budou více diskutovány dále. Červeně je použito číslování pro strukturu **8a** a modře je znázorněno číslování odpovídající homolykorinovému skeletu pro jednodušší interpretaci rozdílů pro **8a**, **9a**, **9b**



pozice	<b>8a</b>	<b>9a</b>	<b>9b</b> <sup>139</sup>
2	55.7	56.1	56.3
3	27.0	27.6	27.7
<b>3a</b>	133.1	137.5	139.7
<b>4</b>	120.8	117.3	116.2
5	30.8	31.0	31.3
<b>5a</b>	76.1	77.2	77.3
7	164.7	165.2	165.5
<b>7a</b>	116.8	117.8	117.7
8	116.3	116.1	116.0
9	146.5	146.1	145.8
10	151.7	151.3	150.9
11	110.5	110.5	110.6
11a	132.8	135.2	136.3
<b>11b</b>	38.7	41.8	43.2
<b>11c</b>	68.6	67.3	66.8
NCH <sub>3</sub>	42.7	43.2	43.4
10-OCH <sub>3</sub>	56.6	56.4	56.5

Relativní konfigurace **8a** určená pomocí nepřímé spin-spinové interakce chirálních center by odpovídala stereochemii látky **9a** a **9b**. Avšak v NOESY i ROESY spektrech je vidět výrazný krosppík H5a/H11b a slabý krosppík H5a/H11a. Přičemž interakční konstanty a štěpení byly  $J_{\text{H5a}} = 4.9$  Hz širokého signálu (patrně interakce s H5),  $J_{\text{H11b}} = 10.0$  Hz a  $J_{\text{H11c}} = 10.0$  Hz (tento dublet není příliš ostrý). Sledování prostorové interakce H11b/H11c je opět zatíženo podobnými rezonancemi těchto vodíků, viz obrázek 78. Nicméně krosppík H5a/H11b je dobře pozorovatelný. Zajímavá je také interakce H11/H11b, neboť typicky je u homolykorinových alkaloidů (**9a**, **9b**) pozorována korelace tohoto aromatického vodíku H11 s vodíkem H11c *N*-methinové skupiny, nikoli s H11b.



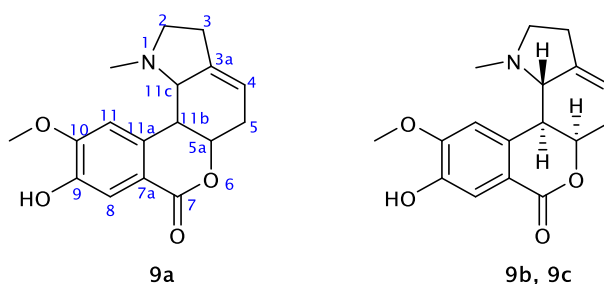
**Obrázek 78** Zobrazené **korelace** na identifikované struktuře **8a** z představeného NOESY spektra. Zde použité číslování bylo zvoleno s ohledem na číslování galantindolového strukturního typu, nikoli homolykorinového



**Fw-2 (9a)**M<sub>r</sub> = 301.3 (volná báze); m = 17.0 mgC<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>

Ke vzorku Fw-2 byla získána predikce struktury 9-*O*-demethylhomolykorinu **9b**, **9c**. <sup>1</sup>H NMR spektrum toto tvrzení podporovalo, avšak chemické posuny některých <sup>13</sup>C signálů nekorelovaly s udávanými hodnotami v literatuře (podobného charakteru s rozdíly posunů v uhlíkovém spektru látky **8a**).<sup>139, 147</sup> Byla provedena měření jak v CDCl<sub>3</sub>, tak v CD<sub>3</sub>OD a chemické posuny uhlíkových signálů obou variant vykazovaly odchylky, viz tabulka 3-4.

**Tabulka 3-4** Porovnání chemických posunů signálů v <sup>13</sup>C NMR spektru látky **9a** a 9-*O*-demethylhomolykorinu měřeném v CDCl<sub>3</sub> **9b**<sup>139</sup> a v CD<sub>3</sub>OD **9c**<sup>147</sup>. Tučně označené jsou posuny signálů s rozdílem větším než 1 ppm

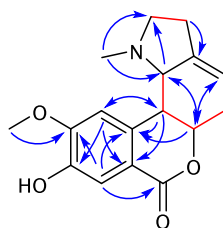


pozice	měřeno v CDCl <sub>3</sub>		měřeno v CD <sub>3</sub> OD	
	<b>9a</b>	<b>9b*</b>	<b>9a</b>	<b>9c</b>
2	56.1	56.3	57.1	57.3
3	27.6	27.7	28.1	28.6
<b>3a</b>	137.5	139.7	138.4	141.3
<b>4</b>	117.3	116.2	119.1	117.9
5	31.0	31.3	32.0	32.1
5a	77.2	77.3	78.8	79.2
7	165.2	165.5	167.5	167.9
7a	117.8	117.7	118.0	117.1
8	116.1	116.0	117.3	116.9
9	146.1	145.8	148.3	147.9
10	151.3	150.9	154.0	153.8
11	110.5	110.6	112.0	112.3
<b>11a</b>	135.2	136.3	136.4	137.7
<b>11b</b>	41.8	43.2	42.5	43.7
11c	67.3	66.8	68.6	68.0
NCH <sub>3</sub>	43.2	43.4	42.8	44.1
10-OCH <sub>3</sub>	56.4	56.5	56.8	56.8

\* Jeffs a spol.<sup>139</sup> uvádí referencované spektrum na 76.9 ppm signálu CDCl<sub>3</sub>; pro srovnání byly tyto posuny navýšeny o hodnotu 0.1, protože interpretovaná spektra jsou referencována k 77.0 ppm

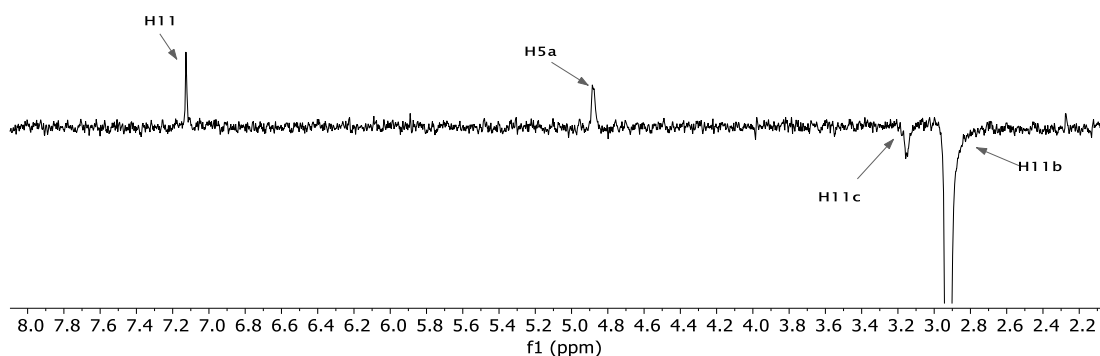
Latvala a spol.<sup>147</sup> ve svém článku popisují jak 1D NMR spektra (<sup>1</sup>H NMR spektra v CDCl<sub>3</sub> a <sup>13</sup>C NMR spektra v CD<sub>3</sub>OD), tak rentgenovou analýzu, pomocí které potvrdili (5a*R*\*,11b*S*\*,11c*S*\*)-konfiguraci (+)-9-*O*-demethylhomolykorinu s  $[\alpha]_D^{22} = +99.0^\circ$  (*c* = 0.22, CH<sub>3</sub>OH). Krystaly získané z různých rozpouštědel se lišily konfigurací methylu a volného elektronového páru na pyrrolidinovém dusíku.

Došlo tedy na 2D NMR experimenty, jejichž detekované korelace potvrzovaly konstituci predikovaného alkaloidu. Korelace *O*-methinového vodíku na laktonový uhlík chyběla, což je typické pro přenos interakcí na laktonovém kruhu.

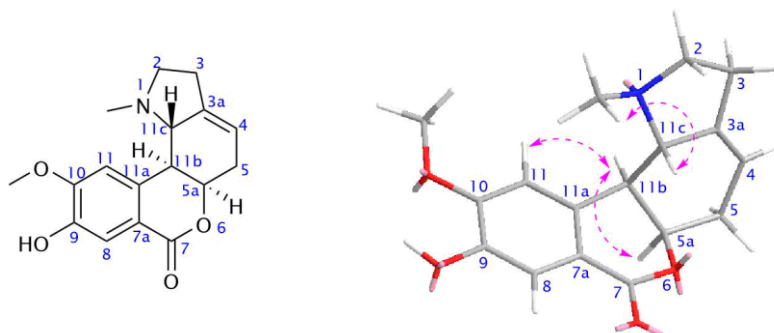


**Obrázek 79** Významné korelace **9a** pozorované v **HMBC**, **H2BC** a **COSY** experimentech

Nabízelo se, že by se mohlo jednat o epimer na C11b a/nebo C11c (detekované rozdíly v posunech  $^{13}\text{C}$  NMR spekter, viz tabulka 3-4). Byla proto provedena analýza 1D NOESY experimentem s různým směšovacím časem. Bohužel jak je vidět na obrázku 80, nebylo možné ozářit pouze vybraný vodík H11c nebo H11b, protože jejich rezonance měly příliš podobnou frekvenci. S ohledem na velikost štěpení těchto dvou signálů, která měla hodnotu  $J = 10.1$  Hz v porovnání s literaturou  $J = 9.7$  Hz, byla potvrzena pseudodiaxiální orientace těchto vodíků, tedy shodná s publikovaným alkaloidem.<sup>147</sup> Silverstein uvádí pro diaxiální uspořádání vodíků interakční konstantu v rozmezí 6–14 Hz.<sup>13</sup>

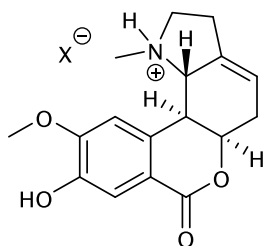


**Obrázek 80** 1D NOESY spektrum iradiace vodíku H11b se použitým směšovacím časem 500 ms, kde je zjevně zahrnuta i možná interakce H11c



**Obrázek 81** Důležité **NOESY** korelace potvrzující ( $5aR^*$ ,  $11bS^*$ ,  $11cS^*$ )-konfiguraci

Díky všem těmto důkazům bylo nakonec určeno, že látka **9a** byla měřena ve formě soli (Obrázek 82). I proto měla získaná spektra v  $\text{CDCl}_3$  výrazně horší rozlišení než ta měřená v roztoku  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



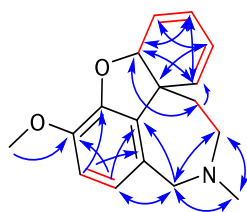
**Obrázek 82** Ionizovaná forma 9-*O*-demethylhomolykorinu identifikovaná ve vzorku FW-2

Specifická optická otáčivost měřená v  $\text{CH}_3\text{OH}$  měla hodnotu  $+71.5^\circ$  ( $c = 0.24 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ), která koreluje s publikovanou hodnotou.<sup>147</sup>

**FAI-3-1-4b (10a)** $M_r = 269.3$  (volná báze);  $m = 3.5$  mg $C_{17}H_{19}NO_2$ 

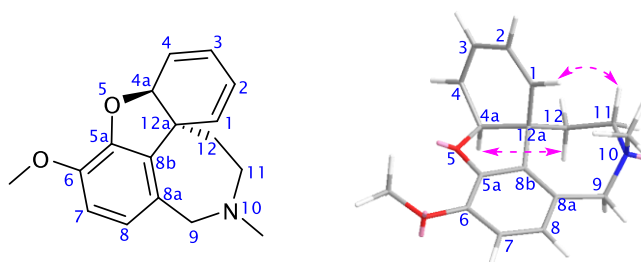
Tato látka byla získána bez předpovězení struktury nebo strukturního typu AA, ale se správnou molekulovou hmotností. Podle  $^1H$  NMR spektra bylo zjištěno, že v aromatické oblasti spektra se nachází široký singlet odpovídající dvěma vodíkům, čtyři vodíkové signály s charakteristickým štěpením pro 1,2-disubstituované jádro a velmi odstíněný dublet *O*-methinové skupiny; v alifatické části bylo detekováno šest vodíků diastereotopických  $CH_2$  skupin, jedna methoxy skupina, jeden *N*-methyl a znečištění vyššími mastnými kyselinami. Uhlíkové spektrum nemělo příliš dobré rozlišení, ale k identifikaci bylo dostačující.

2D NMR experimenty umožnily určení galantaminového strukturního typu molekuly (Obrázek 83).



**Obrázek 83** Důležité korelace přes více vazeb z **HMBC**, **COSY** a **H2BC** experimentů

Ze spekter NOESY experimentu bylo možné určit relativní konfiguraci. Výrazné krosplíky vodíků H12 s H4a *O*-methinovým vodíkem hovoří o orientaci na stejnou stranu v rámci molekuly a krosplík H1/H11 tuto skutečnost dále potvrzuje, jak lze vidět na obrázku 84. Konfigurace je v souladu s udávanou na chirálních centrech popisovaných u galantaminu (4a*S*<sup>\*</sup>, 12a*S*<sup>\*</sup>).



**Obrázek 84** **NOESY** korelace, které pomohly určit relativní konfiguraci látky **10a** (4a*S*<sup>\*</sup>, 12a*S*<sup>\*</sup>)

V literatuře je možné nalézt pro látku **10a** hned několik názvů: 3,4-anhydrogalantamin,<sup>53, 148</sup> 3,4-didehydro-3-deoxygalantamin,<sup>149</sup> 3-methoxy-11-methyl-9,10,11,12-tetrahydro-4a*H*-benzo[2,3]benzofuro[4,3-*cd*]azepin.<sup>150</sup> Pouze článek Hana s spol.<sup>149</sup> uvádí alespoň vodíkové NMR spektrum, které však není v úplné shodě s naším (největší rozdíly jsou tučně označeny v následujícím odstavci). Je možné, že v našem případě byla opět měřena sůl tohoto alkaloidu, a proto jsou ve spektrech rozdíly.

Han a spol.:<sup>149</sup> bez přiřazení

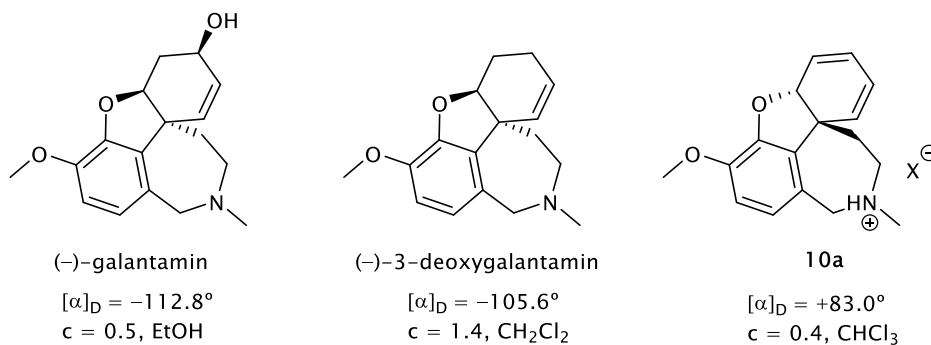
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.59 (2H, s), 6.25 (1H, dd,  $J = 9.5$  Hz,  $J = 5.4$  Hz), 6.16 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz), 6.02 (1H, dd,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 5.4$  Hz), 6.01 (1H, dd,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 5.4$  Hz), 4.81 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz), 4.17 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.83 (3H, s), 3.67 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.35 (1H, m), 3.02 (1H, br d,  $J = 14.4$  Hz), 2.39 (3H, s), 2.00 (1H, m), 1.67 (1H, br d,  $J = 11.2$  Hz)

NMR data vzorku **10a**:

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.63 (2H, bs, H7, H8), 6.28 (1H, dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.3$  Hz, H3), 6.12 (2H, dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.3$  Hz, H1, H4), 6.05 (1H, dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.3$  Hz, H2), 4.84 (1H, d,  $J = 5.3$  Hz, H4a), 4.30 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, H9), 3.85 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, H9), 3.47 (1H, t,  $J = 13.5$  Hz, H11), 3.13 (1H, d,  $J = 13.5$  Hz, H11), 2.47 (3H, s, N10-CH<sub>3</sub>), 2.04 (1H, t,  $J = 13.5$  Hz, H12), 1.76 (1H, d,  $J = 13.5$  Hz, H12).

Spektra lepší kvality byla získána měřením v methanolu-*d*<sub>6</sub> a jsou uvedena v Experimentální části této práce.

Naměřená specifická otáčivost látky **10a** vykazovala hodnotu +83.0° ( $c = 0.40$  g/100 ml, CHCl<sub>3</sub>, 25 °C). Porovnání s publikovaným (–)-galantaminem, jehož  $[\alpha]_D$  je –112.8° ( $c = 0.50$ , EtOH),<sup>151</sup> není úplně vhodné, neboť obsahuje o jedno chirální centrum navíc. Pro (–)-3-deoxygalantamin (který se strukturně velice blíží **10a**) získaný enantioselektivní syntézou byla naměřena také záporná optická otáčivost –105.6° ( $c = 1.40$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).<sup>151</sup> Z tohoto důvodu lze považovat orientaci stereocenter látky **10a** za opačnou než je udáváno pro (–)-galantamin a (–)-3-deoxygalantamin. Tedy (4*aR*, 12*aR*)-izomer jak je představeno na obrázku 85. Tuto domněnku by však bylo potřeba potvrdit rentgenovou analýzou.



**Obrázek 85** Pravděpodobná absolutní konfigurace terciární amoniové soli identifikované ve vzorku **10a** a molekuly zmíněných (–)-galantaminu a (–)-3-deoxygalantaminu se zobrazenými hodnotami  $[\alpha]_D$

U tohoto galantaminového derivátu je předpokládáno, že se jedná o produkt kyselě katalyzované eliminace vody z molekuly galantaminu během zpracování.<sup>65</sup>

### 3.2 Látky izolované ze *Zephyranthes citrina* Baker

Představované alkaloidy byly získány v rámci fytochemické práce na *Zephyranthes citrina* Baker, která byla provedena Mgr. Eliškou Kohelovou. Některé dílčí výsledky již byly publikovány.<sup>152</sup>

Za použití NMR spektroskopie bylo identifikováno sedm molekul dosud nepopsaných alkaloidů **11a–17a**. V případě **11a**, **12a**, **13a** se jedná pravděpodobně o izolační artefakty. Pro látky **18a–20a** jsou známy vodíkové posuny v NMR spektru, avšak nejsou dostupná <sup>13</sup>C NMR spektra a bylo tedy nezbytné tyto molekuly identifikovat pomocí 2D NMR analýzy.

Struktura dalších 13 známých látek byla ověřena ať už 1D nebo i 2D NMR experimenty, které potvrdily shodu s referenčními spektry v dostupné literatuře. Jedná se o následující dobře známé alkaloidy, které jsou rozříděné podle strukturních skupin AA:

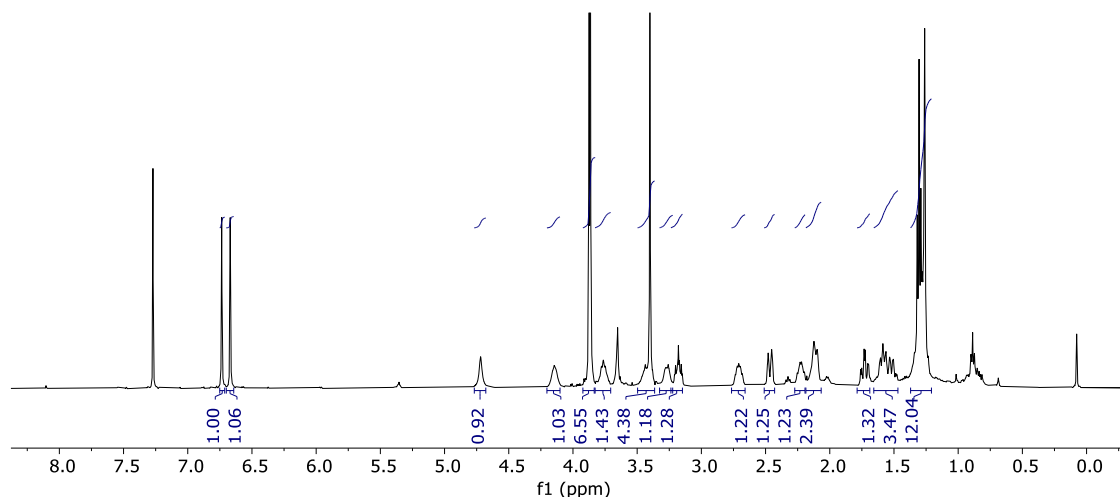
- galantaminový typ:  
(+)-lykoramin;<sup>55</sup>
- krininový typ:  
(-)-buphanisin,<sup>153</sup> 10-deoxy-6-hydroxyhippeastidin,<sup>\*8</sup> 6-hydroxyhippeastidin;<sup>\*8</sup>
- haemanthaminový typ:  
(-)-haemanthidin,<sup>\*\*154</sup> (+)-8-*O*-demethylmaritidin,<sup>155</sup> (+)-maritidin,<sup>156</sup>  
(+)-vittatin;<sup>157</sup>
- homolykorinový typ:  
(+)-9-*O*-demethylhomolykorin;<sup>139</sup>
- lykoreninový typ:  
(+)-nerinin;<sup>158</sup>
- lykorinový typ:  
(-)-acetylkaranin,<sup>159</sup> (-)-9-*O*-demethylgalantin,<sup>160</sup> (+)-tortuosin.<sup>161</sup>

\* označené alkaloidy byly izolovány ve směsi C6-epimerů, které Berkov a spol.<sup>65</sup> řadí mezi krininové alkaloidy, což podle mého názoru není správné, neboť v práci Shitary a spol.<sup>8</sup> nebyla určena konfigurace absolutní, ale pouze relativní pomocí NMR spektroskopie. Další informace budou dále komentovány u derivátů tohoto alkaloidu **11a** a **12a**.

\*\* uvádění specifické otáčivosti je u haemanthidinu v literatuře je nevhodná, neboť tento alkaloid je izolován vždy ve směsi C6-epimerů. Je tedy měřena směs diastereomerů. Ten samý problém se objevuje u derivátů 6-hydroxyhippeastidinu.

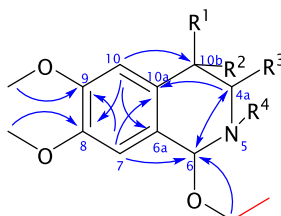
**ZC-F3-5 (11a)** $M_r = 347.5$ ;  $m = 9.5$  mg $C_{20}H_{29}NO_4$ 

$^1H$  NMR spektra bylo zjevné, že půjde o látku s 1,2,4,5-tetrasubstituovaným aromatickým jádrem (6.74, s; 6.66, s), třemi methoxy skupinami, ethoxy skupinou a blíže nespecifikovaným nasyceným spin-spinovým systémem, viz obrázek 86.



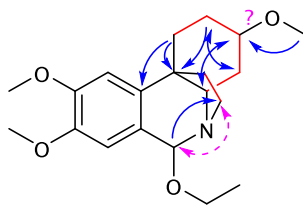
**Obrázek 86**  $^1H$  NMR spektrum vzorku ZC-F3-5, ve kterém jsou patrné obsažené nečistoty spolu se signály látky 11a

Pomocí HMBC spektra se podařilo identifikovat pozice jednotlivých atomů tetrahydroisochinolinového jádra. Uhlík *N*-methinové skupiny isochinolinového jádra koreloval s diastereotopickými vodíky  $CH_2$  skupiny ethylu ( $\delta_{H6}$  4.07, dq,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 7.1$  Hz; 3.70, dq,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 7.1$  Hz) navázané přes kyslíkový atom na tento uhlík. Jeho odstíněná rezonance  $\delta_{C6}$  94.7 byla v souladu se substitucí jak dusíkovým, tak kyslíkovým atomem a vazbou na aromatické jádro. Tento benzylový vodík ( $\delta_H$  4.61, s) dále interagoval s uhlíkem *NCH* skupiny  $\delta_{C4a}$  60.1, jehož posun odpovídal substituci dusíkem, a měl korelaci přes tři vazby na  $sp^2$  kvarterní uhlík benzenového jádra. Následně byl identifikován krospek vodíku benzenového jádra ( $\delta_H$  6.66, s) a kvarterního uhlíku s chemickým posunem  $\delta_{C10b}$  42.0, viz obrázek 87.



**Obrázek 87** Znázorněné HMBCa COSY korelace fragmentu látky 11a

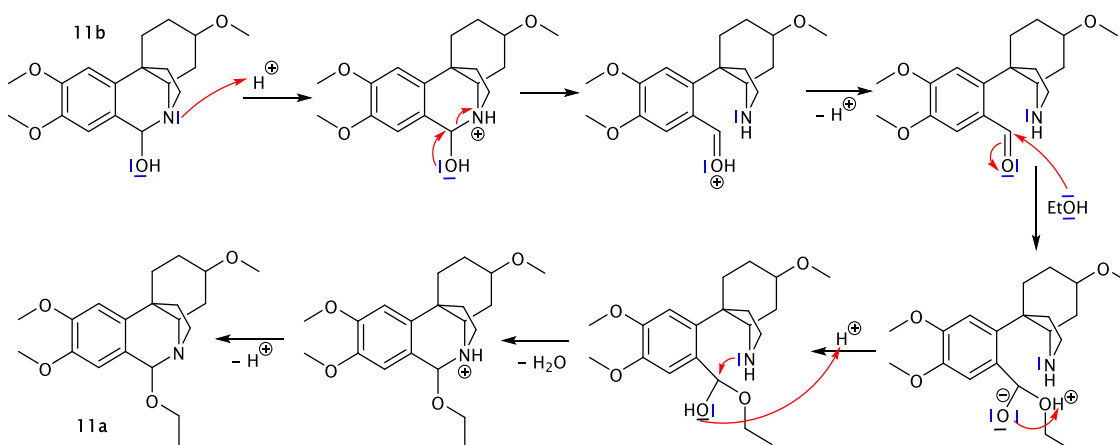
Ethylenový můstek navázaný mezi  $N5$  a  $C10b$  byl identifikován COSY korelacemi diastereotopických vodíků, jejich skalárními interakcemi a korelacemi v HMBC spektru. Cyklohexanový kruh byl prokázán pomocí H2BC, HMBC a COSY experimentů, jak je ilustrováno na obrázku 88.



**Obrázek 88** Znázorněné HMBC, COSY a H2BC korelace a NOESY korelace látky **11a**

Vzhledem k tomu, že se posuny chirálních vodíků ve spektru překrývaly, nebyla zcela identifikována konfigurace molekuly. Podařilo se alespoň určit, že ethylenový můstek je orientován na opačnou stranu než ethoxy substituent pomocí krosplíku vodíku poloaminalethyletherové skupiny ( $\delta_{\text{H}}$  4.61) a diastereotopického vodíku  $\text{NCH}_2$  skupiny ethylenového můstku ( $\delta_{\text{H}}$  2.66) v NOESY experimentu (Obrázek 88).

Zajímavá je právě ethylová substituce poloaminaletherové skupiny. Že se pravděpodobně jedná o izolační artefakt, lze snadno vysvětlit. Na obrázku 89 je znázorněn možný reakční mechanismus derivatizace výchozí látky **11b** (C6-epimery 10-deoxy-6-hydroxyhippeastidinu, které byly z této rostliny také izolovány, viz strana 74) v kyselém prostředí za přítomnosti ethanolu jako nukleofilu.



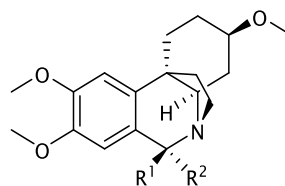
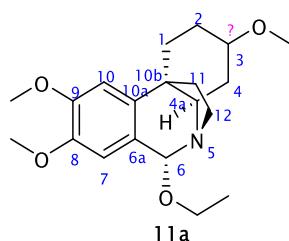
**Obrázek 89** Jedna z možností derivatizace poloaminalového uhlíku. Protonizací nukleofilního terciárního dusíku **11b** a následným posunem elektronů dojde k zániku C-N vazby a tvorbě karbonylu, který ihned reaguje s ethanolem za vzniku poloacetalové skupiny. Toto uskupení je nestabilní v působícím katalytickém množství kyseliny. Rychle dochází k dehydrataci a následnému zavření isochinolinového kruhu s poloaminalethyletherovou skupinou

V literatuře lze nalézt NMR data pouze k 10-deoxy-6 $\alpha$ -hydroxyhippeastidinu **11b**.<sup>8</sup> NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker AV 400 standardními sekvencemi. Látka byla rozpuštěna ve formě TFA soli v methanolu- $d_6$ . Vzhledem k tomu, že vzorek **11a** byl měřen v  $\text{CDCl}_3$  jako volná báze, dají se tato spektra použít pouze pro ilustraci podobného trendu chemických posunů.

Tabulka 3-5 uvádí srovnání chemických posunů v uhlíkovém NMR spektru látek **11a** a **11b**. Větší rozdíly jsou patrné zejména u rezonancí C6 a uhlíků isochinolinového jádra (struktura identifikovaného artefaktu **12a** je řešena obdobným způsobem, kde jsou však v literatuře popsány oba C6-epimery výchozí látky **12b** a **12c**).



**Tabulka 3-5** Porovnání signálů  $^{13}\text{C}$  jader izolované látky **11a** a strukturně velice podobného 10-deoxy-6 $\alpha$ -hydroxyhippeastidinu **11b**<sup>8</sup> (pouze orientační zhodnocení vzhledem k použití jiných rozpouštědel a TFA soli)



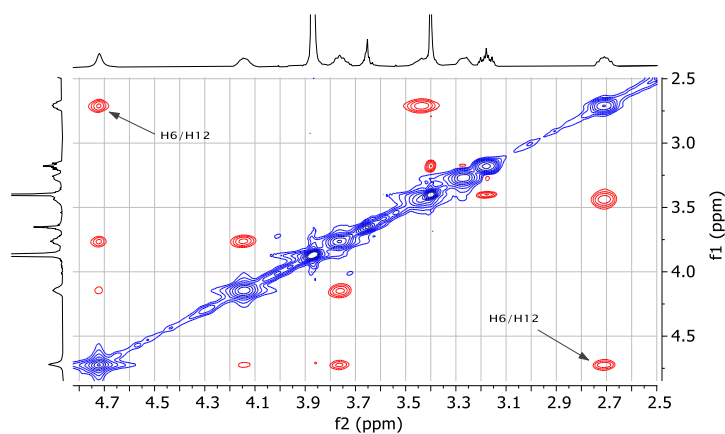
$\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OH}$  10-deoxy-6 $\alpha$ -hydroxyhippeastidin **11b**

$\text{R}^1 = \text{OH}, \text{R}^2 = \text{H}$  10-deoxy-6 $\beta$ -hydroxyhippeastidin, bez NMR dat

pozice	<b>11a</b> *	<b>11b</b> <sup>∇8</sup>	$\Delta$ <b>11a-11b</b>
1	26.2	26.0	0.2
2	27.4	27.3	0.1
3	77.9	77.3	0.6
4	32.9	31.3	1.6
4a	60.1	61.5	1.4
6	94.9	88.7	(6.2)
6a	125.2	121.9	3.3
7	111.5	112.6	-1.1
8	147.6	150.2	-2.6
9	148.9	151.7	-2.8
10	105.5	107.2	-1.7
10a	140.9	137.3	3.6
10b	42.0	44.3	-2.3
11	34.6	32.5	2.1
12	47.1	47.9	-0.8
3-OCH <sub>3</sub>	55.8	56.1	-0.3
8-OCH <sub>3</sub>	55.9	56.3	-0.4
9-OCH <sub>3</sub>	56.0	56.3	-0.3
6-OCH <sub>2</sub>	63.7	-	-
6-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	15.6	-	-

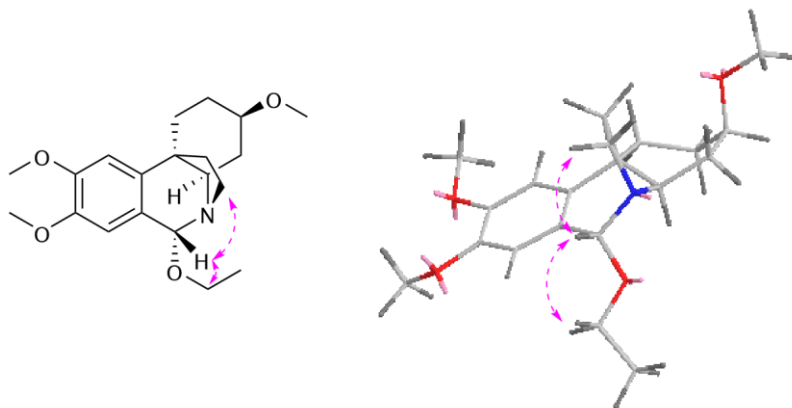
\* měřeno v CDCl<sub>3</sub>, ∇ měřeno v CD<sub>3</sub>OD jako TFA sůl

Z předložených dat je tak možné určit s jistotou konstituci a relativní konfiguraci pro H4a a H6 založenou na NOESY experimentu, kde je zřejmý krospek H6 a vodíku ethylenového můstku H12 (Obrázek 90).



**Obrázek 90** Přibližná část NOESY spektra, ve kterém je šipkou zvýrazněn H6/H12 krospek

Konfigurace na C3, jehož uhlíkový chemický posun má odchylku 0.6 ppm od posunu C3 látky **11b**, je pravděpodobně stejná s publikovaným alkaloidem. Tedy relativní konfigurace chirálních center je  $3R^*,4aR^*,5R^*,6R^*,10bR^*$  (Obrázek 91). Proto byl pro tuto látku zvolen název 10-deoxy-6 $\alpha$ -ethoxyhippeastidin.



**Obrázek 91** Struktura molekuly **11a** s vyznačenou relativní konfigurací chirálních center a zobrazení struktury s danou konfigurací na modelu s minimalizovanou energií z Chem3D®

Jediným zádrhelem při určování konfigurace této látky je naměřená hodnota specifické optické otáčivosti  $+49.2^\circ$  ( $c = 0.42$  g/100 ml,  $\text{CHCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ). Vzhledem k pravotočivé orientaci by se dalo předpokládat, že N5-C10b ethylenový můstek bude orientován pod rovinu fenanthridinového tricyklu, na základě údajů z rozsáhlé syntetické práce používající iridium katalyzovanou asymetrickou hydrogenaci enonu pro získání alkaloidů krininového typu (obou enantiomerů).<sup>149</sup> Zuo a spol.<sup>155</sup> uvádí otáčivosti pro sérii různě substituovaných krininových/haemanthaminových alkaloidů následovně:

- ethylenový můstek pod rovinu – (+)-pravotočivé – heamanthaminový enantiomer
- ethylenový můstek nad rovinu – (–)-levovotočivé – krininový enantiomer

Vliv na hodnotu otáčivosti má pak další substituent na benzenovém jádře v poloze 7 nebo 10, nikoli však na směr.

Rozdělení fenanthridinových alkaloidů s 5,10b-ethylenovým můstkem na tyto dva strukturní skelety, ač se jedná pouze o enantiomery, vnímám jako velmi nešťastné. Důsledkem je totiž zdvojení názvů některých látek, neboť některé výzkumné skupiny publikují nové názvy pro enantiomery molekul již známých alkaloidů. Dva příklady:

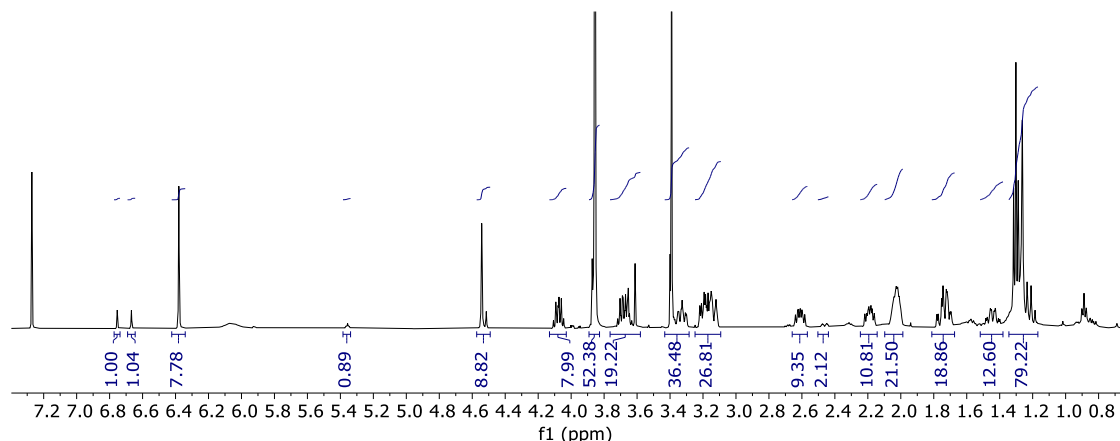
- Enantiomery 8-*O*-demethylmaritidinu byly popsány v minulosti několikrát.<sup>162, 163</sup> V názvu se odlišovaly pouze vyjádřením směru stáčení roviny polarizovaného světla. Současně však byla publikována práce Naira a spol.,<sup>164</sup> který dal levotočivému enantiomeru název macowin (dle izolace alkaloidů z rostliny *Crinum macowanii*). Z publikovaných analytických dat je možné určit, že macowin odpovídá (–)-8-*O*-demethylmaritidinu.<sup>155</sup>
- Podobný problém nastal u hippeastidinu. Jeho struktura byla poprvé objasněna pomocí rentgenové analýzy v roce 1978 (ve formě pikrátu).<sup>165</sup> Watson a spol.<sup>166</sup> v dalším článku publikoval k této struktuře doprovodná analytická data ( $T_f = 175\text{--}180^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D = -6.94^\circ$

( $c = 2.30$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), MS;  $^1\text{H}$  NMR spektrum nemá bohužel dobré rozlišení a interpretace není úplná). Další článek této výzkumné skupiny<sup>167</sup> uveřejnil rentgenovou strukturu údajně čistého hippeastidinu, ale při podrobném zkoumání lze odhalit větší rozdíl než jen ionizovanou a neionizovanou formu alkaloidu. V této byl totiž zveřejněn 3-*O*-demethylhippeastidin, tedy substituovaný na C3-OH.<sup>167</sup> Následně byla v letech 2013 a 2014 publikována NMR data pro molekulu s názvem hippeastidin ve dvou pracích (chemické posuny se s malými odchylkami shodují v obou pracích).<sup>168, 169</sup> Kulhánková a spol.<sup>169</sup> prezentuje také  $T_f = 202\text{--}203$  °C, MS a  $[\alpha]_D = +330$  ° ( $c = 0.10$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Uvádí pouze konstituci molekuly, nikoli konfiguraci. O rok později byl otištěn článek o krininových alkaloidech,<sup>158</sup> kde je uveden název aulicin pro molekulu, jejíž struktura byla potvrzena rentgen-strukturní analýzou, NMR data a  $[\alpha]_D = -2.3$  ° ( $c = 0.40$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Srovnáním rentgenové struktury hippeastidinu z Watsonovy práce<sup>165</sup> a aulicinu<sup>158</sup> je zjevné, že se jedná o látky totožné, s čímž souhlasí i hodnota optické otáčivosti (dochází tak opět ke zdvojení názvů). Zajímavé ale je, že NMR data aulicinu<sup>158</sup> a hippeastidinu ve člancích z roku 2013<sup>168, 169</sup> se neshodují. Zásadní rozdíl v chemických posunech se nachází na C4a, C6a a C10a; potažmo H4a a H12. Což by v případě enantiomerů nebylo možné. Je tak otázkou, k jaké konfiguraci se skeletem hippeastidinu se NMR data z roku 2013 vztahují. A tím pádem, jaká je skutečná konfigurace na **11a** a **10a**.

Poznámka: V návaznosti na předloženou problematiku derivatizace během získávání alkaloidů z matečné rostliny je možné považovat přírodní látky s poloaminaletherovou, resp. poloacetalovou skupinou substituovanou různými alkyly za izolační artefakty.

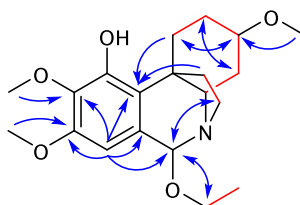
**ZC-F3-4 (12a)** $M_r = 363.5$ ;  $m = 11.0$  mg $C_{20}H_{29}NO_5$ 

Podle vodíkového spektra bylo ihned zřejmé, že ve vzorku jsou přítomny dvě látky, vedle látky **12a** i cca 15 % ZC-F3-5 **11a** a další nečistoty (Obrázek 92). Zásadní rozdíl oproti **11a** byl jen v substituci aromatického jádra tetrahydroisochinolinu, v tomto případě 1,2,3,4,5-pentasubstituovaného jádra.



**Obrázek 92**  $^1\text{H}$  NMR spektrum **12a**, se zhruba 15% 10-deoxy derivátu (předcházející látka **11a**)

Pomocí HMBC experimentu byly identifikovány dvě methoxy skupiny a hydroxy skupina na tomto aromatickém jádře, které v aromatické části  $^1\text{H}$  NMR spektra vykazovalo pouze jeden signál ( $\delta_{\text{H}}$  6.06, bs), viz obrázek 93. Zbytek korelací odpovídal těm uvedeným u **11a**.

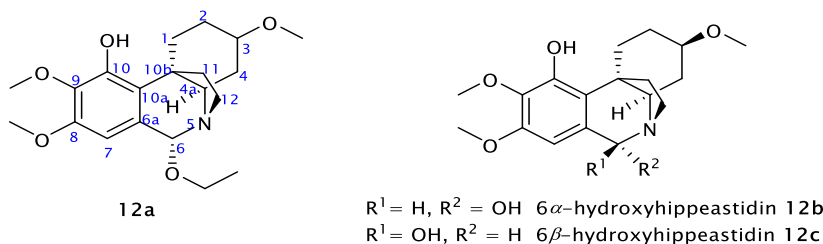


**Obrázek 93** Významné HMBC, COSY korelace izolačního artefaktu **12a**

I v tomto případě lze předpokládat derivatizaci poloaminalové skupiny během izolace, neboť mezi potvrzenými alkaloidy získanými z matečného louhu je i 6 $\alpha$ -hydroxyhippeastidin **12b** a 6 $\beta$ -hydroxyhippeastidin **12c**, což jsou pravděpodobné prekurzory popisované látky **12a**.

Interpretace  $^{13}\text{C}$  NMR spekter obou krininových alkaloidů **12b**, **12c** byla publikována opět v  $\text{CD}_3\text{OD}$  jako sůl TFA v téže práci, která je uvedena u předchozí identifikované látky **11a**.<sup>8</sup> V tabulce 3-6 jsou zobrazeny uhlíkové chemické posuny **12a** v porovnání s C6-epimery 6-hydroxyhippeastidinu. Největší rozdíl je patrný pro signály C4a a C12 u referenčních látek, přičemž epimer „6 $\alpha$ “ se více blíží námi identifikovanému alkaloidu **12a**. Také je spektru NOESY experimentu patrná korelace H6 ( $\delta_{\text{H}}$  4.54) a H12 ( $\delta_{\text{H}}$  2.71–2.56), která podporuje určení *R*-konfigurace pro chirální centrum C6 látky **12a**, viz obrázek 94.

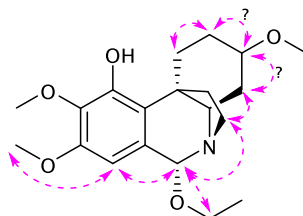
**Tabulka 3–6** Porovnání chemických posunů signálů  $^{13}\text{C}$  látky **12a** a jí strukturně velice podobných publikovaných diastereomerů **12b** a **12c**<sup>8</sup> (pouze orientační zhodnocení podobnosti vzhledem k použití jiných podmínek měření)



pozice	<b>12a</b> *	<b>12b</b> <sup>∇8</sup>	<b>12c</b> <sup>∇8</sup>	$\Delta 12a-12b$	$\Delta 12a-12b$
1	26.4	26.9	27.0	-0.5	-0.6
2	27.7	27.8	27.9	-0.1	-0.2
3	77.7	77.4	77.1	0.3	0.6
4	33.4	31.9	31.7	1.5	1.7
4a	60.9	62.6	67.8	-1.7	-6.9
6	95.0	88.7	87.6	(6.3)	(6.4)
6a	129.9	126.4	127.8	3.8	2.1
7	103.9	104.7	103.3	-0.8	0.6
8	150.3	153.7	153.4	-3.4	-3.1
9	135.2	138.7	138.4	-3.5	-3.2
10	146.3	149.5	149.0	-3.2	-2.7
10a	126.3	123.7	123.7	2.6	2.6
10b	43.0	46.0	46.3	-3.0	-3.3
11	33.1	31.6	32.3	1.5	0.8
12	47.4	48.4	43.6	-1	3.8
3-OCH <sub>3</sub>	55.6	56.2	56.2	-0.6	-0.6
8-OCH <sub>3</sub>	55.6	56.4	56.3	-0.8	-0.7
9-OCH <sub>3</sub>	60.9	61.1	61.1	-0.2	-0.2
6-OCH <sub>2</sub>	63.7	-	-	-	-
6-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	15.6	-	-	-	-

\* měřeno v CDCl<sub>3</sub>, <sup>∇</sup> měřeno v CD<sub>3</sub>OD jako TFA sůl

Konfiguraci na C3 nebylo možno určit jinak než srovnáním se strukturně podobnou referencí, protože signály H3 a H4a se překrývaly (stejně tak signály ekvatoriálních diastereotopických H2 a H4). Izolační artefakt **12a** byl následně pojmenován 6 $\alpha$ -ethoxyhippeastidin.

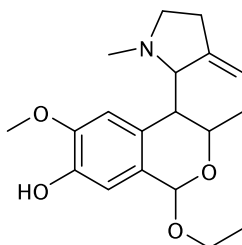


**Obrázek 94** Důležité NOESY korelace ve spektru látky **12a**. Otazníky představují neurčitost vztahu mezi spinovým systémem cyklohexanového kruhu, neboť důležité signály v  $^1\text{H}$  NMR spektru se překrývají a není možné rozeznat krosipky daných vodíkových atomů

Specifická optická otáčivost nebyla měřena vzhledem k vysokému obsahu neoddělitelných nečistot ve vzorku. Další strukturně velice podobná látka je komentována pod označením **17a**.

**ZC-15-3-3-3 (13a)** $M_r = 331.4$ ;  $m = 6.7$  mg $C_{19}H_{25}NO_4$ 

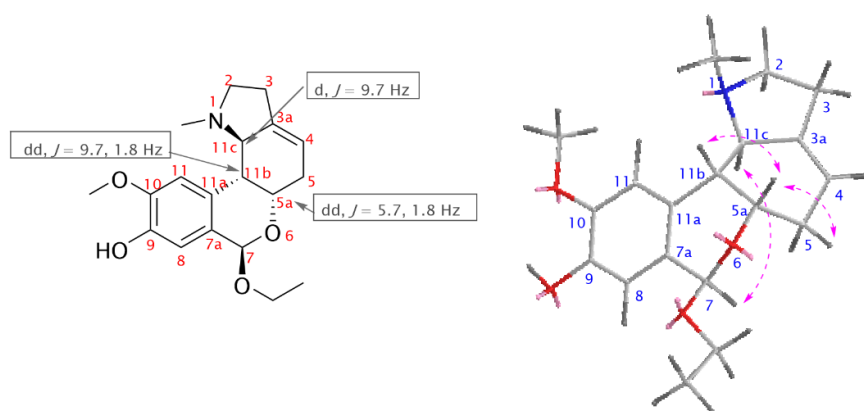
Z důvodu rozpuštění této látky v methanolu- $d_6$  byla zastřena přítomnost fenolické skupiny díky rychlé chemické výměně vodíku. Pomocí 2D NMR experimentů byl identifikován lykoreninový skelet s ethoxy substitucí poloacetalového uhlíku, viz obrázek 95.



**Obrázek 95** Identifikovaná molekula látky **13a**, v literatuře známá jako eugenine<sup>170</sup>

V databázích vědecké literatury byl nalezen článek, který popisuje pouze krystalografická data látky se stejnou konstitucí, jakou má **13a** pod názvem eugenine.<sup>170</sup> Kromě rentgenové analýzy bohužel článek žádná další analytická data nepřináší. Měla být zřejmě zveřejněna v článku, na který se odkazuje: „BASTIDA, J., VILADOMAT, F., LLABRÉS, J. M., FALCO, P., CODINA, C. & RUBIRALTA, M. (1989). *J. Nat. Prod.* In the press“. Bohužel tuto práci se mi nepodařilo nalézt. Pravděpodobně nebyla v *Journal of Natural Products* nikdy otisknuta. Z tohoto důvodu nebylo možné porovnat referenční NMR spektra a jednoduše potvrdit stereochemii **13a** z rentgenové analýzy, která byla uvedena jako „(5*S*\*,6*aR*\*,11*aR*\*,11*bR*\*)-5-ethoxy-6*a*,7,11*a*,11*b*-tetrahydro-2-methoxy-*N*-methyl-5*H*-[2]benzopyran[3,4-*g*]indolin-3-ol“, což odpovídá lokantům (5*aS*\*,7*R*\*,11*bR*\*,11*cR*\*) použitým pro látku v této identifikaci **13a**. Označením chirálních uhlíků symbolem \* autoři uvádějí absolutní konfiguraci pro oba enantiomery obsažené v získaném monokrystalu.

Pomocí korelací z NOESY spekter a informací ze štěpení vodíkových signálů bylo možné potvrdit molekulu se stejnou relativní konfigurací (Obrázek 96), jaká je uvedena v práci Via a spol.<sup>170</sup>

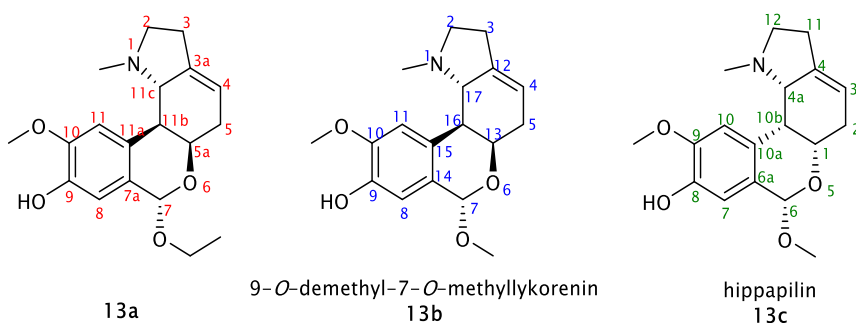


**Obrázek 96** Relativní konfigurace molekuly **13a** identifikované pomocí rentgenové difraktometrie<sup>170</sup> v souladu s korelacemi v NOESY spektrách a  $J$ -konstantami (šedě)

Jako další podpůrná metoda určení konfigurace molekuly byla porovnána  $^{13}\text{C}$  NMR data diastereomerů 7-*O*-methylovaných derivátů 9-*O*-demethyllykoreninu, jejichž srovnání uvádí tabulka 3-7.<sup>171, 172</sup> Z výsledků rozdílů rezonancí je více pravděpodobné, že **13a** má stejnou konfiguraci jako **13b**<sup>172</sup> (zejména u chirálních center a okolí jsou pro diastereomer **13c**<sup>171</sup> větší odlišnosti).

Toto tvrzení je v souladu s korelacemi pozorovanými v NOESY a ROESY experimentu a *J*-konstantou pro H5a (dd,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 1.8$  Hz), H11b (dd,  $J = 9.7$  Hz,  $J = 1.8$  Hz) a H11c (d,  $J = 9.7$  Hz) (Obrázek 96). Výsledkem sumarizace zmíněných dat je určená relativní konfigurace (5a*S*\*, 7*R*\*, 11b*R*\*, 11c*R*\*) odpovídající té, která byla publikované (zde je jen použité jiné číslování než ve článku).

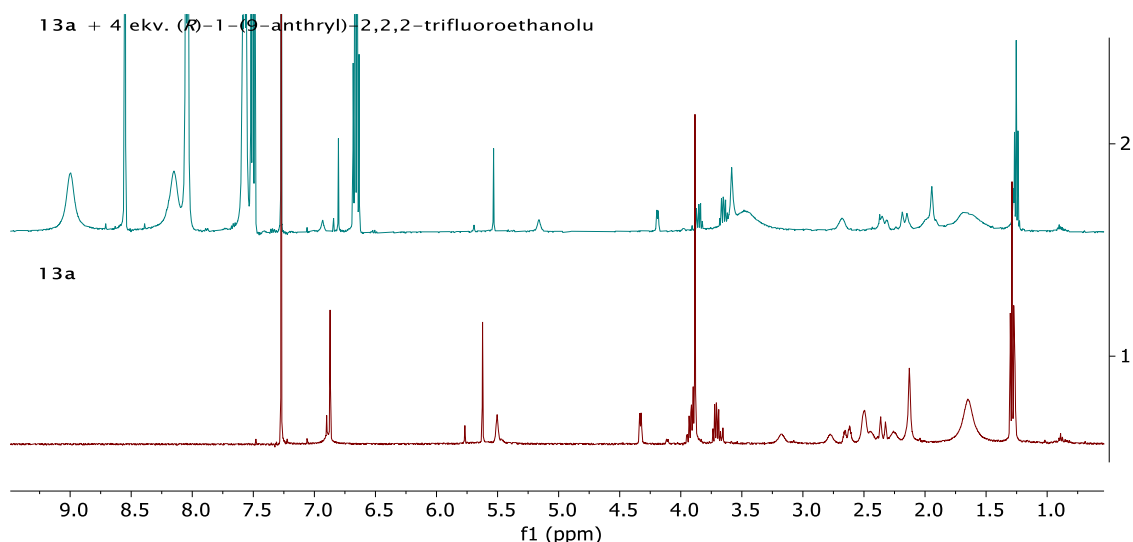
**Tabulka 3-7** Zobrazení porovnávaných chemických posunů  $^{13}\text{C}$  mezi látkami strukturně podobnými (měřeno v  $\text{CDCl}_3$ ). Na obrázcích je znázorněno použité číslování pro diastereomery **13b**<sup>172</sup> a **13c**<sup>171</sup> v člancích. Pro námi identifikovanou **13a** je použito číslování dle IUPAC, které koreluje s číslováním v tabulce



pozice	<b>13a</b>	<b>13b</b> <sup>172</sup>	<b>13c</b> <sup>171</sup>
2	56.7	56.6	56.1
3	28.0	27.9	28.6
3a	140.1	139.3	138.4
4	116.1	116.7	115.2
5	31.7	31.6	28.9
5a	66.6	66.6	70.5
7	97.1	98.4	97.1
7a	126.7	126.4	127.8
8	113.4	113.5	112.4
9	145.0	145.2	143.7
10	146.2	146.5	145.9
11	112.0	112.0	110.6
11a	129.7	129.2	126.7
11b	43.7	43.0	35.4
11c	67.7	67.9	70.6
NCH <sub>3</sub>	44.2	44.0	40.0
10-OCH <sub>3</sub>	56.1	56.1	55.7
7-OCH <sub>2</sub>	63.5	-	-
7-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	15.7	-	-
$[\alpha]_D$	+113.3 ° ( <i>c</i> = 0.18 g/100 ml, CHCl <sub>3</sub> , 25 °C)	+122.6 ° ( <i>c</i> = 0.65, CHCl <sub>3</sub> , 26 °C)	+33.0 ° ( <i>c</i> = 0.15, CHCl <sub>3</sub> ; 24 °C)

Podobné deriváty homolykorinu se stejně určenou relativní stereochemií molekuly byly vyhledány pro porovnání hodnoty specifické optické otáčivosti: odulin (NMR, MS, IČ, UV,  $[\alpha]_D^{25}$ )<sup>140</sup>, *O*-methylodulin (NMR, MS, IČ, UV,  $[\alpha]_D^{25}$ )<sup>140</sup>, *O*-methyllykorenin (NMR, MS, IČ,  $[\alpha]_D^{20}$ )<sup>173</sup>, *O*-ethyllykorenin (MS, NMR)<sup>173</sup>. Všechny vykazovaly kladnou hodnotu specifické optické otáčivosti jako námi zkoumaná látka **13a**. Avšak také nebylo jasné, o jaký enantiomer se jedná (data bez derivatizace nebo rentgenové analýzy). Problematice konfigurace tohoto strukturního typu se věnoval již Labrana a spol.,<sup>174</sup> který polemizuje stereochemií homolykorinových/lykoreninových alkaloidů v návaznosti na výsledky vlastní rentgenové analýzy. Prokázána byla opačná konfigurace chirálních center *O*-methyllykorenin hydrochloridu (ostatní data odkazuje jako shodná s dříve uváděnými, vztaženými k relativní konfiguraci), než byla do té doby u všech těchto látek publikována.

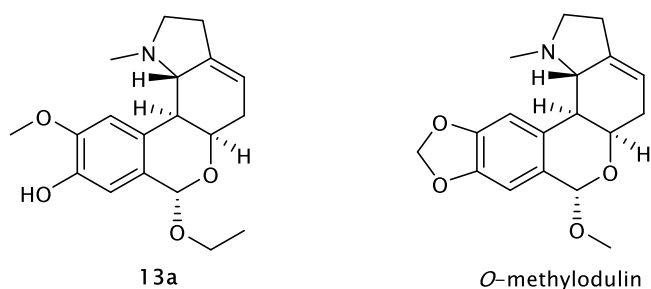
Někteří autoři zmiňují, že popisovaný strukturní typ AA je pravděpodobně izolován ve směsi enantiomerů. Proto byly ke vzorku **13a** přidány čtyři ekvivalenty Pirklova posunového činidla, přičemž nedošlo k oddělení signálů enantiomerů (Obrázek 97), a tím byla prokázána přítomnost pouze jednoho enantiomeru **13a**.



**Obrázek 97** Spodní spektrum zobrazuje signály <sup>1</sup>H vzorku **13a** a horní spektrum po přidavku čtyř ekvivalentů Pirklova činidla. Je zřejmé, že nedošlo k oddělení signálů možných enantiomerů

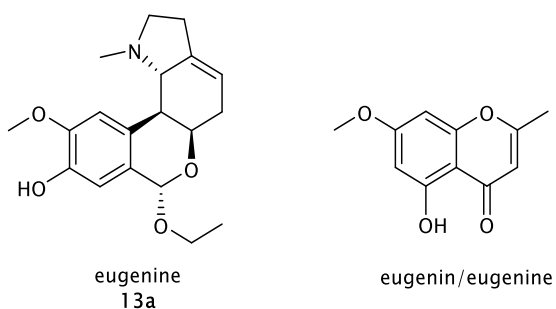
Lze předpokládat, že produktem rostlinného metabolismu je nesubstituovaná forma isochroman-1-olu a izolací vzniká 7-ethoxy derivát lykoreninového skeletu (podobně jako u krininového typu **11a** a **12a**). Tuto představu vyjádřil již Kreh<sup>140</sup> ve své práci, ve které popisuje izolaci *O*-methylodulinu (Obrázek 98) za použití methanolu. Aby vyvrátil, nebo potvrdil derivatizaci poloacetalového hydroxyly během izolace, provedl současně izolaci *O*-methylodulinu bez použití methanolu. Zkoumaný methylový derivát získal v obou případech. To nasvědčuje spíše tomu, že zmíněný *O*-methylodulin je produktem rostlinného metabolismu. V případě látky **13a** je však velmi nepravděpodobné, že by byla produktem biogeneze.





**Obrázek 98** Struktura izolačního artefaktu **13a** v porovnání s pravděpodobně přírodním *O*-methylodulinem

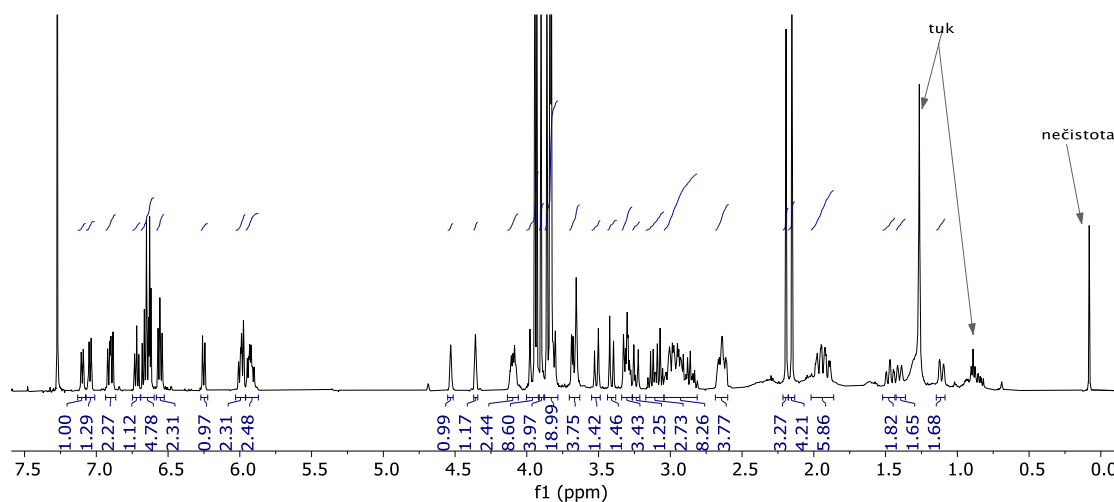
Na okraj bych chtěla poukázat na volbu názvu pro látku s konstitucí **13a**, která nebyla dle mého názoru příliš šťastná, ačkoli odkazuje na druhové jméno *Narcissus eugeniae*, ze kterého byla látka izolována.<sup>170</sup> Jméno eugenin/eugenine dostal 5-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-4H-chromen-4-on již v roce 1946 (Obrázek 99).<sup>175</sup>



**Obrázek 99** Eugenie **13a**, lykoreninový alkaloid izolovaný z rostliny čeledi Amarylidaceae, prezentován v roce 1989<sup>170</sup> a molekula eugeninu, flavonoidní přírodní látky, popsaná prvně v roce 1946<sup>175</sup>

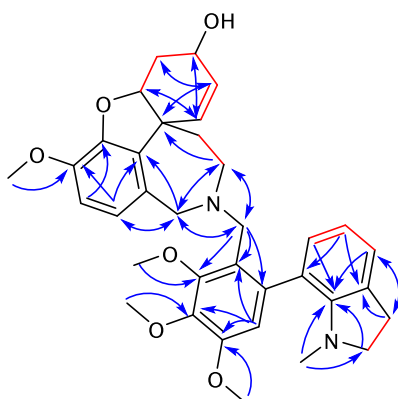
**ZC-F4-ML-1-67 (14a)** $M_r = 584.7$ ;  $m = 11.0$  mg $C_{35}H_{40}N_2O_6$ 

Počet signálů v  $^1H$  NMR spektru byl adekvátní k naměřené molekulové hmotnosti 584 a přítomné směsi diastereomerů v poměru 8 : 7, kde zejména široké singlety  $\delta_{H_{4a}}$  4.53 a  $\delta_{H_{4a}}$  4.36 měly rozdílnou rezonanci o 86 Hz (Obrázek 100). Uhlíkové spektrum také potvrzovalo přítomnost směsi diastereomerů. Obecně spektra této látky byla velice podobná látce **6a** izolované z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* var. Carlton.



**Obrázek 100**  $^1H$  NMR spektrum směsi diastereomerů vzorku ZC-F4-ML-1-67

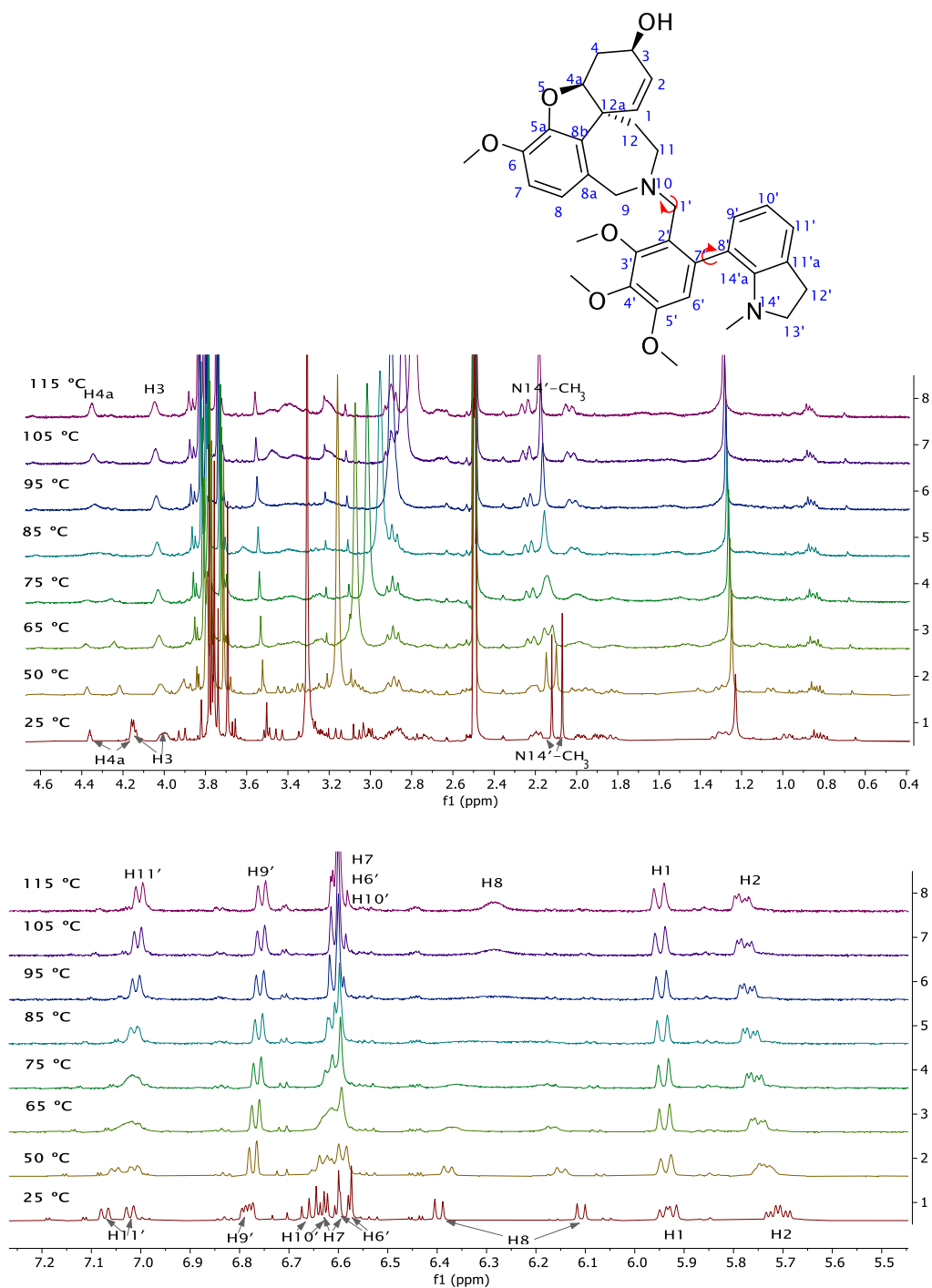
Pomocí 2D experimentů byla potvrzena podobná konstituce heterodimerního alkaloidu jako u **6a** (Obrázek 101). Rozdílná byla substituce fenylového jádra galantindolového fragmentu, kde v případě látky **14a** bylo pět substituentů, přičemž žádný alkaloid (prekurzor **14a**), který by obsahoval jak *N*-methylindolin, tak 1,2,3,4,5-pentasubstituované benzenové jádro, dosud popsán nebyl. I v tomto případě byla potvrzena relativní konfigurace galantaminového fragmentu stejným postupem jako pro látku **6a**.



**Obrázek 101** Znárodněné interakce z HMBC, COSY a H2BC experimentů

Byl proveden teplotní experiment, kterým byla mimo jiné prokázána vyšší energetická bariéra rotace omezených vazeb **14a** než u **6a** zřejmě kvůli více substituovanému fenylu galantindolového fragmentu. Ani při 60 °C nebylo u této látky zřejmé dosažení teploty

koalescence, proto byl proveden stejný experiment ve výše vručím rozpouštědle (DMSO- $d_6$ ). Na obrázku 102 jsou zobrazena naměřená data z dynamické analýzy. Na druhou stranu je potřeba zmínit, že látka **14a** byla stabilní a nepodléhala rozkladu, v porovnání s **3a**, **4a** a **6a**.



**Obrázek 102**  $^1\text{H}$  NMR spektrum dynamické analýzy omezené rotace sigma vazeb s vyznačenými vybranými vodíky. Při nejvyšší experimentální teplotě je viditelná koalescence všech vodíků **14a**

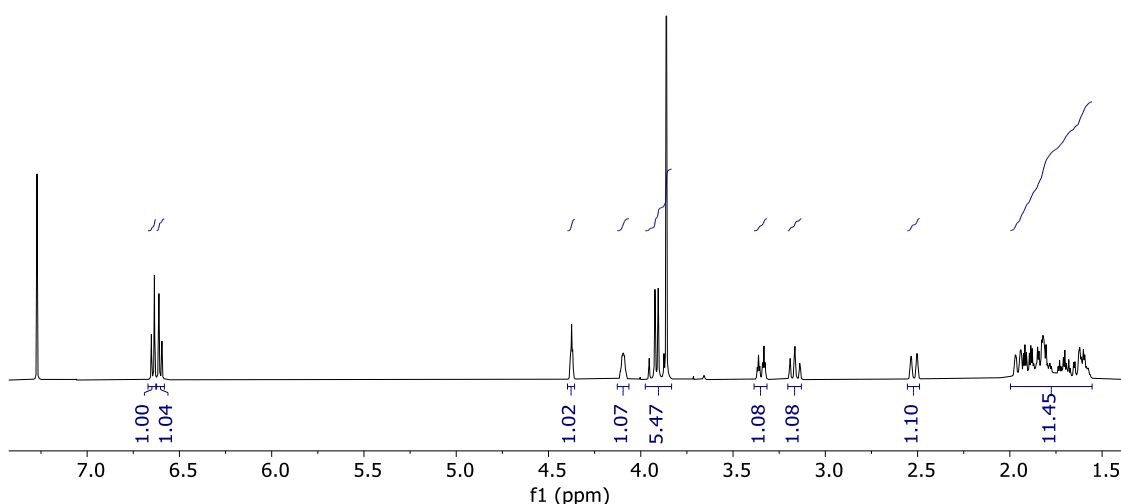
Cirkulární dichroismus byl u této látky také zkoumán, stejně jako optická otáčivost. Výsledky byly srovnány s těmi referovanými k (-)-galantaminu. V CD spektrech byl pozorován Cottonův efekt při  $[\theta]_{240} = -19\,412$ ,  $[\theta]_{284} = +32\,276$ ,  $[\theta]_{317} = -9\,998$ , v porovnání s efekty

u (-)-galanthaminu  $[\Theta]_{238} = +2\ 700$ ,  $[\Theta]_{245} = -2\ 350$ ,  $[\Theta]_{285} = +8\ 200$ . Specifická optická otáčivost při teplotě 25 °C měla zápornou hodnotu  $-55.8^\circ$  ( $c = 0.17$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), přičemž u galantaminu je udáváno  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -89.7^\circ$  ( $c = 0.6$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Ovšem data chiroptických metod je potřeba brát s rezervou, neboť v případě **14a** je měřena směs atropoizomerů.

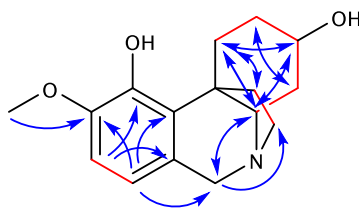
Postup této identifikace byl také zveřejněn ve článku Kohelová a spol.<sup>152</sup>

**ZC-5-6-1 (15a)** $M_r = 375.3$ ;  $m = 7.3$  mg $C_{16}H_{21}NO_3$ 

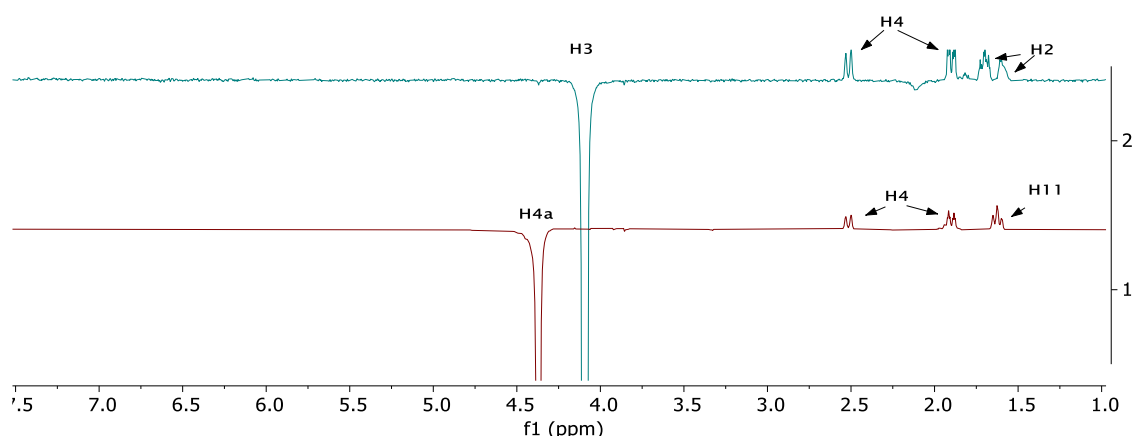
Na první pohled vypadala 1D NMR spektra naměřená od vzorku **15a** atypicky pro AA (Obrázek 103). Již samo o sobě 1,2,3,4-tetrasubstituované jádro ( $\delta_{H8}$  6.64, d,  $J = 8.2$  Hz;  $\delta_{H7}$  6.60, d,  $J = 8.2$  Hz) není u těchto alkaloidů příliš běžné pozorovat ve spektru, stejně jako rezonance methinových skupin odstíněných vodíků ( $\delta_{H4a}$  4.37, t,  $J = 3.4$  Hz;  $\delta_{H3}$  4.12–4.07, m). Dublety diastereotopické  $NCH_2$  skupiny isochinolinového jádra měly neobvyklý tvar ( $\delta_{H6}$  3.94, d,  $J = 15.5$  Hz; 3.89, d,  $J = 15.5$  Hz) odpovídající malému rozdílu v jejich rezonanční frekvenci a současně silné vzájemné  $J$ -interakci (vnitřní pík dubletu je násobně intenzivnější než vnější). Methylový signál ( $\delta_H$  3.86, s, 9-OCH<sub>3</sub>), další dva odstíněné signály diastereotopických vodíků  $N$ -methylenové skupiny ( $\delta_{H12}$  3.35, dt,  $J = 14.6$  Hz,  $J = 3.5$  Hz; 3.20–3.12, m) a šest alifatických signálů doplnily vodíkové spektrum čisté látky.

**Obrázek 103** <sup>1</sup>H NMR spektrum látky **15a**

2D NMR experimenty odhalily velice zvláštní úkaz, a to že vysoce odstíněný posun  $\delta_{C4a}$  89.9 patříci  $N$ -methinovému uhlíku fenanthridinového skeletu, což je velice neobvyklé pro uhlíkový atom odstíněný dusíkem, viz obrázek 104. Běžně se chemický posun tohoto uhlíku u strukturně podobných látek nachází kolem 60 ppm. Látka byla několikrát přeměřena v různých rozpouštědlech, vždy však se stejným výsledkem.

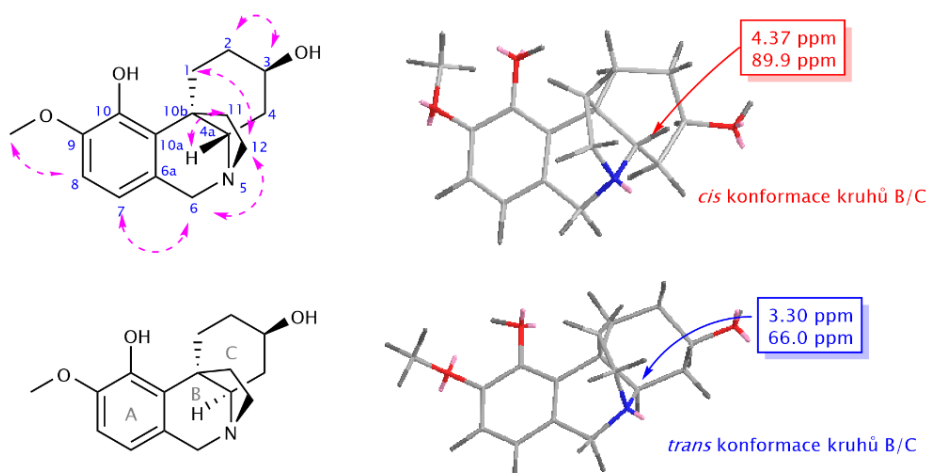
**Obrázek 104** Důležité **HMBC** a **COSY** korelace, které vedly k určení konstituce molekuly **15a**

1D i 2D NOESY experiment potvrdil zvláštní vztahy vodíkových atomů v této molekule (Obrázek 105). Krosník H4a a H11 představil možné vysvětlení záhady vysokého odstínění.



**Obrázek 105** 1D NOESY spektra iradiace H3 a H4a vodíkových atomů. H11 ethylenového můstku je ve vztahu s H4a, na stejnou stranu díky prostorové kros-relaxaci. A současně není pozorována korelace mezi H3 a H4a

Nejpravděpodobnější příčinou tohoto jevu se ukázala odlišná konformace chinolinových kruhů, protože v případě krininového nebo haemanthaminového strukturního typu (Obrázek 106) jsou napojeny v *trans*-uspořádání, kde C4a rezonuje v oblasti okolo 66 ppm a H4a při cca 3.30 ppm. Tedy konformace kruhů chinolinu byla pro **15a** určena jako *cis* odpovídající relativní konfiguraci (4a*S*\*,10b*R*\*).



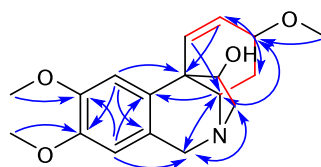
**Obrázek 106** Porovnání *cis* a *trans* konformace kruhů B/C pro látku **15a** na modelech s minimalizovanou energií systému se znázorněním chemických posunů nejvíce ovlivněné skupiny 4a. NOESY korelace jsou vyznačeny na **15a** s pravděpodobnou konfigurací (3*R*,4a*S*\*,10b*R*\*)

Na obrázku 106 jsou zobrazeny NOESY korelace jednotlivých vodíků. Molekula **15a**, pro kterou byla v Chem3D minimalizována energie bude pravděpodobně v prostoru stočena ještě trochu jinak, neboť na tomto modelu nelze předpokládat interakci atomů H1 a H6. Každopádně se jedná o strukturu AA s velice nevšední konfigurací, která bohužel kvůli izolovanému velmi malému množství nebyla derivatizována pro určení absolutní konfigurace.

**ZC-5-6-3 (16a)** $M_r = 317.4$ ;  $m = 5.2$  mg $C_{18}H_{23}NO_4$ 

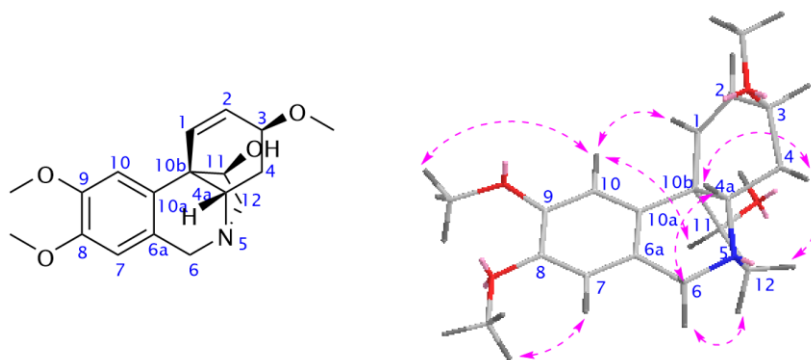
Původně byla u této látky naměřena relativní molekulová hmotnost 289. Konfrontací s 1D NMR spektry bylo zřejmé, že molekulová hmotnost bude jiná, než bylo udáno. V oblasti nízkého pole byly zřejmé signály odpovídající 1,2,4,5-tetrasubstituovanému aromatickému systému isochinolinového fragmentu ( $\delta_H$  6.84, s; 6.52, s, překryv) a izolované dvojně vazby ( $\delta_H$  6.52, d, překryv,  $J = 10.0$  Hz; 6.41, dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 4.9$  Hz). Dále byly identifikovány diastereotopické signály typické pro vodíky  $NCH_2$  skupiny isochinolinu ( $\delta_H$  4.42, d,  $J = 16.5$  Hz; 3.79, d,  $J = 16.5$  Hz), tři methoxy skupiny ( $\delta_H$  3.88, s, překryv; 3.83, s; 3.38, s, překryv) a další blíže nespécifikované signály alifatické části spektra.

Vzhledem k nekomplikované struktuře byla rychle identifikována konstituce molekuly pomocí běžných 2D NMR experimentů. Zjištěná konstituce fenanthridinového skeletu s 5,10b-ethylenovým můstkem byla porovnána s databázemi, ale nebyla nalezena shoda s žádnou publikovanou molekulou. Proto bylo nutné prověřit i stereochemii dané molekuly za použití NOESY.



**Obrázek 107** Konstituce molekuly **16a** s nejdůležitějšími korelacemi z HMBC, COSY a H2BC spektra

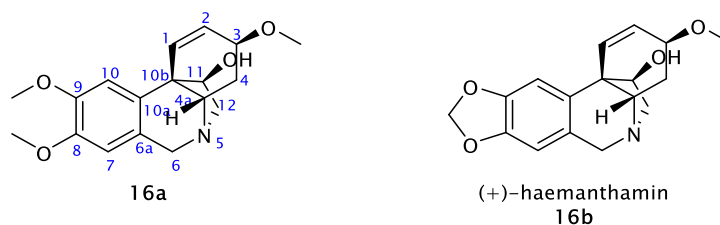
Bohužel kvůli překryvům stěžejních signálů ve vodíkovém spektru bylo velmi obtížné z NOESY experimentu určit relativní konfiguraci molekuly, ne však nemožné alespoň pro chirální centrum C11 určit *R*-konfiguraci. Chybějící korelace H4a s H3 a H12 pak nastiňují pravděpodobnou konfiguraci na těchto stereocentrech 3*S*\*,4*aS*\*,10*bS*\* (Obrázek 108). Model s minimalizovanou energií vycházející z odpovídající relativní konfigurace stereocenter pak ukazuje, že absence korelací mezi stereocentry je možná. Na tuto skutečnost se však nelze plně spolehnout, neboť je možné, že za daných podmínek měření nebyla interakce odhalena.



**Obrázek 108** Důležité NOESY korelace látky **16a** a 3D struktura molekuly s minimalizovanou energií systému

Současně byly signály  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  porovnávány s dostupnými daty podobných látek krininového a haemanthaminového typu: krinamin, epikrinamin, haemanthamin, ambellin, aj. Nejvyšší podobnost byla nalezena s daty haemanthaminu, jehož konfigurace ( $3S^*,4aS^*,10bS^*,11R^*$ ) byla potvrzena stereoselektivní syntézou<sup>138</sup> a autoři potvrzují shodu s daty přírodního haemanthaminu (NMR, specifickou otáčivostí a teplotou tání). Velkým překvapením byl potom výsledek CD analýzy, který naprosto neodpovídal očekávanému průběhu křivky s minimem  $[\theta]_{240} = -13\,800$  a maximem  $[\theta]_{292} = +11\,900$ ,<sup>49</sup> který je charakteristický pro haemanthamin, ale Cottonův efekt byl pouze pozitivní při  $[\theta]_{229} = +29\,486$  a  $[\theta]_{290} = +34\,183$ . Také porovnání  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  rezonancí v molekule krinaminu (C3-epimer haemanthaminu), vykazuje jasné rozdíly oproti těm v **16a**, **16b** (například  $\delta_{\text{C}3}$  76.1, oproti  $\delta_{\text{C}3}$  72.7 u **16a** a **16b**) a je tedy nepravděpodobné, že by látka **16a** měla opačnou konfiguraci právě na C3 než má haemathamin.<sup>176</sup>

Tabulka 3-8 Porovnání  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR dat **16a** a haemanthaminu **16b**<sup>138</sup>



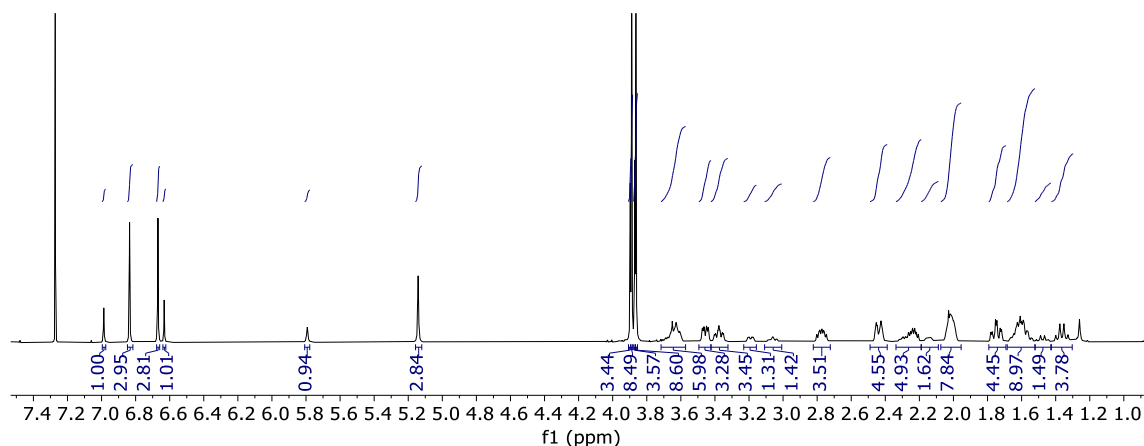
pozice	$\delta_{\text{C}}$ <b>16a</b>	$\delta_{\text{H}}$ <b>16a</b>	$\delta_{\text{C}}$ <b>16b</b> <sup>138</sup>	$\delta_{\text{H}}$ <b>16b</b> <sup>138</sup>
1	126.9	6.52, d, překryv (10.0)	127.3	6.43, d (10.2)
2	132.4	6.41, dd (10.0, 4.9)	132.4	6.36, dd (10.2, 4.7)
3	72.7	3.91–3.86, m, překryv	72.7	3.86, ddd (4.7, 4.0, 1.8)
4	28.1	2.22–2.03, m	28.2	2.11, ddd (13.8, 5.4, 1.8) 2.06–1.97, m
4a	62.9	3.48–3.41, m	62.6	3.43–3.30
6	60.9	4.42, d (16.5) 3.79, d (16.5)	61.3	4.32, d (17.1) 3.69, d (17.1)
6a	125.2		126.7	
7	109.7	6.52, s, překryv	106.8	6.47, s
8	148.0		146.4	
9	147.9		146.1	
10	106.3	6.84, s	103.3	6.82, s
10a	133.8		135.3	
10b	49.9		50.0	
11	80.0	4.06–4.01, m	80.1	3.98, dd (6.7, 3.3)
12	63.3	3.48–3.41, m 3.35, d, překryv (15.0)	63.5	3.43–3.30, m 3.25 dd, (14.1, 3.3)
3-OMe	56.7	3.38, s, překryv	56.5	3.36, s
8-OMe	55.9	3.83, s	–	–
9-OMe	56.1	3.88, s, překryv	–	–
-OCH <sub>2</sub> O-	–	–	100.8	5.89, bs; 5.88, bs
$[\alpha]_{\text{D}}$		+46 ° ( $c = 0.20$ g/100 ml, CHCl <sub>3</sub> , 25 °C)		+41 ° ( $c = 0.62$ , CHCl <sub>3</sub> , 24 °C)



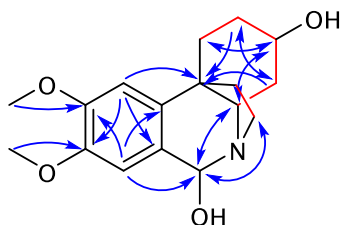
Pomocí NMR a porovnání byla určena relativní konfigurace molekuly **16a**, jejíž struktura nebyla doposud v literatuře popsána, ač se oproti haemanthaminu (který je v AA hojně zastoupen) strukturně liší pouze substitucí benzenového jádra.

**Z2-3-1A (17a)** $M_r = 305.4$ ;  $m = 8.2$  mg $C_{17}H_{23}NO_4$ 

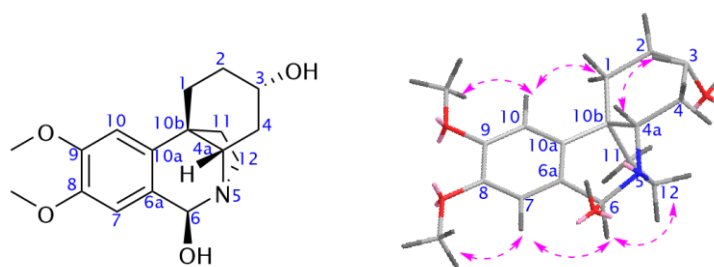
V tomto vzorku byly rozeznány dvě látky. Při identifikaci byly potvrzeny diastereomery v poměru 1 : 3 (Obrázek 109). Látka obsažená v nadbytku byla identifikována jako dosud neznámý alkaloid. V obrázku 109, který zobrazuje naměřené  $^1H$  NMR spektrum, jsou zřetelné dva singlety 1,2,4,5-tetrasubstituovaného benzenového jádra, odstíněný singlet  $\delta_H$  5.14, dvě methoxy skupiny a dále alifatické multiplety.

**Obrázek 109**  $^1H$  NMR spektrum směsi látek obsažených ve vzorku **17a**

Pomocí HSQC experimentu se podařilo přiřadit jednotlivé signály vodíků náležitým uhlíkovým atomům. Konstituce molekuly pak byla určena korelacemi z HMBC, COSY a H2BC experimentů, viz obrázek 110.

**Obrázek 110** Důležité **HMBC**, **COSY** a **H2BC** korelace, které vedly k určení konstituce molekuly **17a**

Molekula je velice podobná již popisované látce **11a**, která však má substituované obě hydroxylové skupiny, a to jako ethylether poloaminalové skupiny a methoxy skupinu na C3.

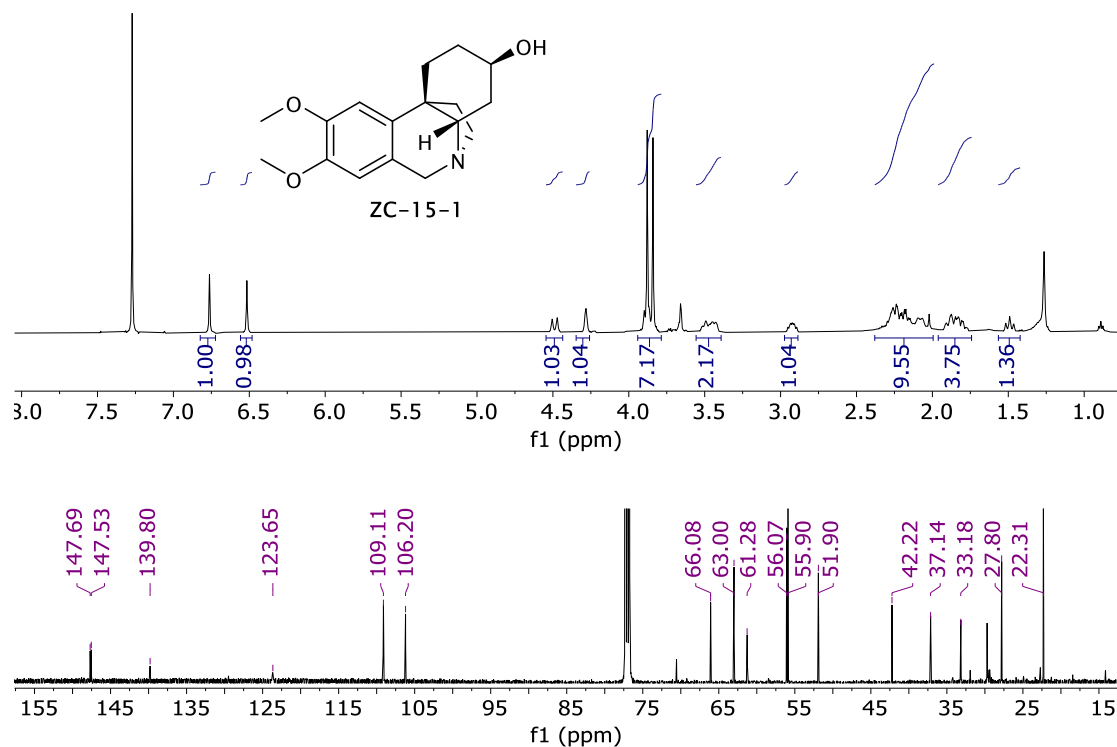
**Obrázek 111** Číslování molekuly **17a** a znázorněné korelace z **NOESY** experimentu

Pro určení orientace stereocenter byly využity možnosti přenosu kros-relaxace prostorem. Zásadní korelace H3 s H4a v NOESY spektru tak definovala orientaci těchto vodíků na stejnou stranu kruhu a korelace poloaminalového vodíku H6 s H12 vodíky ethylenového můstku určila, že tyto vodíky jsou orientovány také na stejnou stranu, tedy opačnou než předchozí dva jmenované. Relativní konfigurace tak odpovídá uspořádání na chirálních uhlících (3S\*,4aS\*,6S\*,10bS\*).

Jelikož v naší laboratoři byly několikrát identifikovány vzorky obsahující směs 10-deoxy-6 $\alpha$ -hydroxyhippeastidinu a 10-deoxy-6 $\beta$ -hydroxyhippeastidinu (krininový typ), můžeme říct, že popisovaný vzorek **17a** je také směs 6R a 6S diastereomerů, neboť spektra jsou srovnatelná. Liší se hlavně chemickými posuny methinové skupiny C3, což je dáno indukčním efektem methoxy skupiny. Nepodařilo se bohužel určit absolutní konfiguraci molekuly, ani od sebe diastereomery oddělit. Nebylo možné ani určit, zda se jedná o enantiomer haemanthaminový nebo krininový (oba typy se nacházejí v *Zephyranthes citrina* Baker). Ač se z principu jedná pouze orientací 5,10b-ethylenového můstku, tak mezi otáčivostí a konfigurací lze těžko hledat souvislost (změřená specifická otáčivost této směsi diastereomerů měla hodnotu +61.2 ° ( $c = 0.17$  g/100 ml, CHCl<sub>3</sub>), což nemá žádnou vypovídající hodnotu), jak je komentováno u dalších alkaloidů tohoto strukturního typu **11a** a **12a**.

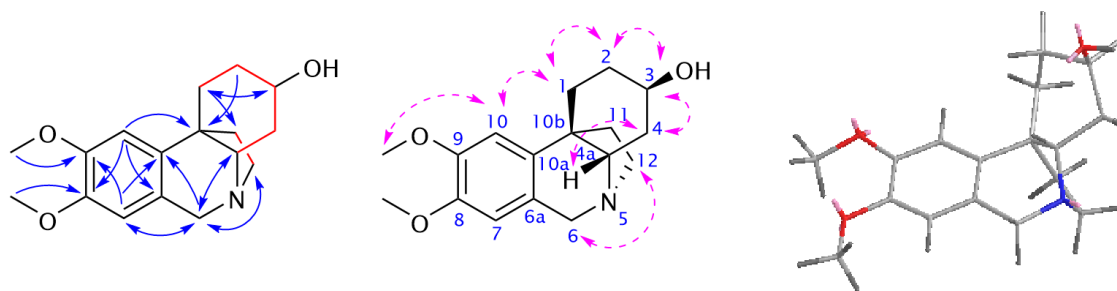
**ZC-15-1 (18a)** $M_r = 289.4$ ;  $m = 6.5$  mg $C_{17}H_{23}NO_3$ 

Pro vzorek ZC-15-1 byla předpovězena struktura dihydromaritidinu dle GC-MS analýzy. Signály v 1D NMR spektrech také napovídaly o přítomnosti fenanthridinu s 5,10b ethylenovým můstkem a dimethoxy substitucí benzenového jádra (Obrázek 112). Bohužel, pro tento alkaloid byla v literatuře nalezena pouze data pro vodíková spektra z let 1978<sup>177</sup> a 1987<sup>178</sup>, měřená v  $CDCl_3$ . Z tohoto důvodu byla provedena NMR analýza v plném rozsahu.



**Obrázek 112** 1D NMR spektra vzorku ZC-15-1 a predikovaná molekula dihydromaritidinu

Pomocí HMBC a COSY experimentů byla potvrzena konstituce dihydromaritidinu. Otázkou dále byla konfigurace stereocenter. Díky korelacím vodíkových atomů v NOESY experimentu a také absencí korelace mezi H3 a H4a bylo možné určit relativní konfiguraci molekuly. Obrázek 113 představuje provedenou identifikaci 2D NMR experimenty.

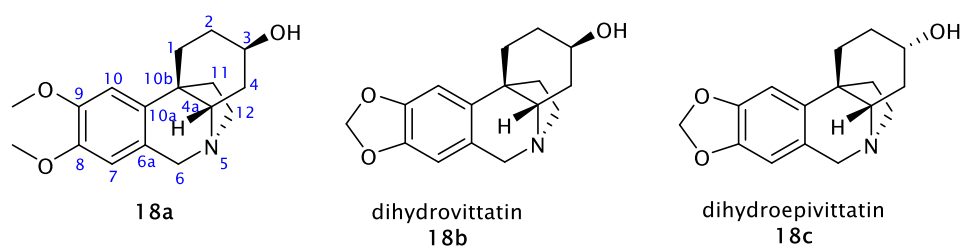


**Obrázek 113** Významné COSY a HMBC korelace jsou představeny na struktuře **18a** vlevo. Uprostřed a vpravo je již definována relativní konfigurace a NOESY korelace jsou znázorněny na modelu s minimalizovanou energií systému z Chem3D®

Pro určení absolutní konfigurace bylo nutné nalézt analytická data podobných struktur, neboť se nepodařilo připravit vzorek pro rentgenovou analýzu. Jako první se nabízí srovnání dat s maritidinem, avšak vliv izolované dvojné vazby cyklohex-2-en-1-olového fragmentu maritidinu je na vodík v allylové pozici příliš velký.

Pro srovnání se ukázaly být vhodnější dioxolová analoga tohoto strukturního typu. Do srovnání byly vybrány alkaloidy, jejichž konstituce i konfigurace byla ověřena enantioselektivní syntézou. Jde o enantiomery a diastereomery: (+)-dihydrovittatin, (-)-dihydrokrinin, (+)-dihydroepivittatin, (-)-dihydroepikrinin.<sup>155</sup> Vzhledem ke změřené specifické otáčivosti **18a** (pravotočivé), byl vybrán do srovnání dihydrovittatin **18b** a jeho C3-epimer dihydroepivittatin **18c** jako modelová struktura, viz tabulka 3-9.

**Tabulka 3-9** Srovnání <sup>13</sup>C chemických posunů **18a** a C3 epimerů hydrogenovaného vittatinu (**18b,18c**)

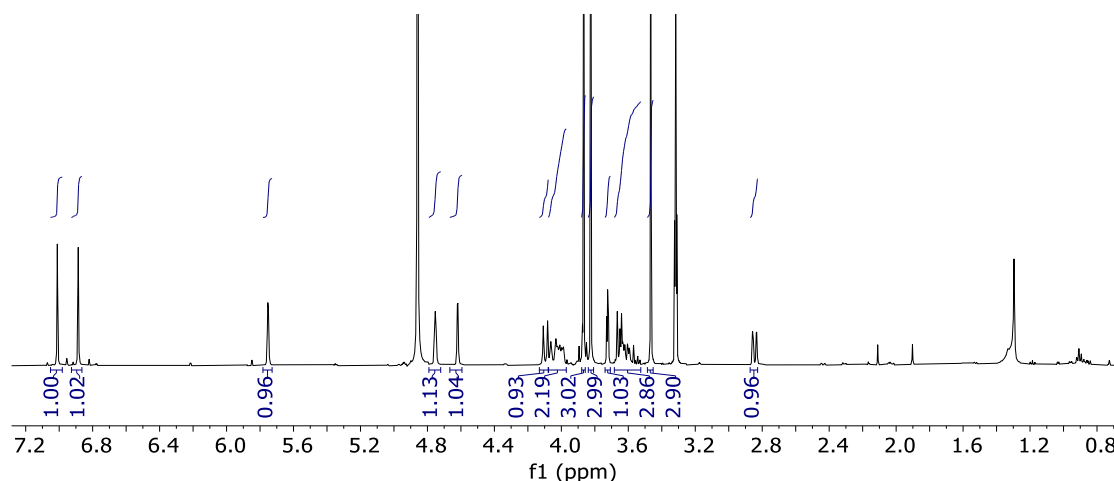


pozice	<b>18a</b>	<b>18b</b>	<b>18c</b>
1	22.3	22.5	26.6
2	27.8	27.8	30.7
3	66.1	65.7	68.5
4	33.2	33.2	36.3
4a	63.0	62.9	66.8
6	61.3	61.6	61.6
6a	123.7	124.8	124.3
7	109.1	106.2	106.4
8	147.5	145.8	146.2
9	147.7	146.4	146.8
10	106.2	103.4	103.6
10a	139.8	141.1	140.5
10b	42.2	42.5	42.5
11	37.1	37.2	37.4
12	51.9	51.9	52.0
8-OMe	55.9	-	-
9-OMe	56.1	-	-
-OCH <sub>2</sub> O-	-	100.8	101.0
[α] <sub>D</sub>	+43.1 ° (c = 0.07 g/100 ml, CHCl <sub>3</sub> , 25 °C)	+22.0 ° (c = 0.70, CHCl <sub>3</sub> , 26 °C)	+10.5 ° (c = 0.70, CHCl <sub>3</sub> , 26 °C)

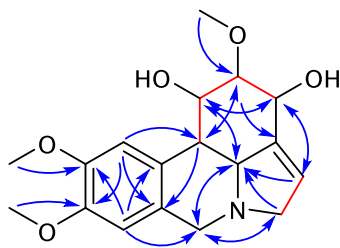
Tímto způsobem byla objasněna struktura (+)-dihydromaritidinu, jakožto alkaloidu haemanthaminového strukturního typu, pro který nebyla dosud zveřejněna <sup>13</sup>C NMR data.

**ZC-15-2 (19a)** $M_r = 333.4$ ;  $m = 6.0$  mg $C_{18}H_{23}NO_5$ 

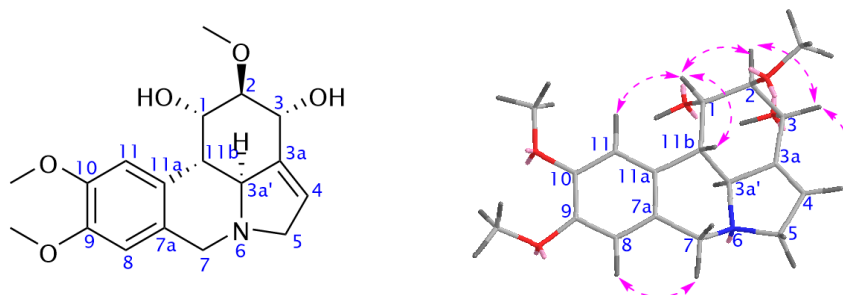
$^1H$  NMR spektrum tohoto vzorku se na první pohled mírně lišilo od výše diskutovaných látek izolovaných z této rostliny. Dva singlety  $\delta_H$  7.01 (H11) a 6.89 (H8) a diastereotopické vodíky s  $^2J = 12.8$  Hz (H7) opět svědčily o přítomnosti tetrahydroisochinolinového fragmentu. Dále byly v  $^1H$  NMR spektru zřetelné multiplety odstíněných vodíkových signálů  $\delta_H$  4.78–4.73 (H1), 4.64–4.60 (H3) a olefinický vodík rezonující při  $\delta_H$  5.78–5.73 (H4), tři singlety patřící methylové substituci kyslíkového atomu  $\delta_H$  3.87, 3.82, 3.47. Signál s nejnižší rezonancí měl posun  $\delta_{H11b}$  2.85 a byl štěpen na dublet dubletů s  $^3J = 11.1$  Hz a  $^3J = 1.9$  Hz. Jelikož látka byla měřena v methanolu- $d_6$  nebylo možné identifikovat dva vodíkové atomy volného hydroxyly. Nicméně dopočítáním  $^1H$  a  $^{13}C$  signálů a molekulové hmoty byl zjištěn sumární vzorec látky v tomto vzorku, u které nebyla predikována struktura.

**Obrázek 114**  $^1H$  NMR spektrum **19a** měřená v  $CD_3OD$ 

Pomocí 2D NMR experimentů byla určena konstituce molekuly s v literatuře dobře známým pyrrolo[3,2,1-*de*]fenanthridinovým skeletem (Obrázek 115). 1D NMR data byla porovnána s dostupnou literaturou. Byla nalezena shoda určené molekuly se známým lykorinovým AA, narcissidinem. Bohužel k tomuto sekundárnímu metabolitu nebyla nalezena adekvátní  $^{13}C$  NMR spektra. Kihara a spol.<sup>179</sup> uvádí bohužel pouze  $^1H$  NMR spektra měřená v  $CDCl_3$  a hodnotu optické otáčivosti  $[\alpha]_D^{22} = -22.5^\circ$  ( $c = 0.58$ ,  $CHCl_3$ ), která je blízká námi naměřené  $[\alpha]_D^{25} = -19.4^\circ$  ( $c = 0.17$  g/100 ml,  $CHCl_3$ ).

**Obrázek 115** Stěžejní HMBC korelace, COSY a H2BC korelace látky **19a**

Jiná nalezená publikace<sup>180</sup> uvádí rentgenovou analýzu monoklonického krystalu získaného z *N*-methylnarcissidin jodidu. Uváděná konfigurace koreluje s relativní konfigurací určenou NOESY experimentem během této identifikace. Tedy, že se H1, H2, H3 nacházejí v ekvatoriální poloze cyklohexanového kruhu, o čemž svědčí NOESY korelace, kdy se přenos jejich kros-relaxace nese jen po spinovém systému. Nízké hodnoty *J*-konstant (pokud jsou vůbec patrné) taktéž odpovídají popisovanému uspořádání. H1 a H11b vykazují slabý krospek v NOESY spektru odpovídající axiálně-ekvatoriální orientaci; H11b a H3a' potom nemají žádnou interakci prostorem, čímž je prokázáno jejich *trans*-diaxiální uspořádání. Zmíněné korelace jsou uvedeny na obrázku 116.

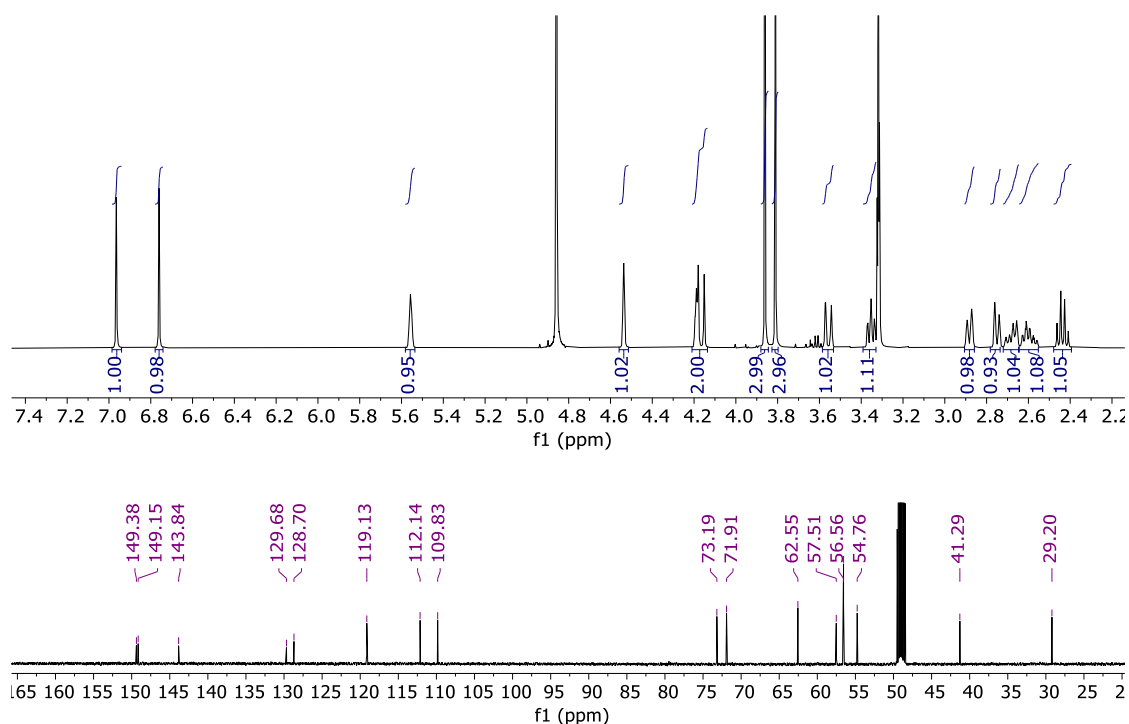


**Obrázek 116** Významné NOESY korelace v molekule narcissidinu

NMR analýzou byla identifikována struktura narcissidinu **19a**, která nemohla být porovnána s publikovanými referenčními NMR spektry.

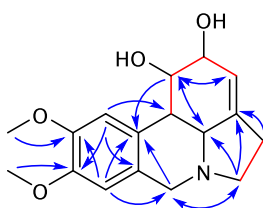
**ZC-15-3 (20a)** $M_r = 303.4$ ;  $m = 8.3$  mg $C_{17}H_{21}NO_4$ 

Vzorek ZC-15-3 neměl při převzetí k NMR analýze žádnou predikovanou strukturu obsažené látky. Rozpustnost v  $CD_3OD$  a molekulová hmotnost definována byla. Jak vyšlo identifikací najevo, jednalo se o alkaloid s lykorinovým skeletem stejně jako v případě **19a**. V 1D NMR spektrech byly patrné signály těchto charakteristických uskupení: dvě methoxy skupiny, 1,2,4,5-tetrasubstituované benzenové jádro (z toho dvakrát substituované elektronegativním kyslíkovým atomem, čemuž odpovídá vysoké odstínění uhlíků 149.4 a 149.2 ppm), izolovaná dvojná vazba (olefinický vodík a dva  $sp^2$ -uhlíky), a další odstíněné alifatické signály a alifatické signály molekuly **19a**, viz obrázek 117.



Obrázek 117 1D NMR spektra vzorku ZC-15-3

Strukturální analýza pomocí 2D NMR experimentů odhalila konstituci alkaloidu lykorinového strukturního typu (Obrázek 118)

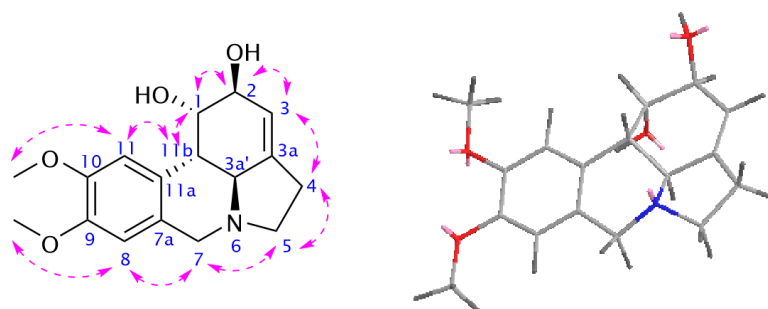
Obrázek 118 Významné korelace z 2D NMR experimentů **20a** (HMBC, COSY)

Při hledání v databázích vědecké literatury byla nalezena interpretace pouze vodíkového NMR spektra látky této konstituce, která byla ve shodě se spektrem **20a** (Experimentální část str. 151).<sup>181</sup> Tato látka se v literatuře vyskytuje pod názvy methylpseudolykorin nebo 9-O-methylpseudolykorin. Pro tuto disertační práci bude použit první z názvů, neboť při zde



použitím číslování (správném dle IUPAC, nikoli vycházejícím z biosyntézy) na methylovaný hydroxyl nepřipadá lokant 9, nýbž 10.

Methylpseudolykorin se od lykorinu liší pouze substitucí benzenového jádra. V případě lykorinu je substituentem 9 a 10 methyendioxy skupina. Lze tedy předpokládat, že konfigurace **20a** bude stejná jako u lykorinu, u něhož byla absolutní konfigurace potvrzena rentgenovou analýzou.<sup>182</sup> Vodíkové spin-spinové štěpení a NOESY korelace (Obrázek 119) ve spektrech **20a** tuto domněnku potvrzují.



**Obrázek 119** Absolutní konfigurace methylpseudolykorinu **20a** s použitým číslováním, znázorněné NOESY korelace a odpovídající struktura s minimalizovanou energií systému v Chem3D® programu

### 3.3 Látky izolované z *Vinca minor* L.

Na Katedře farmaceutické botaniky se na izolaci alkaloidů z barvínku menšího pracuje již delší dobu. Proto je složité uvést přesný počet izolovaných a následně pomocí NMR spektroskopie identifikovaných alkaloidů.

V rámci této práce je komentována identifikace látky **21a** - vinka alkaloidu nového strukturního typu. Dále diskutovaný alkaloid **22a** je v literatuře popisován jako meziprodukt totální syntézy, nikoli jako izolovaný sekundární metabolit rostlinného metabolismu. Strukturu **23a** se nepodařilo nalézt v dostupných databázích literatury, avšak její strukturní motiv je pro vinka alkaloidy dobře známý. Identifikovaná a dosud nepopsaná látka **24a** se řadí mezi bisindolové alkaloidy. Dále jsou popisovány struktury známých alkaloidů **25a–30a**, pro které nebyla publikována referenční NMR spektra.

Současně byly identifikovány dobře známé vinka alkaloidy, jejich analytická data včetně interpretací  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter jsou v literatuře popsána, a bylo tedy možné určit shodu naměřených spekter s daty uvedenými v jednotlivých referencích. Jednotlivé potvrzené alkaloidy jsou rozřazené podle strukturních skupin:

- akuammilinový typ:  
akuammicin,<sup>183</sup> deacetylakuammiline,<sup>118</sup> pikrinin,<sup>121</sup> striktamin,<sup>119</sup> vinoxin,<sup>113</sup>
- aspidofraktininový typ:  
5-oxoaspidofraktinin;<sup>184</sup>
- aspidosperminový typ:  
aspidospermidin,<sup>185</sup> 14,15-dihydrovindolinin,<sup>186</sup> minovin,<sup>110</sup> minovincin,<sup>187</sup>  
minovincinin;<sup>\*188</sup>
- bisindolový:  
vinkarubin;<sup>\*\*129</sup>
- eburnanový (vinkaminový) typ:  
eburnamonin,<sup>189</sup> 19-oxoeburnamonin;<sup>190</sup>
- kebračaminový typ:  
vinkaminorin;<sup>110</sup>
- 2,3-*seco*-aspidosperminový typ:  
vinkatin (izolován ve směsi dvou diastereomerů);<sup>191</sup>
- tubotaiwinový typ:  
tubotaiwin;<sup>192</sup>
- vinkoranový typ:  
demethylalstonamid,<sup>193</sup> vinkorin;<sup>122</sup>
- ostatní z indolových alkaloidů:  
2-ethyl-3-[2-(3-ethylpiperidinyl)ethyl]indol.<sup>194</sup>

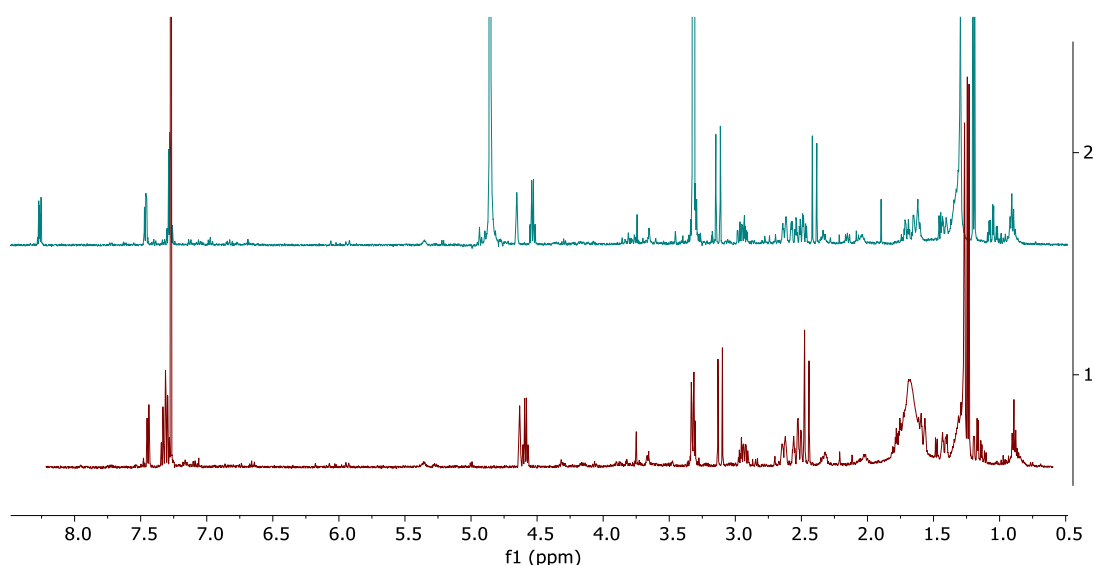
Dále byl izolován také venoterpin,<sup>195</sup> který lze řadit mezi pyridinové pseudoalkaloidy.

\* V obsáhlé publikaci Williamse a spol.<sup>188</sup> se bohužel vyskytuje chyba na obrázcích se zkoumanými alkaloidy. Téměř všechny uvedené struktury pozbývají  $\alpha,\beta$ -nenasycenou vazbu na částečně nasyceném karbazolovém fragmentu molekuly. Nicméně uvedená NMR data odpovídají daným alkaloidům, jedná se jen o grafickou chybu.

\*\* Někteří autoři spekulují původ bisindolových alkaloidů jako produktů sekundárního metabolismu Apocynaceae rostlin.<sup>196</sup>

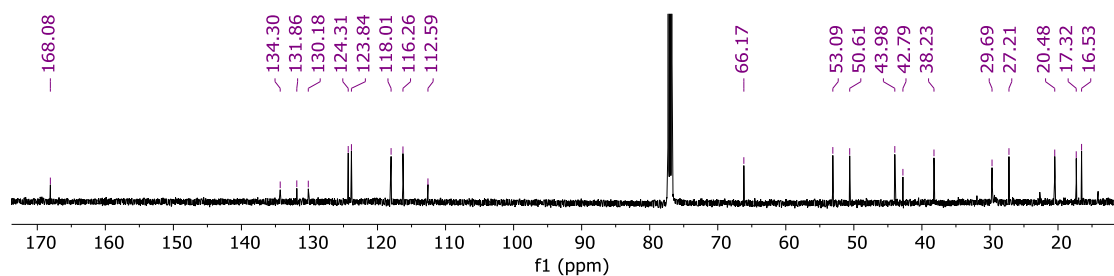
**VM81-93-3 (21a)** $M_r = 310.4$ ;  $m = 3.5$  mg $C_{19}H_{22}N_2O_2$ 

První vzorek z prezentovaných vinka alkaloidů byl získán ve velmi nízké navážce. Byl měřen jak v  $CDCl_3$ , tak v  $CD_3OD$ , protože signál zbytkové vody v prvním zmíněném rozpouštědle překrýval důležité signály chinolizidinových  $CH_2$  skupin (Obrázek 120). Ve spektru jsou zřejmé aromatické signály pro čtyři vodíky 1,2-disubstituovaného jádra, dva odstíněné signály s posunem přes 4.5 ppm, dva dublety diastereotopických vodíků, dublet methylové skupiny, který byl v  $CDCl_3$  částečně překryt signálem tuku, a další alifatické signály blíže nespecifikovaných vodíků.



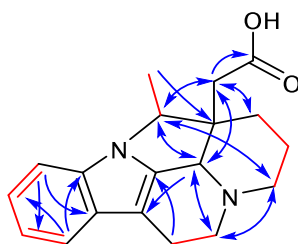
**Obrázek 120**  $^1H$  NMR spektrum **21a** v  $CDCl_3$  a  $CD_3OD$  bylo měřeno 32 skeny pro lepší rozlišení

Uhlíkové spektrum bylo měřeno dostatečně dlouhou dobu po 27 704 skenech vykazovalo uspokojivý poměr signál/šum.



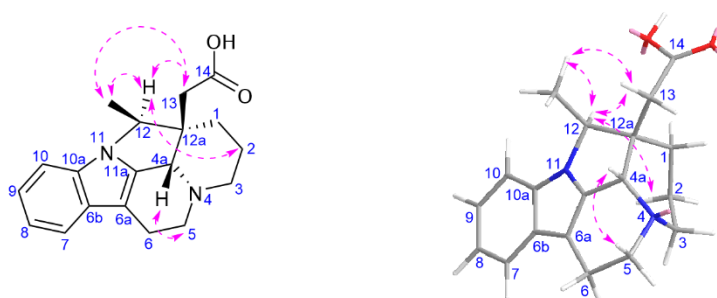
**Obrázek 121**  $^{13}C$  NMR spektrum látky **21a** po 27 704 skenech měřeno v  $CDCl_3$

Jelikož citlivost 2D NMR experimentů je naštěstí vyšší než pro  $^{13}C$  NMR, nebylo příliš problematické určit strukturu látky **21a** (avšak bylo nutné kombinovat výsledky z NMR analýzy v obou rozpouštědlech). Fázově rozlišený HSQC experiment identifikoval šest methylenových skupin, dvě alifatické methinové skupiny a čtyři  $sp^2$ -protonované uhlíkové atomy. COSY experiment pomohl určit spinový systém H5/H6, H1/H2/H3 a methyl vázaný na *N*-methinový uhlík (Obrázek 122).



**Obrázek 122** HMBC a COSY korelace ve spektrech látky **21a** kombinovány jak z měření v  $\text{CDCl}_3$ , tak  $\text{CD}_3\text{OD}$

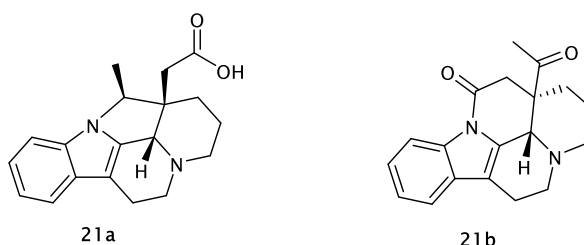
Korelace H12 na C3 v HMBC spekter znamená přenos interakce přes pět vazeb v rámci určené konstituce **21a** (v obou rozpouštědlech), což je spíše neobvyklý nález u těchto polycyklických sloučenin. Nicméně všechny ostatní korelace z tohoto experimentu byly v souladu s určenou strukturou.



**Obrázek 123** Zobrazení NOESY korelací na modelu struktury **21a** s minimalizovanou energií v Chem3D programu s odpovídající relativní konfigurací určenou pomocí krosníků H2/H12, H4a/H5

K určení relativní konfigurace nebylo možné využít skalární interakce kvůli izolovaným spinovým systémům důležitých skupin. Avšak NOESY experiment prokázal interakce mezi *N*-methinovým vodíkem H12 a methylenovou skupinou chinolizidinového fragmentu H2, z čehož vyplývá, že tyto vodíky jsou orientovány na stejnou stranu molekuly – nad rovinu nebo pod rovinu. S tím dále souvisí konfigurace na C4a, protože vodík tohoto uhlíku má v NOESY spektru krosník s H5 methylenové skupiny a žádný další (Obrázek 123).

V databázích nebyla tato ani podobná molekula nalezena. Příbuznou skupinou se jeví být eburnanový strukturální typ v čele s (–)-19-oxo-eburnamoninem **21b**, s nímž identifikovaný alkaloid sdílí i zápornou hodnotu stáčení polarizovaného světla (Obrázek 124).

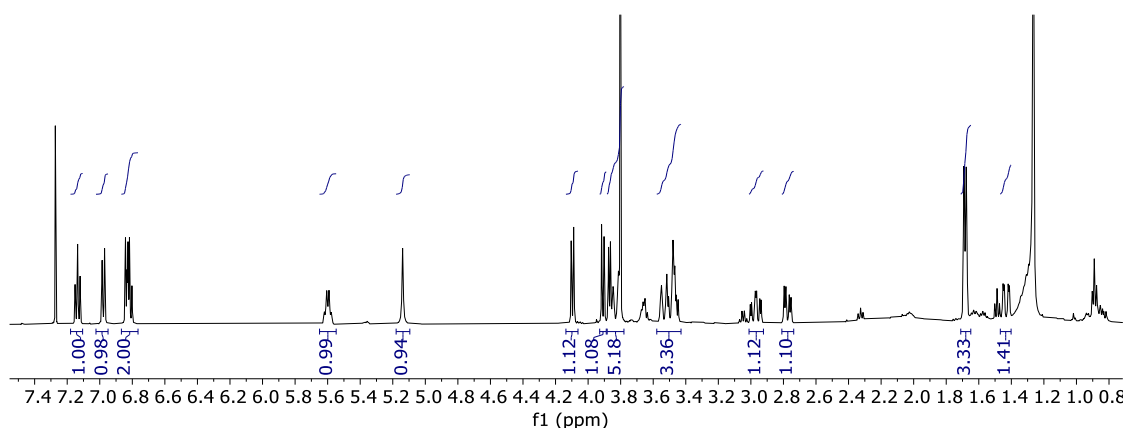


**Obrázek 124** Nově identifikovaný strukturální typ **21a** v porovnání s eburnanovým typem **21b**

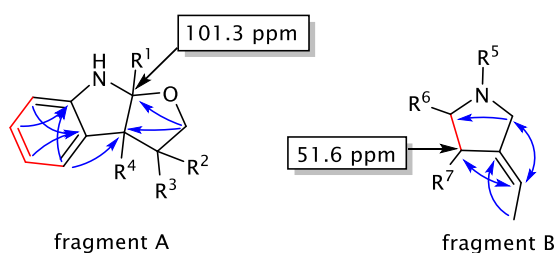
Struktura **21a** se vymyká všem typům dosud izolovaných alkaloidů z barvíčku menšího a jiných druhů čeledi Apocynaceae. Proto bylo použito číslování dle IUPAC nikoli podle biosyntetického hlediska, které se mnohdy liší podle volby autora.

**VM-11-4-4 (22a)** $M_r = 366.4$ ;  $m = 7.8$  mg $C_{21}H_{22}N_2O_4$ 

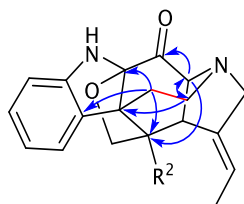
Ke vzorku VM-11-4-4 nebyl predikován žádný alkaloid. Z  $^1H$  a  $^{13}C$  NMR spekter této látky bylo zřejmé, že molekula bude obsahovat 1,2-disubstituované jádro, keton, ethylenovou skupinu, odstíněnou methylenovou skupinu  $\delta_{C17}$  79.1 a kvarterní uhlík s charakteristickým posunem  $\delta_{C2}$  101.3, což odpovídá odstínění alespoň dvěma heteroatomy. Další ze signálů nebyly tolik specifické. Nicméně již při pohledu na vodíkové spektrum je pravděpodobné, že molekula bude patřit spíše k méně komplikovaným strukturám vinka alkaloidů (Obrázek 125).

**Obrázek 125** Vodíkové spektrum vzorku VM-11-4-4

Pomocí 2D NMR experimentů byla postupně určena konstituce molekuly **22a**. Vzhledem k napojení indolinu na zbytek molekuly přes kvarterní  $sp^3$ -uhlíky nebyl tento úkol nejjednodušší. Krosníky v HMBC spektrech značily napojení indolinového jádra s tetrahydrofuranovým cyklem (fragment A). V souladu s těmito důkazy byl chemický posun poloaminaletherového uhlíku  $\delta_{C2}$  101.3. Fragment B byl ze spekter identifikován jako 3-ethylenpyrrolidin. Zmíněné popisuje obrázek 126.

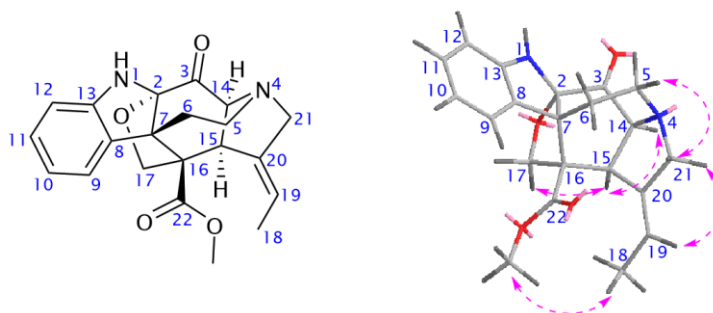
**Obrázek 126** Určené fragmenty molekuly **22a** s vyznačenými korelacemi z HMBC a COSY experimentů

Obdobným způsobem bylo identifikováno propojení těchto fragmentů ethylenovým můstkem v pozici  $R^4$  a  $R^5$ . Krosníky v HMBC experimentu vodíků methylenoxy skupiny a uhlíku  $\delta_{C15}$  51.6 prokázaly propojení pozice označené  $R^3$  a  $R^7$  (Obrázek 127). Karbonylový uhlík  $\delta_{C3}$  193.3, který byl korelován vodíkovým atomem skupiny NCH a ukázal se tak být substituentem jak  $R^1$ , tak  $R^6$ . Vodík zmíněné methinamino skupiny měl také korelaci přes tři vazby na další z kvarterních uhlíků v rámci nově utvořeného cyklohexanonového kruhu, u kterého ještě nebyl komentován zbývající substituent  $R^2$  (Obrázek 127).



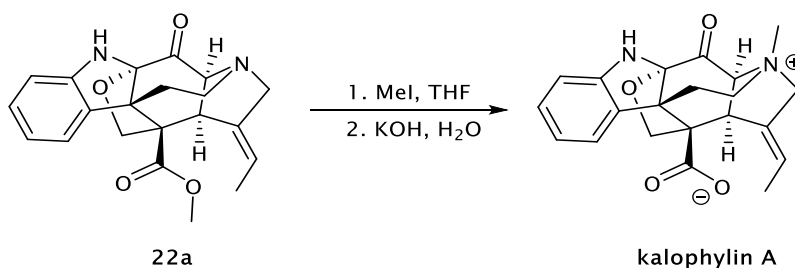
**Obrázek 127** Propojení fragmentů A a B s vyznačenými korelacemi z HMBC a COSY experimentů

Zbývala methylesterová skupina jako R<sup>2</sup> substituent, u kterého nebyly pozorovány žádné interakce přes více vazeb, což vazbě karboxylu na kvarterní uhlíkový atom vysvětluje. U takto polykondenzovaného systému bylo možné určit relativní konfiguraci, viz obrázek 128.



**Obrázek 128** NOESY korelace vodíkových atomů látky **22a**

Identifikovaná struktura byla porovnána s dostupnými molekulami v databázích a byla nalezena shoda s NMR daty. Překvapivě šlo o meziprodukt syntézy alkaloidu kalophylinu A, nikoli o dříve izolovaný rostlinný metabolit (Obrázek 129).<sup>120</sup>



**Obrázek 129** Identifikovaný alkaloid **22a** jako meziprodukt totální syntézy kalophylinu A<sup>120</sup>

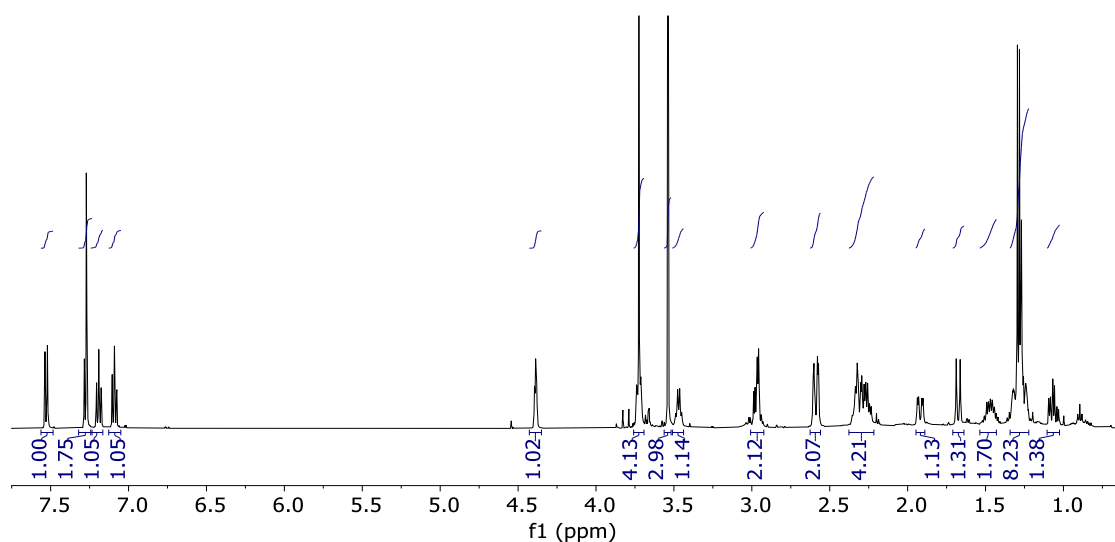
Jak **22a** tak kalophylin A se řadí k novému strukturnímu typu Apocynaceae alkaloidů s propojením N4-C14. Li-Mei a spol.<sup>197</sup> jej jako první izolovali z rostliny *Winchia calophylla* A. DC. (Apocynaceae), strukturu popsal jak pomocí NMR analýzy, tak pomocí rentgenové krystalografie, ze které byla potvrzena absolutní konfigurace (2*S*,4*S*,7*S*,14*S*,15*S*,16*R*). Navržena byla také pravděpodobná biosyntetická cesta transformace rhazimolu na kalophylin A (zde se meziprodukt **22a** nevyskytuje). To zaujalo tým Hudsona a spol.,<sup>198</sup> kteří osvětlili kvantovými výpočty Li-Meiovu navrženou biosyntézu s tím, že představili jinou alternativní biogenezi (pozn. na karboxylu kalophylinu A je chybně zachována methylová skupina). Právě posledním meziproduktem Hudsonovi alternativní cesty je námi identifikovaná molekula **22a**, která byla o pár let později připravena ve zmíněné totální syntéze kalophylinu A, jejíž referenční NMR spektra se shodují s námi naměřenými.<sup>120</sup>

Spoluprací s Katedrou farmaceutické botaniky byla tedy prokázána existence **22a** jakožto sekundárního metabolitu *Vinca minor* L, ačkoli literatura zná tuto látku pouze jako meziprodukt syntézy Apocynaceae alkaloidu.

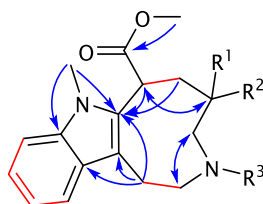


**RV-010b1 (23a)** $M_r = 370.5$ ;  $m = 9.3$  mg $C_{22}H_{30}N_2O_3$ 

K tomuto vzorku byla známa jen molekulová hmotnost a velikost navážky, nikoli predikce struktury obsažené molekuly. Analýzou HSQC spektra bylo zřejmé, že struktura RV-010b1 má 1,2-disubstituované aromatické jádro, dvě odstíněné methylové skupiny  $\delta_H$  3.72 ( $\delta_C$  52.7) a  $\delta_H$  3.54 ( $\delta_C$  30.3), odstíněný vodík methinové skupiny  $\delta_H$  4.39 ( $\delta_C$  38.7), odstíněnou *O*-methinovou skupinu  $\delta_H$  3.47 ( $\delta_C$  74.2), pět methylenových skupin s diastereotopickými vodíky ( $\delta_C$  56.6, 53.6, 31.1, 31.8, 22.4), další dvě methylenové skupiny ( $\delta_C$  55.2, 22.4) a dublet methylového signálu  $\delta_H$  1.29 ( $\delta_C$  17.6). Dohromady s informacemi o štěpení signálů z  $^1H$  NMR spektra a o chemických posunech  $^{13}C$  signálů se dalo předpokládat, že ve struktuře je přítomen *N*-methylindolový cyklus, 1-hydroxyethylový fragment navázaný na kvarterní uhlík a methylester. Pro potvrzení konstituce molekuly byly měřeny HMBC, H2BC a COSY experimenty.

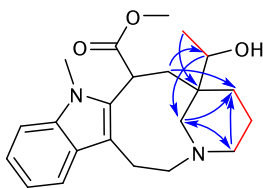
**Obrázek 130** Vodíkové NMR spektrum dosud nepublikované **23a**

V COSY a H2BC spektrech byly identifikovány spinové systémy a v HMBC spektrech bylo určeno provázání jednotlivých fragmentů *N*-methylindolového kruhu a azoninu, zobrazeno na obrázku 131. Devítičlenný kruh kondenzovaný s indolem je typický pro kebračaminový strukturní typ.

**Obrázek 131** HMBC, COSY a H2BC korelace ze spekter látky **23a** zobrazené na methylesteru částečně nasyceného azonino[5,4-*b*]indolu

Substituce kvarterního uhlíku a terciárního dusíku byla určena analogicky. COSY experiment v součinnosti s HMBC experimentem prokázal propojení heteroatomu s  $sp^3$ -uhlíkem

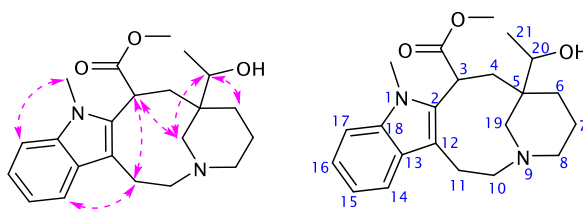
propylenovým můstkem. Zbývajícím substituentem kvarterního uhlíku  $\delta_{C5}$  42.9 byl určen na začátku zmíněný 1-hydroxyethyl, viz obrázek 132.



**Obrázek 132** Konstituce molekuly **23a** se zobrazenými HMBC a COSY interakcemi

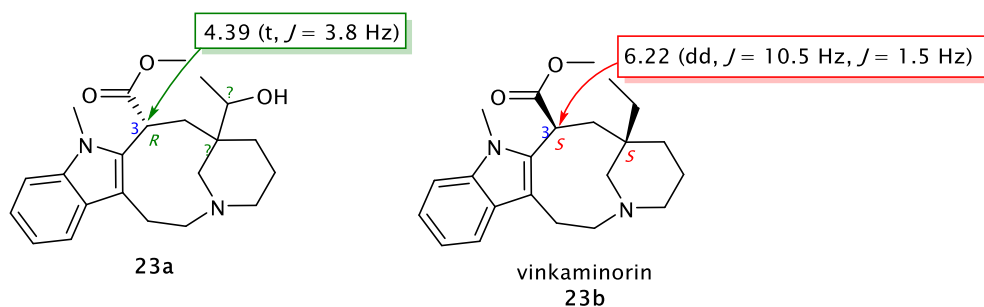
Nebyla nalezena shoda konstituce identifikované látky **23a** s již publikovanými. Bylo tedy snahou určit i relativní konfiguraci molekuly.

Konfigurace na chirálních uhlících a dusíkovém atomu azabicyklododecenu je velice těžko odhadnutelná kvůli množství možných konformací.



**Obrázek 133** Nalezené interakce v NOESY experimentu analyzované látky **23a** a číslování používané pro tento strukturální typ

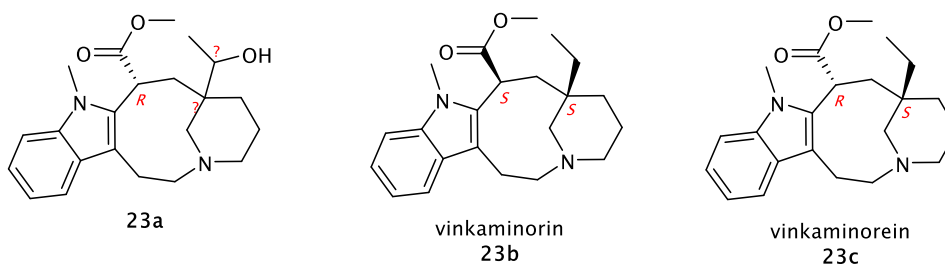
Pro porovnání posunů karboxymethinové skupiny se nabízí struktura vinkaminorinu a vinkaminoreinu (C3-epimer), u kterých lze očekávat rozdílný posun vodíkového atomu v závislosti na anizotropním efektu pseudoaxiálních a pseudoekvatoriálních vazeb. První zmíněný byl připraven totální syntézou aspidosperminových alkaloidů skupinou Tan a spol.<sup>110</sup> a jeho konfigurace byla následně potvrzena rentgenovou analýzou (Obrázek 134). Od látky **23a** se strukturně liší v substituci kvarterního  $sp^3$ -uhlíku C5, u něhož je 1-hydroxyethyl nahrazen ethylem. Chemický posun H3 u syntetizovaného alkaloidu je prezentován jako 6.22 (1H, dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), což je značně odlišné ve srovnání s námi pozorovaným posunem 4.39 (1H, t,  $J = 3.8$  Hz).<sup>110</sup> Rozdíl v těchto posunech napovídá o jiné orientaci této skupiny, tedy více odstíněný vodík H3 pro **23b** v pseudoekvatoriálním uspořádání a vodík H3 v molekule **23a** v pseudoaxiálním uspořádání. Porovnání  $^{13}C$  chemických posunů je uvedeno v tabulce 3-10.



**Obrázek 134** Srovnání chemického posunu H3 identifikované látky **23a** a vinkaminorinu **23b**, který má absolutní konfiguraci potvrzenou rentgenovou analýzou (směs enantiomerů)<sup>110</sup>

Farahanikia a spol.<sup>95</sup> uvádí izolaci a identifikaci obou zmíněných epimerů. Chemický posun H3 uhlíku u vinkaminorinu **23b** uvádí shodně s Tanem<sup>110</sup> jako 6.22 (multiplet), ale u vinkaminoreinu je uveden posun 1.93–1.96 ppm pro tento vodík, což je velice atypické pro  $\alpha$ -vodík (celá interpretace  $^1\text{H}$  NMR spektra vinkaminoreinu je zvláštní). Proto byly vyhledány další látky pro srovnání.

**Tabulka 3–10** Srovnání  $^{13}\text{C}$  chemických posunů pro novou látku **23a**, C3 epimerů – přírodního<sup>95</sup> vinkaminorinu **23b** a získaného totální syntézou,<sup>110</sup> a vinkaminoreinu **23c**<sup>95</sup>

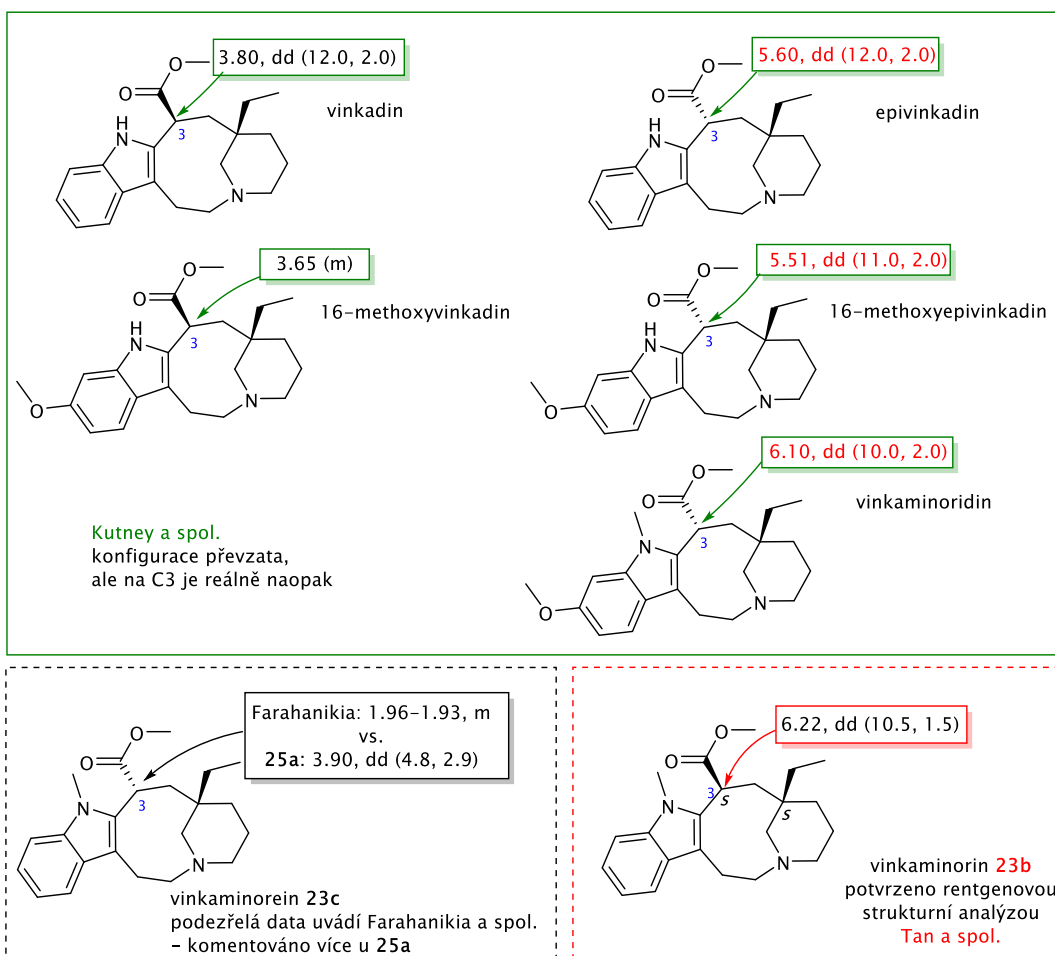


pozice	<b>23a</b>	<b>23b</b> <sup>95</sup>	<b>23c</b> <sup>95</sup>
2	139.1	138.8	139.3
3	38.7	40.3	33.8
4	31.1	40.4	22.5
5	42.9	26.3	24.8
6	31.7	36.5	31.0
7	22.3	28.1	22.3
8	55.2	55.0	53.3
10	53.6	55.5	55.3
11	22.3	37.1	34.2
12	110.3	114.0	110.0
13	127.0	128.8	127.1
14	118.1	119.6	118.0
15	118.5	122.4	120.6
16	120.7	120.1	118.5
17	108.6	110.1	108.6
18	136.7	138.3	136.7
19	56.6	62.3	57.9
20	74.2	15.6	14.2
21	17.6	8.8	7.4
C=O	177.0	176.4	175.2
3-COOCH <sub>3</sub>	52.7	53.6	52.5
NCH <sub>3</sub>	30.3	32.3	30.2

Tan a spol.<sup>110</sup> uvádí uhlíkové rezonance bez přiřazení pozicím ve struktuře **23b**:  
 $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 174.9, 137.4, 136.9, 127.4, 121.0, 118.8, 118.2, 112.0, 108.7, 60.9, 54.2, 53.6, 52.1, 39.0 (2 $\times$  C), 35.8, 35.1 (2 $\times$  C), 30.9, 26.7, 23.1, 7.4.

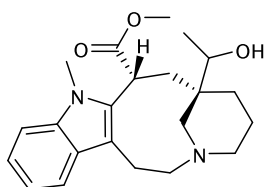
Další strukturně velmi podobné látky byly syntetizovány a popsány v práci Kutneyho (70. léta).<sup>111</sup> Jak již bylo komentováno v úvodu (str. 50) identifikoval jednotlivé alkaloidy s opačnou konfigurací na C3 než je ve skutečnosti, což je podepřeno výsledkem rentgenové analýzy vinkaminorinu od Tana a spol.<sup>110</sup> Když si uvědomíme, že všechny alkaloidy prezentované v jeho práci mají opačnou konfiguraci na tomto uhlíku, lze z této práce použít pár zajímavých a užitečných informací.<sup>111</sup>

Konfigurace 3*S* shodná s **23b** je vázána k vyššímu odstínění H3 (umístěn pseudoekvatoriálně), opačná konfigurace 3*R* pak k odstínění nižšímu. Druhé konfiguraci spíše odpovídá C3 chirální centrum izolované látky **23a**. Vše shrnuje obrázek 135.



**Obrázek 135** Porovnání interpretací signálu  $\alpha$ -vodíku látek kebračaminového strukturního skeletu. V práci Kutney a spol.<sup>111</sup> je pro uvedené látky konfigurace na C3 zjevně opačná, jak vyplývá ze srovnání s vinkaminorinem **23b**, jehož absolutní konfigurace byla potvrzena rentgenovou analýzou. Uveden je i diastereomer **23c**, který však není relevantním důkazem, jak je dále diskutováno u **25a**

Z výše popsaného plyne, že konfigurace na C3 uhlíku se spíše blíží opačné než u vinkaminorinu **23b**. Určení absolutní konfigurace by pravděpodobně bylo možné pomocí derivatizace Mosherovým chloridem, což vzhledem k nedostatku izolovaného materiálu nebylo provedeno.

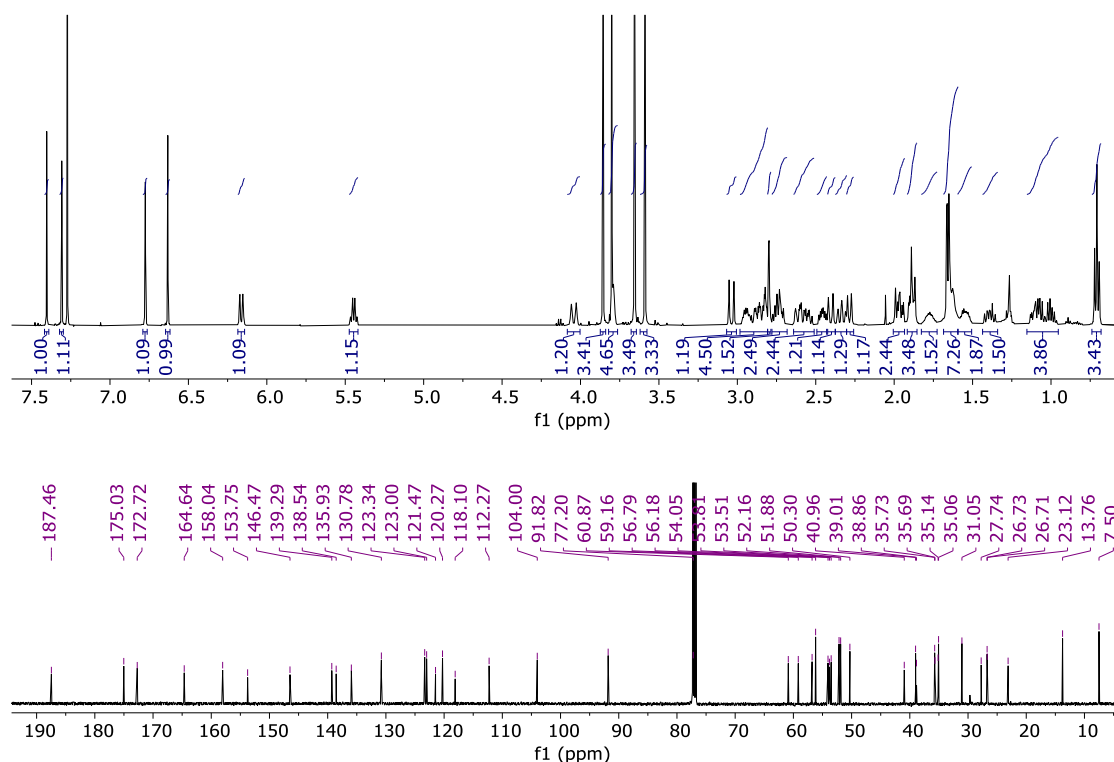


**Obrázek 136** Pravděpodobná relativní konfigurace látky **23a**

Obrázek 136 zobrazuje pravděpodobnou konfiguraci v literatuře nepopsané látky **23a**. Bohužel pro vodík chirální skupiny 1-hydroxyethylu není možné určit pomocí NOESY experimentu vztah ke zbytku molekuly vzhledem k volné rotaci sigma vazby.

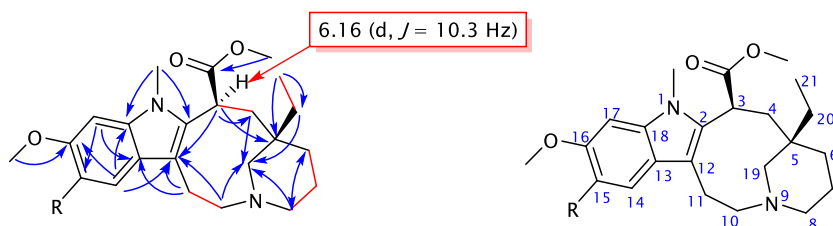
**VM215-258-17-26-4 (24a)** $M_r = 720.9$ ;  $m = 9.5$  mg $C_{43}H_{52}N_4O_6$ 

Pro popisovaný alkaloid **24a** byla naměřena  $M_r$  360 (majoritní pík). Ihned po změření 1D NMR spekter bylo evidentní, že udaná molekulová hmotnost patří štep molekuly a reálný molekulový pík s nižší intenzitou byl nalezen jako 721.39 odpovídající  $[M+H]^+$ , viz obrázek 137. Oblast vyšších frekvencí rezonance obsahovala čtyři singlety, dublet s  $J = 10.3$  Hz a kvartet s  $J = 7.2$  Hz. Z toho bylo možné odhadnout, že molekula pravděpodobně obsahuje dvě 1,2,4,5-tetrasubstituovaná benzenová jádra a ethyldenovou skupinu. V alifatické části byly dobře odlišitelné čtyři signály methoxy skupin a terminální methyl ethyldenového substituentu (typické pro některé vinka alkaloidy).

**Obrázek 137**  $^1H$  a  $^{13}C$  NMR spektra látky **24a**

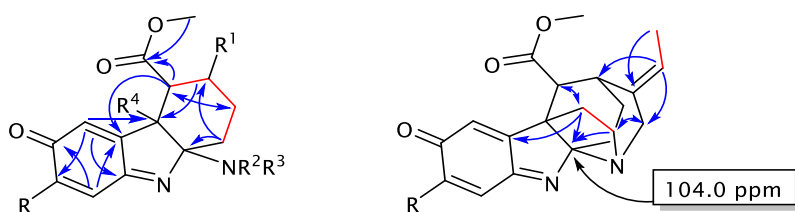
Po přiřazení jednotlivých signálů analýzou spekter fázově rozlišeného HSQC experimentu byly identifikovány tyto zvláštnosti: vysoce odstíněný dublet ( $\delta_{H3}$  6.16,  $J = 10.3$  Hz) měl krosník s methinovým uhlíkem  $\delta_{C3}$  39.0, jedná se tedy o velice odstíněný alifatický vodík; a signál  $\delta_{C11,C14'}$  26.7 odpovídal dvěma uhlíkovým methylenovým skupinám (vztaženo k velikosti integrálu odpovídajících vodíkových signálů).

Pomocí HMBC, H2BC a COSY experimentů byly postupně identifikovány oba indolové fragmenty. Jedním z nich je kebračaminový skelet. Z porovnání chemických posunů  $\alpha$ -vodíků jak je uvedeno u látky **23a**, lze i v případě toho substrukturálního fragmentu určit, že esterová s ethylovou skupinou jsou orientovány *cis* na 1-azabicyklo[6.3.1]dodekanu v kebračaminovém skeletu, viz obrázek 134.



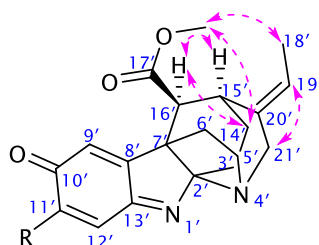
**Obrázek 138** Fragment kebračaminového strukturního typu substituovaný v poloze 16 methoxy skupinou a v poloze 15 druhým indolovým fragmentem. V rámečku je vyznačen chemický posun H3 s charakteristickým posunem pro *cis* konfiguraci ( $3S^*, 5S^*$ )

Vinkoranový strukturní typ byl identifikován ve druhém fragmentu molekuly (Obrázek 139). Z hlediska chemického posunu je zajímavý zejména kvarterní uhlík diaminomethanového uskupení, který je vlivem elektronegativity substituentů odstíněn až k 104.0 ppm. Tento indolový fragment, jehož N4 je vázán s C2 lze také nalézt ve struktuře vinkarubinu.<sup>129</sup>



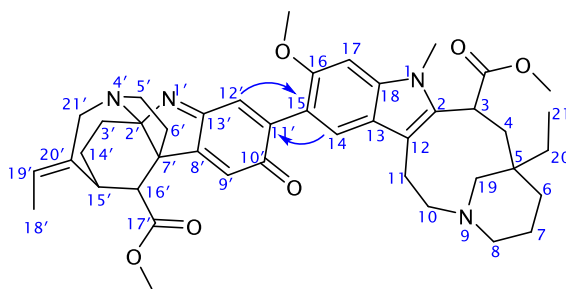
**Obrázek 139** Benzochinoniminový substrukturální fragment (vlevo) a celá vinkoranová část (vpravo) látky **24a** s vyznačenými korelacemi z **HMBC**, **H2BC** a **COSY** experimentů

Nízkou hodnotou *J*-konstanty mezi  $\alpha$ -vodíkem karboxylu a sousedního methinového vodíku a krospíky v NOESY spektru (znázorněno na obrázku 140) byla určena relativní konfigurace tohoto fragmentu.



**Obrázek 140** **NOESY** korelace vodíků vinkoranového strukturního fragmentu s určenou relativní konfigurací

Propojení určených fragmentů bylo dokázáno interakcí přes tři vazby H14/C11' a H12'/C15 v HMBC experimentu. Bohužel kvůli vzdálenosti chirálních center nebylo možné určit relativní konfiguraci celé molekuly, ale pouze pro výše komentované fragmenty.



**Obrázek 141** Struktura molekuly **24a** s vyznačeným číslováním a **HMBC** korelacemi H14/C11' a H12'/C15, pomocí kterých bylo identifikováno propojení dvou indolových jader

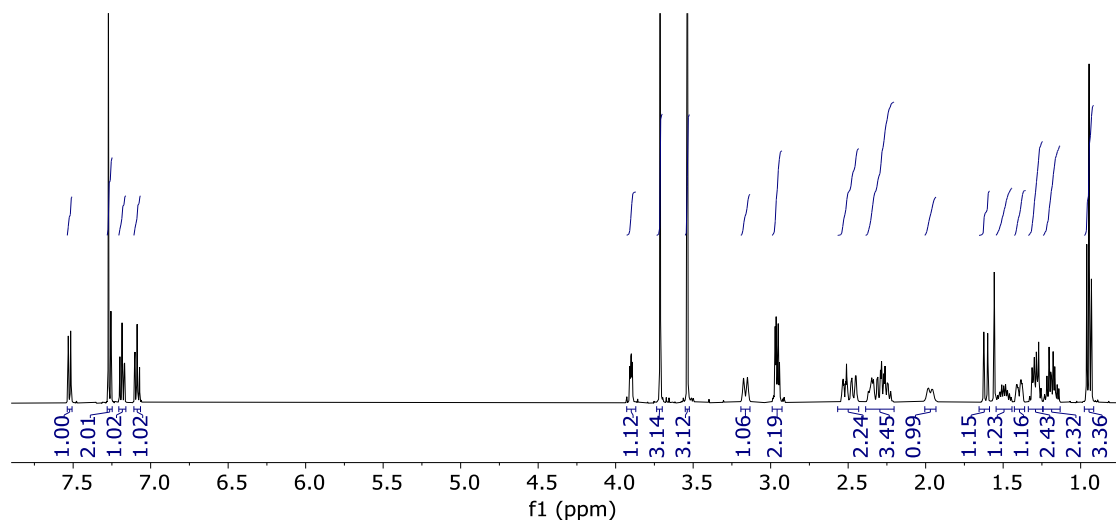
Na první pohled velice komplikovaná struktura byla díky dobře odlišitelným signálům a korelacím identifikována a porovnána s dostupnou literaturou v databázích, kde nebyla nalezena stejná molekula ve dříve publikovaných pracích.

Pro rozšíření analytických dat byla změřena specifická optická otáčivost, jejíž hodnota byla  $-325.6^\circ$  při koncentraci  $c = 0.86 \text{ g/100 ml}$  a  $27^\circ\text{C}$  (měřeno v  $\text{CHCl}_3$ ).



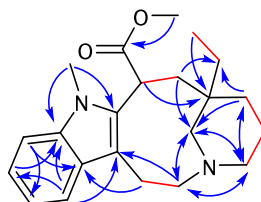
**VM73-110-2 (25a)** $M_r = 354.5$ ;  $m = 5.2$  mg $C_{22}H_{30}N_2O_2$ 

Alkaloid kebračaminového strukturního typu byl identifikován ve vzorku pod kódem VM73-110-2 (**25a**). Z vodíkového spektra je zjevná blízká strukturní příbuznost s **23a** (Obrázek 142).



**Obrázek 142**  $^1H$  NMR spektrum kebračaminového vinka alkaloidu **25a**

Signál terminální methylové skupiny tvaru tripletu při 0.94 ppm a chybící odstíněný multiplet při 3.76–3.70 ppm naznačují strukturní změnu oproti **23a**. Ethyl na C5 totiž není v tomto případě substituován hydroxy skupinou, což bylo potvrzeno 2D NMR experimenty, jak je představeno na obrázku 143.



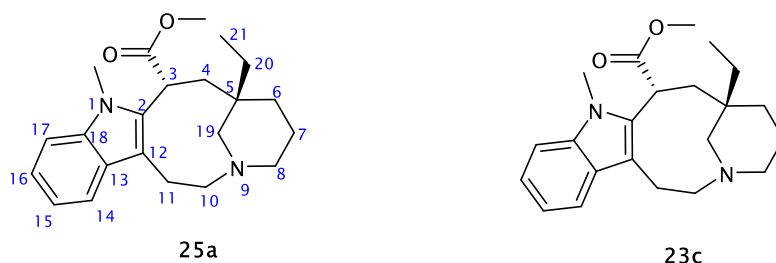
**Obrázek 143** Důležité interakce v HMBC a COSY spektrech látky **25a**

Molekula této konstituce se již objevila v identifikaci látky **23a**, jako **23c** (Tabulka 3-10). Dva chirální uhlíky C3 a C5, tak vnášejí do této molekuly konfigurační izomerii. Vzhledem k posunu H3 vodíku je možné se domnívat, že se jedná o látku s *R*-konfigurací tohoto vodíku, neboť *3S*-izomer se váže k vyššímu odstínění ekvatoriální pozice tohoto vodíku, jak již bylo komentováno u **23a**.

Nicméně porovnání s literaturou nevedlo k jednoznačnému výsledku, viz tabulka 3-11. Opět se jedná o porovnání se článkem týmu Farahanikia a spol.,<sup>95</sup> neboť jako jediný uvádí NMR interpretace vinkaminoreinu v literatuře. Jsou však v rozporu s naší interpretací a přiřazením např. přiřazení pozice C4/C11 a C15/C16 je na první pohled opačná, než je uvedeno, a pravděpodobně stejná situace je u C6/C20. Rozpory se nacházejí jak ve vodíkovém, tak uhlíkovém spektru (např.  $^{13}C$  chemický posun 14.2 pro C20 nelze najít

ani u vinkaminorinu získaného totální syntézou **23b** ani u naší **25a**, ač se jedná o diastereomery). Je to další důkaz nevěrohodnosti tohoto několikrát citovaného a v této disertační práci komentovaného článku.

**Tabulka 3–11** Porovnání 1D NMR interpretací spekter a přiřazení pro **25a** a publikovaný vinkaminorein **23c**.<sup>95</sup> Barevně jsou zvýrazněné největší rozdíly v posunech uhlíků

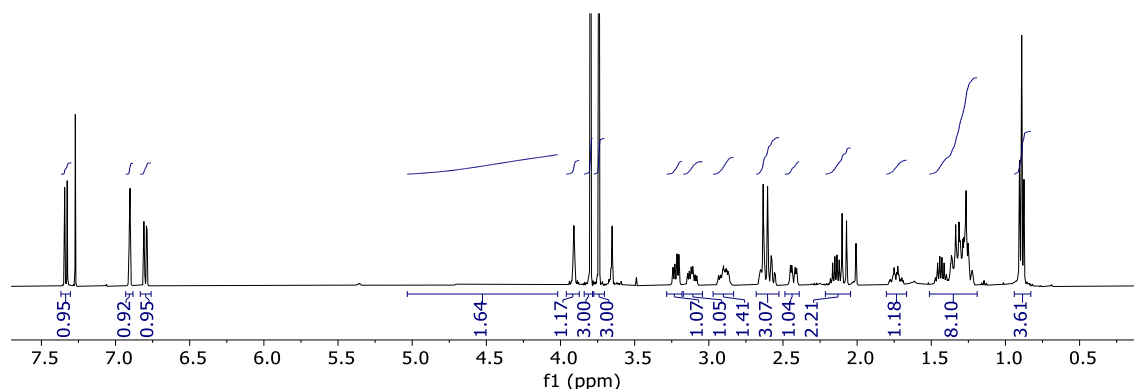


pozice	$\delta_c$ 25a	$\delta_H$ 25a	$\delta_c$ 23c <sup>95</sup>	$\delta_H$ 23c <sup>95</sup>
2	139.3		139.3	
3	38.1, překryv	3.90, dd (4.8, 2.9)	33.8	1.96–1.93, m
4	33.9	2.46, dd (13.7, 2.8) 1.97, d (13.6)	22.5	2.95–2.93, m
5	38.1, překryv		24.8	
6	34.2	1.43–1.36, m 1.24–1.12, m	31.0	1.35–1.30, m 1.20–1.18, m
7	22.5	1.54–1.44, m 1.35–1.24, m	22.3	1.54–1.47, m 1.29–1.25, m
8	55.3	2.38–2.32, m 2.32–2.20, m	53.3	2.51–2.49, m 2.27–2.24, m
10	53.3	2.55–2.50, m 2.32–2.20, m	55.3	2.33–2.29, m 2.29–2.27, m
11	22.3	3.00–2.89, m	34.2	1.41–1.36, m 1.18–1.16, m
12	110.0		110.0	
13	127.1		127.1	
14	118.0	7.50, d (7.8)	118.0	7.50, d (7.1)
15	118.5	7.18, t (7.8)	120.6	7.17, t (7.0)
16	120.6	7.09, t (7.8)	118.5	7.07, t (7.0)
17	108.6	7.26, d (7.8)	108.6	7.24, štěpení neuvedeno
18	136.8		136.7	
19	57.9	3.16, d (12.5) 1.61, d (12.5)	57.9	3.16, d (15.0) 1.61, d (15.0)
20	31.0	1.35–1.24, m 1.24–1.12, m	14.2	1.25–1.20, m
21	7.4	0.95, t (7.5)	7.4	0.93, t (7.2)
C=O	175.2		175.2	
3-COOCH <sub>3</sub>	52.5	3.71, s	52.5	3.70, s
NCH <sub>3</sub>	30.2	3.54, s	30.2	3.52, s
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	+27.6 ° (c = 0.18 g/100 ml, CHCl <sub>3</sub> , 25 °C)		+26.5 ° (CHCl <sub>3</sub> ) <sup>95, 199</sup>	

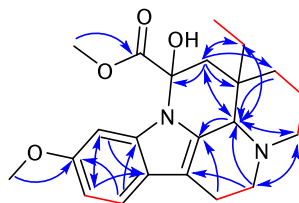
Jediné, co se plně shoduje, je optická otáčivost, kterou Farahanikia uvádí (totožná s otáčivostí uvedenou Mokřým a spol.<sup>199</sup>). Což se však netýká NMR dat vinkaminoreinu. Jistotou je však přiřazení skupin atomů v této disertační práci.

**VM42-48-2 (26a)** $M_r = 384.5$ ;  $m = 14.0$  mg $C_{22}H_{28}N_2O_4$ 

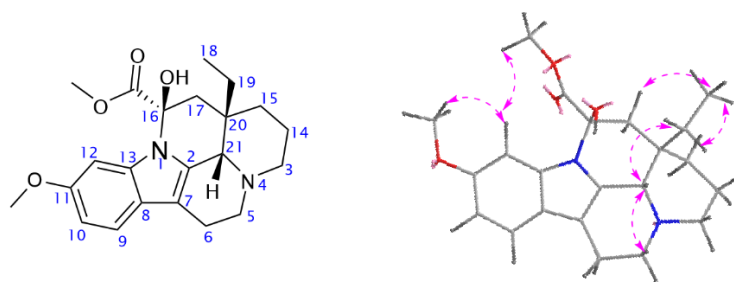
Látka ve vzorku VM42-48-2 bez predikované struktury a s molekulovou hmotností 384 měla pěkné  $^1H$  NMR spektrum. Byla zřejmá přítomnost 1,2,4-trisubstituovaného benzenového jádra, dvou methoxy skupin  $\delta_H$  3.80, 3.74, odstíněného širokého singletu  $\delta_H$  3.91, tripletu terminálního methyly  $\delta_H$  0.89 ethylové skupiny s  $J$ -konstantou 7.6 Hz, přičemž  $CH_2$  vodíky této skupiny byly diastereotopické  $\delta_H$  1.44 (dq,  $J = 15.2$  Hz,  $J = 7.6$  Hz) a  $\delta_H$  2.11 (dq,  $J = 15.2$  Hz,  $J = 7.6$  Hz), což vypovídalo o vazbě na stereocentrum (Obrázek 144).

**Obrázek 144**  $^1H$  NMR spektrum látky **26a**

Pomocí 2D NMR experimentů byla prokázána konstituce eburnanového strukturního skeletu s 11-methoxy substitucí (Obrázek 145).

**Obrázek 145** HMBC, COSY a H2BC korelace látky **26a** s eburnanovým strukturním skeletem

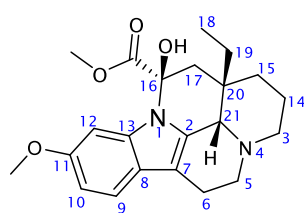
Následná rešeršní práce byla velmi komplikovaná vzhledem k velkému množství publikací starších 50 let a překryvu s pracemi o alkaloidu vinkaminu, který nemá methoxy substituci indolového fragmentu. V těchto publikacích byl často zmiňován vincin, což se ukázal být jiný název pro 11-methoxyvinkamin (i se stejně určenou stereochemií). Nicméně k tomuto alkaloidu bylo možné nalézt, co se NMR dat týče, pouze vodíkové spektrum v práci Štroufa a Trojánka.<sup>200</sup> Pro identifikaci relativní konfigurace byla provedena analýza NOESY spekter. Byly pozorovány krosípky vodíků ethylové skupiny H19 s *N*-methinovým vodíkem H21, avšak žádná NOE interakce s esterovým methylem 16-COOCH<sub>3</sub>, hovořila o konfiguraci představené na obrázku 146.



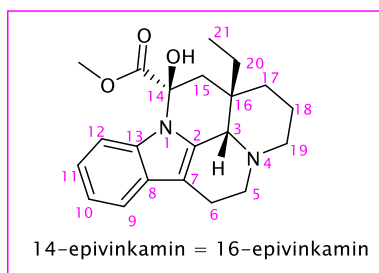
Obrázek 146 Prostorové interakce z NOESY spekter látky 26a

Při dalším bádání byla nalezena struktura 16-epivincinu, která byla v souladu s určenou relativní konfigurací molekuly 26a, a současně v této publikaci byla interpretována  $^{13}\text{C}$  NMR data, která až na posun karboxylového uhlíku korelovala s chemickými posuny  $^{13}\text{C}$  signálů 26a.<sup>201</sup> U těchto látek je opět problematické číslování a z toho odvíjející se názvy totožných látek s různými lokanty, jak bylo komentováno v úvodní části (na obrázku tabulky 3-12).<sup>201</sup>

Tabulka 3-12 Srovnání  $^{13}\text{C}$  chemických posunů 26a publikovaných v práci Neusse a spol.<sup>201</sup> a naměřených. Na strukturách 16-epivincinu a 16-epivinkaminu je znázorněné rozporuplné číslování eburnamoninového typu alkaloidů



16-epivincin  
26a  
Neuss a spol.



14-epivinkamin = 16-epivinkamin

pozice	26a	Neuss a spol. <sup>201</sup>	$\Delta$ naměřené–Neuss
2	129.7	130.6	-0,9
3	44.4	44.4	0
5	50.9	50.9	0
6	16.5	16.5	0
7	105.9	106.0	-0,1
8	122.8	123.1	-0,3
9	118.5	118.4	0,1
10	109.4	109.1	0,3
11	156.0	155.7	0,3
12	97.0	97.4	-0,4
13	136.5	136.4	0,1
14	20.4	20.6	-0,2
15	24.1	24.1	0
16	82.9	83.0	-0,1
17	46.9	47.0	-0,1
18	7.5	7.4	0,1
19	28.9	28.7	0,2
20	36.5	36.1	0,4
21	58.8	58.7	0,1
C=O	172.5	171.2	1,3
COOCH <sub>3</sub>	52.9	53.0	-0,1
11-OCH <sub>3</sub>	55.6	55.7	-0,1

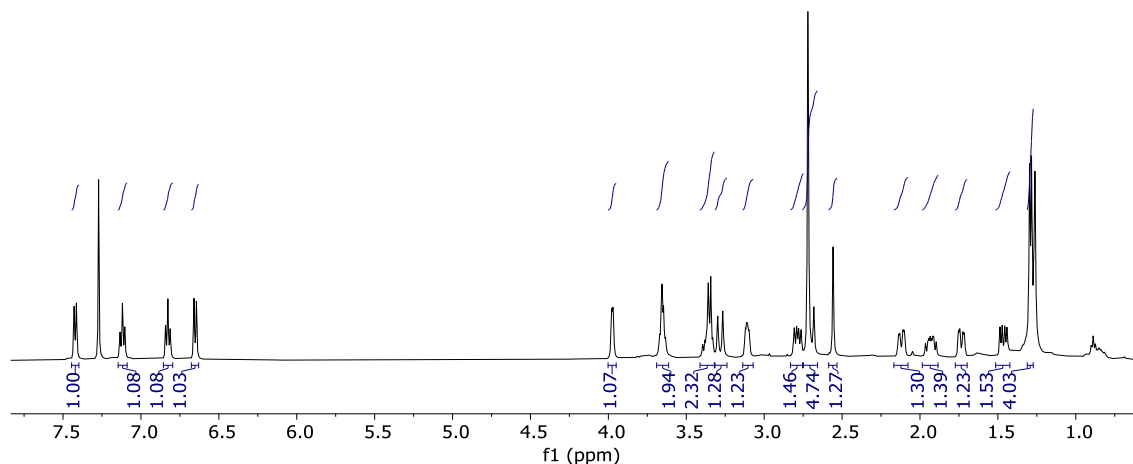
Srovnáním publikované specifické otáčivosti vinkaminu a epivinkaminu lze nalézt korelaci s našimi výsledky a vincinem:

- vinkamin  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.0^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ )<sup>202</sup>,  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +44.0^\circ$  ( $c = 1.4$ , pyridin)<sup>203</sup>
- 16-epivinkamin  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -36.4^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ )<sup>202</sup>
- vincin  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +26.0^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ )<sup>202</sup> (= 11-methoxyvinkamin)
- 16-epivincin  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -29.1^\circ$  ( $c = 0.21$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ ) v této disertační práci.

I přes odchylku v posunu karboxylového uhlíku lze potvrdit molekulu **26a** jako (-)-16-epivincin.

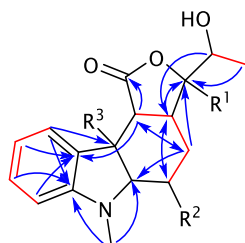
**RV-001a (27a)** $M_r = 340.4$ ;  $m = 12.8$  mg $C_{19}H_{22}N_2O_3$ 

1,2-disubstituované benzenové jádro bylo rozeznáno i v 1D NMR spektrech této analyzované struktury **27a** spolu s *N*-methylem, 1-hydroxyethylem, karboxylovým uhlíkem  $\delta_C$  177.2 a heteroatomem odstíněným kvarterním uhlíkem  $\delta_C$  90.6.



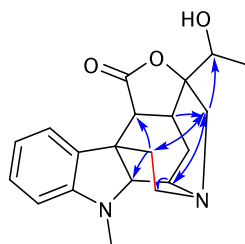
**Obrázek 147**  $^1H$  NMR spektrum látky **27a** zobrazující mimo jiné signály 1,2-disubstituovaného aromatického jádra a *N*-methylové skupiny

Jednotlivé skupiny částečně nasyceného furo[3,4-*c*]karbazolu byly pomocí heteronukleárních 2D NMR experimentů postupně propojeny, viz obrázek 148. Identifikované uskupení laktonového s 1-hydroxyethylovou substitucí je velice atypické.



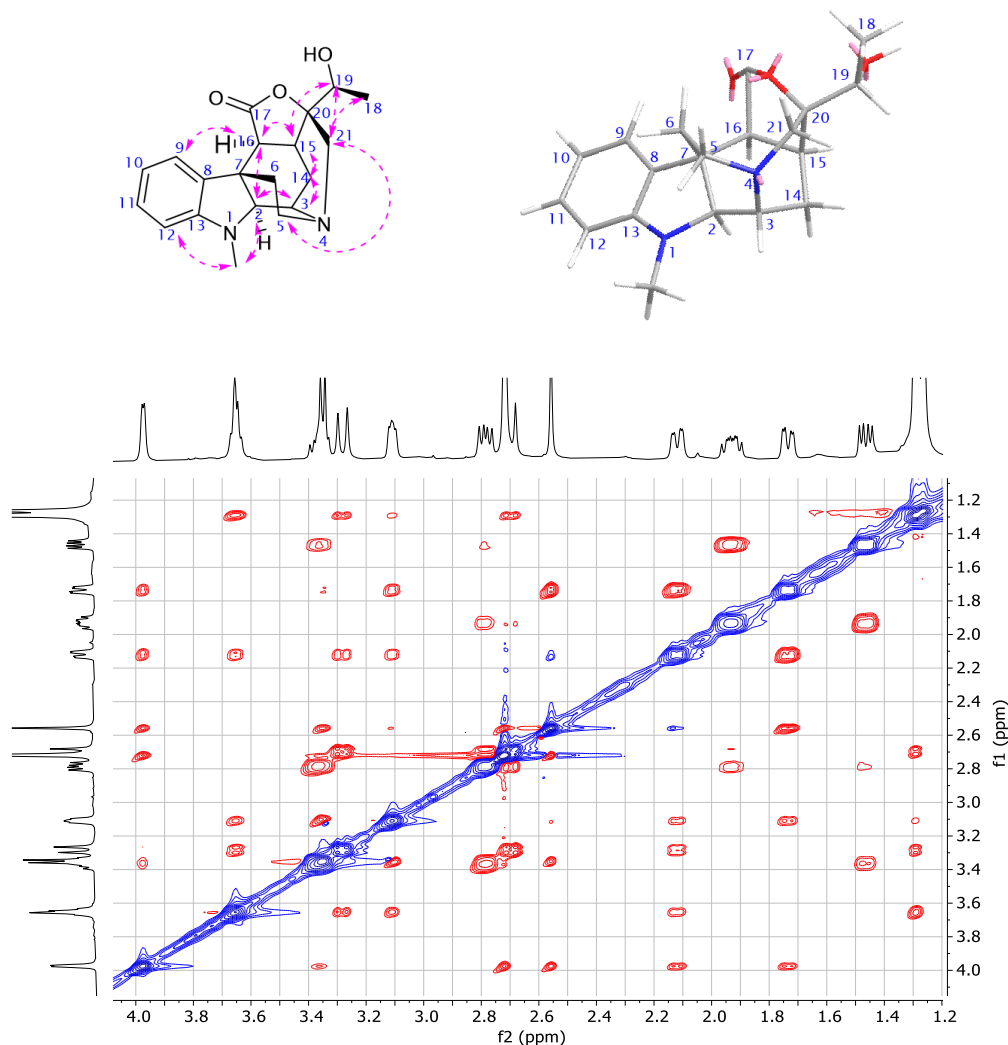
**Obrázek 148** HMBC a H2BC korelace atomů fragmentu **27a**

Odpovídající chemické posuny zbývající methylenové a ethylenové skupiny svědčily o napojení na druhý dusíkový atom ( $R^2$ ) do komplikovanější hexacyklické struktury látky **27a**, což bylo prokázáno opět 2D NMR experimenty (Obrázek 149).



**Obrázek 149** HMBC a H2BC korelace atomů látky **27a** pikralinového strukturního typu

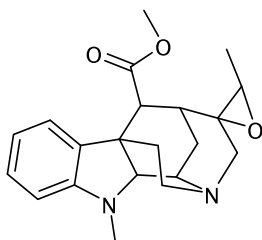
Pomocí NOESY experimentu bylo možné přiblížit relativní konfiguraci, která korelovala s velikostí spin-spinové interakce v systému H2 ( $\delta_{\text{H}}$  2.56, s) / H3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.97, d,  $J = 4.6$  Hz) a H15 (1H, m) / H16 ( $\delta_{\text{H}}$  3.35, d, překryv,  $J = 8.0$  Hz) odpovídající *cis*-uspořádání vodíků na těchto spojích.



**Obrázek 150** Určení relativní konfigurace molekuly **27a** se zobrazenými NOESY korelacemi a alifatickou částí 2D NOESY spektra. Na struktuře je zobrazeno číslování používané pro tento typ alkaloidu

V databázích vědecké literatury byla nalezena shoda konstituce molekuly **27a** hned s dvěma popsanými alkaloidy: raukubain izolovaný z *Rauwolfia salicifolia*<sup>204</sup> a quaternolin izolovaný z *Alstonia quaternata*.<sup>205</sup> Izolaci druhého jmenovaného alkaloidu popisuje Jacquier a spol.<sup>206</sup> ve svém článku i z jiného druhu *Alstonia* (*Alstonia plumosa*). Bohužel ani v jednom případě nebyly publikovány interpretace <sup>13</sup>C NMR dat. Pro raukubain byla prvně popsána data z rentgenové krystalografie provedené kanadskými vědci,<sup>204</sup> a také CD spektra spolu s <sup>1</sup>H NMR daty v rámci práce česko-kubánské spolupráce.<sup>207</sup> Quaternolin popsali Francouzi pomocí IČ spektra a retenčního faktoru.<sup>205</sup> V práci Sierra a spol.<sup>207</sup> je pak komentováno porovnání derivátů těchto alkaloidů, ke kterým byla dostupná adekvátní data (<sup>1</sup>H NMR spektra v C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>; MS; IČ; UV). Výsledkem porovnávání je tvrzení, že se jedná pravděpodobně o diastereomery na C19 a/nebo C20. Příčinou pak může být odlišný prekurzor syntézy, a to quateroxin **27b** a raukubainin **27c** (Obrázek 151), na jejichž oxiranovém kruhu dojde

k nukleofilnímu ataku karboxylátového aniontu na kvarterní uhlík tohoto spirocycklického fragmentu.



27b a 27c

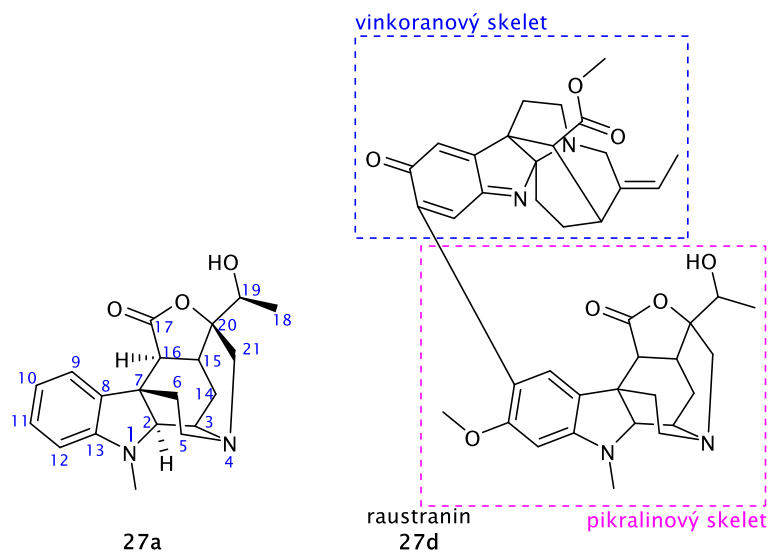
**Obrázek 151** Konstituce quaternoxinu **27b** a jeho stereoizomeru raukubaininu **27c** (prekurzory)

Nicméně porovnáním  $^1\text{H}$  NMR spektra raukubaininu **27c** a naměřeného vodíkového spektra je patrná shoda chemickým posunů zkoumané látky.<sup>207</sup> Avšak nelze potvrdit popisovanou absolutní konfiguraci ( $2R,3S,7R,15R,16R$ ), kde navíc chirální centra C19 a C20 nejsou vůbec komentována, protože námi popisovaný alkaloid měl naměřenou  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +14.9^\circ$  ( $c = 0.19 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ;  $\text{CHCl}_3$ ) oproti publikovanému  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18.0^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ).<sup>207</sup> Je tedy pravděpodobné, že se jedná o enantiomer. Toto tvrzení by bylo potřeba potvrdit daty z rentgenové krystalografie.

V molekule bisindolového alkaloidu rausutraninu byl popsán substrukturální fragment, který byl pojmenován kaberoлин a má podobnou konstituci jako **27a** (rozdíl je jen v substituci aromatického jádra indolinu).<sup>208</sup> V práci uvedená  $^{13}\text{C}$  NMR data odpovídajícího pikralinového fragmentu korelují s naší interpretací uhlíkových chemických posunů (samozřejmě vyjma aromatického kruhu, který je ovlivněn zejména mezomerním efektem 11-OCH<sub>3</sub> substituce).<sup>208</sup>



**Tabulka 3-13** Obrázek molekuly **27a** a rausutraninu **27d** – bisindolového alkaloidu s vinkoranovým fragmentem (propojení N4–C2) a pikralinovým fragmentem (propojení N4–C3). Tabulka pak uvádí srovnání  $^{13}\text{C}$  NMR látky **27a** a pikralinového fragmentu z popsané látky **27d**<sup>208</sup>

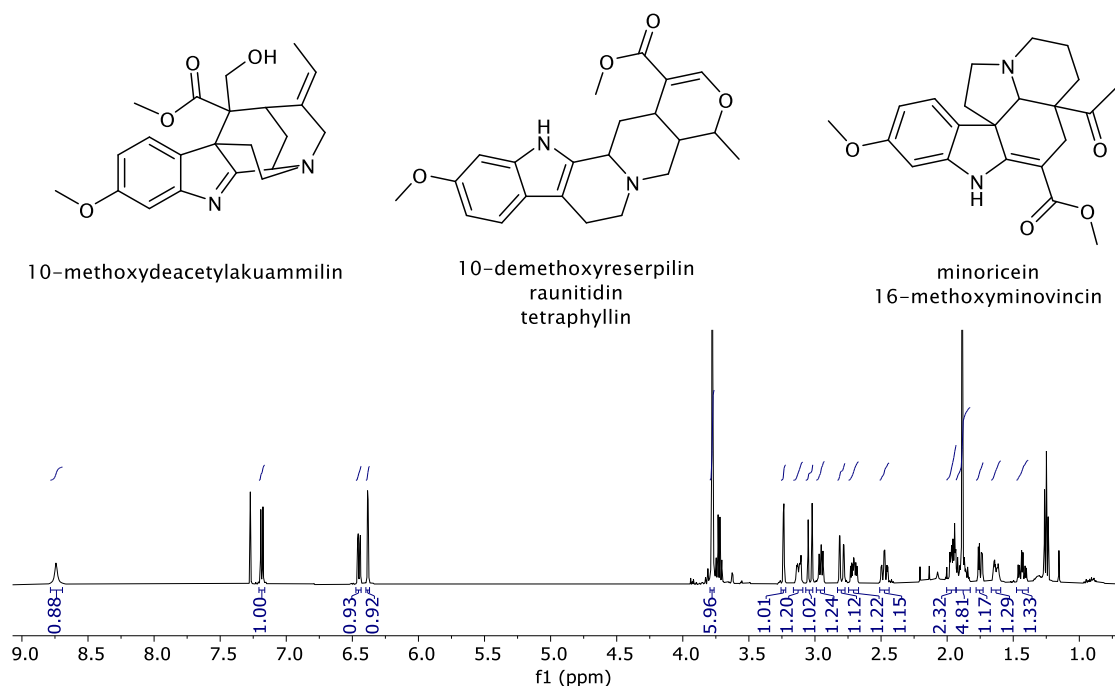


pozice	<b>27a</b>	<b>27d</b> <sup>208</sup>
2	78.6	78.7
3	45.8	46.0
5	50.4	50.4
6	33.6	33.9
7	40.7	40.3
8	141.4	133.6
9	120.6	122.4
10	120.1	115.8
11	127.0	157.3
12	109.6	94.8
13	153.1	155.3
14	30.0	30.2
15	32.2	32.2
16	48.4	48.4
17	177.2	177.0
18	17.2	17.3
19	68.8	68.8
20	90.6	90.6
N1-CH <sub>3</sub>	52.9	53.8
11-OCH <sub>3</sub>	-	56.1

Byla určena konstituce látky, která již byla publikována pod názvy quaternolin a raukubain (pravděpodobně vzájemné diastereomery). Vzhledem k tomu, že od raukubainu byla zveřejněna  $^1\text{H}$  NMR data a shodují se s naší interpretací, je možné potvrdit i konfiguraci navrhnutou ve zmiňované publikaci.<sup>207</sup> S tímto článkem se neshoduje hodnota specifické optické otáčivosti, jejíž hodnota je opačná od námi zjištěné. Lze tedy předpokládat, že identifikovaná látka **27a** je enantiomerem, tedy (+)-raukubainem s konfigurací (2*S*,3*R*,7*S*,15*S*,16*S*,19*S*,20*R*). Určitě by bylo vhodné rozšířit publikovaná data o  $^{13}\text{C}$  NMR interpretace a ověřit absolutní konfiguraci rentgenovou analýzou monokrystalu.

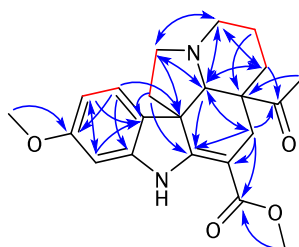
**RV-010a (28a)** $M_r = 382.5$ ;  $m = 11.5$  mg $C_{22}H_{26}N_2O_4$ 

Pro vzorek RV-010a byla předpovězena mimo jiné i struktura minoriceinu a 16-methoxyminovincinu na základě MS spektra (382.5). Vodíkové spektrum odhalilo 1,2,4-trisubstituované benzenové jádro, dvě methoxy skupiny, neodstíněný methyl a řadu diastereotopických methylenových vodíků (Obrázek 152). Chemické posuny uhlíkových signálů představily kromě uhlíků benzenového jádra další dva  $sp^2$ -uhlíky, jejichž intenzita signálu nebyla posílena NOE efektem vodíků. Uhlík rezonující při nejvyšší frekvenci byl součástí alifatické karbonylové skupiny ( $\delta_{C_{21}}$  212.1). Jmenované signály tedy ukazovaly na správnost predikce struktury, tedy na minoricein/16-methoxyminovincin.



**Obrázek 152** Struktury predikovaných známých vinka alkaloidů a získané  $^1H$  NMR spektrum vzorku RV-010a

Bohužel se nepodařilo v dostupné literatuře najít interpretaci  $^{13}C$  NMR dat. Proto bylo potřeba potvrdit strukturu a přiřadit jednotlivé atomy pomocí 2D NMR experimentů (Obrázek 153).

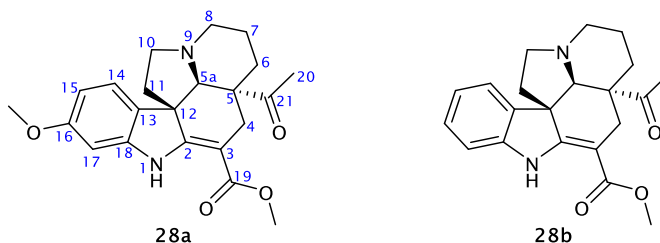


**Obrázek 153** HMBC a COSY korelace mezi atomy v molekule **28a**

Nejpodobnější aspidosperminový alkaloid s dostupnými NMR daty a prokázanou konfigurací byl nalezen v molekule (–)-minovincinu **28b**. Od popisovaného alkaloidu se liší absencí methoxy substituce na aromatickém skeletu.<sup>187, 209</sup> Data dostupná k látce **28b**

(připravena totální enantioselektivní syntézou) byla použita pro srovnání. Lze předpokládat korelaci stereochemie pro **28a** a **28b**, pokud by byly srovnatelné hodnoty 1D NMR dat a specifické optické otáčivosti, viz tabulka 3-14.

**Tabulka 3-14** Porovnání  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR dat (měřeno v  $\text{CDCl}_3$ ) a specifické optické otáčivosti **28a** a **28b**.<sup>209</sup> Hodnoty chemických posunů atomů **označených pozic** na aromatickém jádře není vhodné srovnávat. Pro označení pozic je použito historicky aplikované číslování pro aspidosperminový strukturní typ alkaloidů



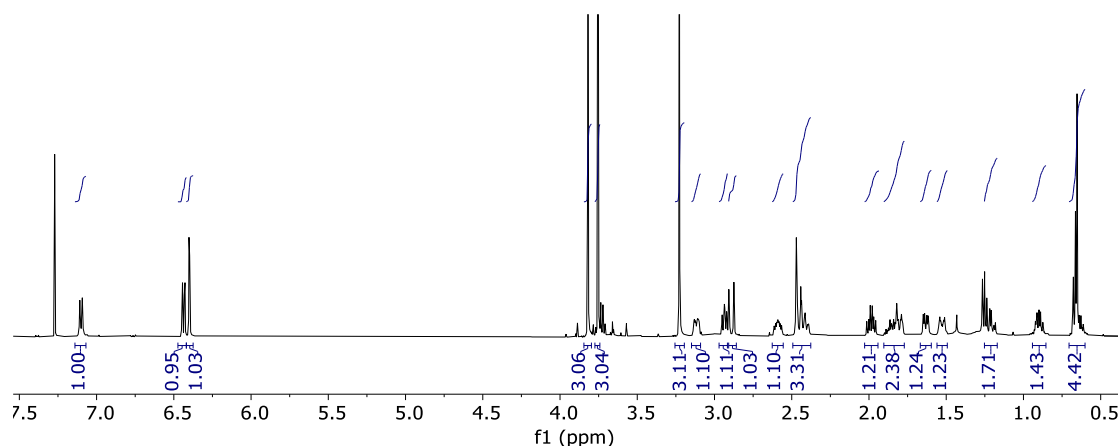
pozice	$\delta_{\text{C}}$ <b>28a</b>	$\delta_{\text{H}}$ <b>28a</b>	$\delta_{\text{C}}$ <b>28b</b> <sup>209</sup>	$\delta_{\text{H}}$ <b>28b</b> <sup>209</sup>
2	168.7		168.4	
3	91.8		91.5	
4	25.8	3.04, d (15.0) 2.80, dd (15.0, 2.1)	25.9	3.06, d (15.0) 2.80, dd (15.0, 2.0)
5	54.0	33.6	54.0	
5a	67.7	3.24, d (2.1)	67.8	3.26, d (1.9)
6	31.1	2.00 – 1.91, m 1.43, td (13.0, 5.1)	31.2	1.99–1.88, m 1.42, td (13.1, 5.4)
7	22.3	1.91–1.83, m, překryv 1.66–1.60, m	22.5	1.99–1.88, m 1.66–1.60, m
8	49.8	3.16–3.09, m 2.47, td (11.2, 3.1)	49.9	3.15–3.11, m 2.47, td (11.3, 3.2)
10	51.4	2.95, dd (8.3, 6.2) 2.71, dd (11.4, 8.4, 4.3)	51.6	2.96, dd (8.3, 6.2) 2.75–2.69, m
11	45.3	2.00–1.91, m 1.75, dd (11.4, 4.3)	45.4	1.99–1.88, m 1.76, dd (11.4, 4.2)
12	55.5		56.3	
<b>13</b>	130.6		138.4	
<b>14</b>	121.0	7.18, d (8.2)	121.2	7.30, d (7.4)
<b>15</b>	105.5	6.45, dd (8.2, 2.3)	120.8	6.92, dt (7.4, 0.9)
<b>16</b>	159.6		127.3	7.12, dt (7.6, 1.2)
<b>17</b>	96.9	6.38, d (2.3)	109.6	6.77, d (7.7)
<b>18</b>	143.6		142.5	
19	168.2		168.4	
20	25.2	1.89, s, překryv	25.3	1.88, s
21	212.1		212.4	
COOCH <sub>3</sub>	51.1	3.77, s	51.3	3.77, s
16–OCH <sub>3</sub>	55.4	3.78, s	–	–
NH	–	8.74 bs	–	8.76, bs
$[\alpha]_{\text{D}}$	–400.0 ° ( $c = 0.10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ , $\text{CH}_3\text{OH}$ , 25 °C)		–418.3 ° ( $c = 0.49$ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , 23 °C)	

Názvy pro identifikovaný alkaloid lze v literatuře nalézt dva – 16-methoxyminovincin<sup>210</sup> a minoricein<sup>211</sup>. K druhé jmenované látce je známa alespoň hodnota  $[\alpha]_{\text{D}} = -554^\circ$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), která se přibližuje hodnotě získané pro **28a**. Avšak NMR data k minoriceinu v literatuře

chybí. Na základě podobnosti chemických posunů s **28b** byl alkaloid **28a** pojmenován 16-methoxyminovincin (korelace s tvorbou názvů 16-methoxy derivátů vinka alkaloidů).

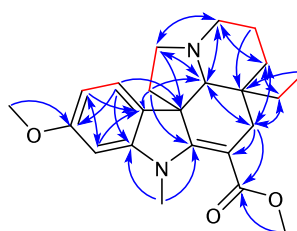
**RV-017 (29a)** $M_r = 382.5$ ;  $m = 11.3$  mg $C_{23}H_{30}N_2O_3$ 

Stejně molekuly jako pro látku **29a** byly předpovězeny pro vzorek RV-017. Již z  $^1H$  NMR spektra bylo jasné, že půjde o látku s *N*-methyl-6-methoxyindolinovým fragmentem, *N*-methylovým, ethylovým a methylesterovým substituentem, viz obrázek 154.



**Obrázek 154** Vodíkové spektrum látky **29a**

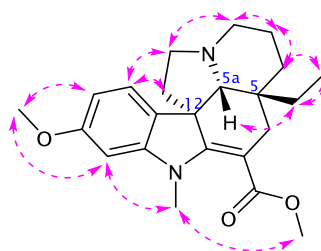
Tak jako u předcházejícího alkaloidu **28a** byl identifikován aspidosperminový strukturální typ pomocí 2D experimentů (Obrázek 155).



**Obrázek 155** Heteronukleární **HMBC** a **H2BC** korelace mezi atomy v molekule **29a**

Při prohledání literatury nebylo možné nalézt relevantní  $^{13}C$  NMR data, avšak konstituce byla známá pod názvy 16-methoxyminovin,<sup>206</sup> *N*-methylervincein,<sup>124</sup> a jako meziprodukt syntézy vindolinu.<sup>125</sup> Bohužel k dispozici jsou pouze  $^1H$  NMR data se špatným rozlišením, které se kvůli své kvalitě nehodily k porovnání.<sup>130, 131</sup> Bylo potřeba potvrdit alespoň relativní konfiguraci.

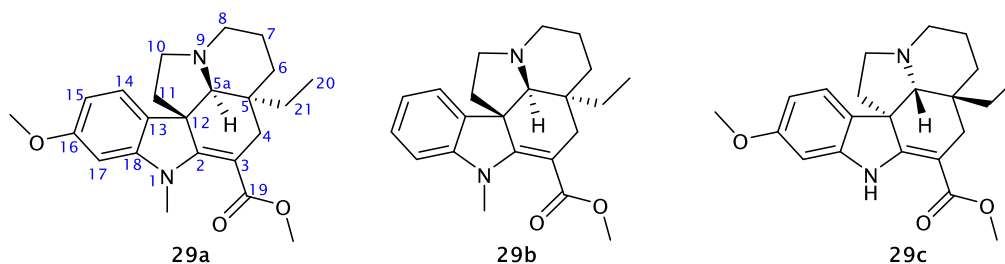
V NOESY spektru byl významný krospektrální signál mezi *N*-methinovým vodíkem a ethylovými vodíky (Obrázek 156), který nasvědčuje o relativní konfiguraci ( $5R^*$ ,  $5aR^*$ ,  $12S^*$ ) molekuly **29a**.



**Obrázek 156** Korelace vodíků z **NOESY** experimentu látky **29a**

Pro zajímavost byla porovnána  $^{13}\text{C}$  NMR spektra látky **29a** s daty (-)-minovinu připraveného totální syntézou, který se od identifikovaného alkaloidu liší pouze methoxy substitucí indolinového jádra.<sup>212</sup> Dalším porovnávaným alkaloidem byl (+)-ervincein s určenou konfigurací (5*R*,5*aR*,11*S*), který byl také připraven asymetrickou totální syntézou a uvedenou specifickou otáčivostí, která je opačná oproti přírodnímu ervinceinu ( $[\alpha]_{\text{D}} = -368^\circ$  ( $c = 0.20$ ,  $\text{CHCl}_3$ )).<sup>213</sup>

**Tabulka 3-15** Porovnání  $^{13}\text{C}$  chemických posunů látky **29a**, (-)-minovinu **29b**,<sup>212</sup> který se liší absencí methoxy skupiny na jádře a dále s (+)-ervinceinem **29c**,<sup>213</sup> který nemá methylovaný indolinový dusík (měřeno v  $\text{CDCl}_3$ )



pozice	<b>29a</b>	<b>29b</b> <sup>212</sup>	<b>29c</b> <sup>213</sup>
2	167.4	167.1	168.1
3	93.1	92.7	92.8
4	30.1	30.0	25.4
5	37.5	37.4	38.2
5a	75.3	75.4	72.7
6	32.5	32.5	32.8
7	22.0	22.1	22.1
8	50.4	50.5	50.6
10	51.8	51.9	51.6
11	47.1	47.1	45.2
12	56.0	56.6	54.7
13	131.3	138.8	130.3
14	120.9	120.8	121.3
15	104.8	120.6	104.7
16	160.0	127.4	159.7
17	96.3	108.5	96.7
18	148.2	146.9	144.4
19	168.1	168.1	169.2
20	7.1	7.1	7.1
21	29.3	29.3	29.2
COOCH <sub>3</sub>	50.9	50.9	50.9
16-OCH <sub>3</sub>	55.5	-	55.4
NCH <sub>3</sub>	36.0	36.1	-
$[\alpha]_{\text{D}}$	-158.6 ° ( $c = 0.17$ g/100ml, $\text{CHCl}_3$ , 28 °C)	-17.0 ° ( $c = 0.35$ , $\text{CHCl}_3$ , 23 °C)	+403.7 ° ( $c = 0.55$ , $\text{CH}_3\text{OH}$ , 19 °C)

Co se týče specifické optické otáčivosti minovinu, Yuan a spol.<sup>212</sup> popisuje závislost její hodnoty na použitém rozpouštědle (při použití EtOH je hodnota nulová, což není způsobené *ee* poměrem 1 : 1). Tato informace je zvláštní, protože u jiných aspidosperminových derivátů tento problém komentován není. Také uvádí, že skladování nevede k racemizaci.

Nabízelo by se tedy, že v minulosti popsany 16-methoxyminovin,<sup>214</sup> 3,4-anhydro-4-deacetoxy-6,7-dihydrovindolin (meziprodukt syntézy vindolinu),<sup>131</sup> kde uvedená otáčivost je  $[\alpha]_{\text{D}} = -204^{\circ}$  ( $c = 0.17$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) a *N*-methylervincein<sup>130</sup> je jedna a tatáž látka pouze v jiném poměru enantiomerů jako racemická směs.

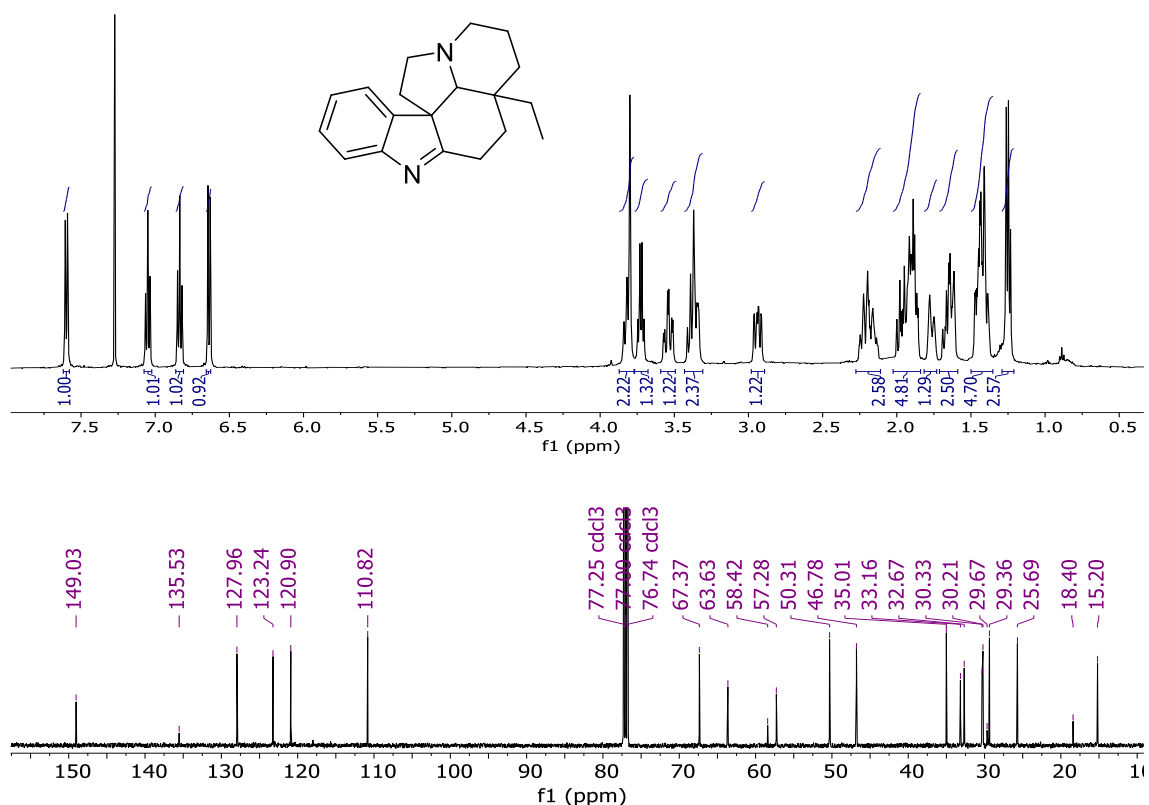
Vyzkoušeli jsme tedy experiment s posunovým činidlem. Více než tři ekvivalenty Pirklova činidla byly přidány k **29a**. Změřené vodíkové NMR spektrum prokázalo přítomnost jednoho enantiomeru.

Porovnáním chemických posunů uhlíkových atomů látek **29a–c** v tabulce 3-15 se menší rozdíly mezi posuny projevovaly mezi **29a** a **29b** (kromě atomů aromatického jádra, jejichž frekvence rezonancí byly ovlivněny přítomností  $\text{OCH}_3$  skupiny a jejím mezomerním efektem v případě látky **29a**). Proto byl pro účely této disertační práce zvolen název ( $\pm$ )-16-methoxyminovin. Naměřená data by každopádně bylo potřeba doplnit analýzou rentgenovou krystalografií a publikovat, aby se zamezilo podobným nedorozuměním.

Zajímavostí je, že tato molekula je součástí struktury bisindolového vinka alkaloidu vinkarubinu, který byl také v rámci této práce také identifikován. Jedná se o substrukturální fragment 11-methoxy-1-methylvinkadifforminu, jak popisuje Proksa a spol.<sup>122</sup>

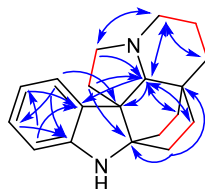
**RV-006a (30a)** $M_r = 280.4$ ;  $m = 10.4$  mg $C_{19}H_{24}N_2$ 

Vzorek s kódem RV-006a byl do NMR laboratoře dodán s predikcí struktury aspidosperminového vinka alkaloidu 1,2-dehydroaspidospermidinu. Obrázek 157 prezentuje naměřená 1D NMR spektra, ze kterých je na první pohled patrné, že molekula obsažená ve vzorku má sice 1,2-disubstituované benzenové jádro, ale pouze šest aromatických uhlíků.



**Obrázek 157**  $^1H$  a  $^{13}C$  NMR spektra látky **30a** s předpokládanou strukturou 1,2-dehydroaspidospermidinu

Proto byla provedena analýza pomocí 2D NMR experimentů, která osvětlila reálnou konstituci molekuly s bicyclo[2.2.2]oktanovým fragmentem – aspidofraktininový strukturální skelet (Obrázek 158). Zjevný je však společný biosyntetický základ pro predikovanou a identifikovanou molekulu **30a**.



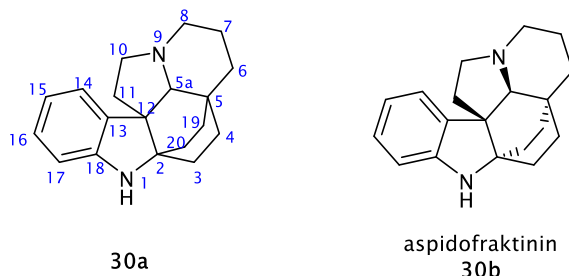
**Obrázek 158** Významné HMBC a H<sub>2</sub>BC korelace ve spektrech látky **30a**

Určená struktura je v literatuře známá jako aspidofraktinin (oba enantiomery), k němuž byla již několikrát publikována i totální syntéza.<sup>184, 187, 215, 216</sup> Nicméně stejně jako naměřená optická otáčivost byla rozdílná než publikovaná, tak i NMR data vykazovala velké odchylky,



viz tabulce 3-16. Samozřejmostí je rozporuplnost číslování této struktury napříč publikacemi. V této disertaci bylo vybráno z hlediska autorky nejpřehlednější číslování.

**Tabulka 3-16** Porovnání  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  chemických posunů a optické otáčivosti **30a** a aspidofraktininu **30b**,<sup>187</sup> jehož struktura byla několikrát ověřena totální syntézou obou enantiomerů. Největší rozdíly jsou označeny barevně



pozice	$\delta_{\text{c}}$ <b>30a</b>	$\delta_{\text{H}}$ <b>30a</b>	$\delta_{\text{c}}$ <b>30b</b> <sup>187</sup>	$\delta_{\text{H}}$ <b>30b</b> <sup>187</sup>
2	63.6		64.4	
3	25.7	2.27–2.11, m 2.02–1.84, m	26.4	2.30–2.05, m 1.90–1.60, m
4	29.4	2.27–2.11, m 1.49–1.36, m	29.2	2.30–2.05, m 1.35–1.15, m
5	30.3		31.3	
5a	67.4	3.80, s, překryv	68.9	3.15–3.05, m
6	33.2	1.71–1.59, m 1.49–1.36, m	35.8	1.52, m 1.35–1.15, m
7	15.2	2.02–1.84, m 1.80–1.73, m	17.0	1.90–1.60, m 1.35–1.15, m
8	46.8	3.54, td (13.8, 4.1) 3.43–3.31, m	47.8	3.15–3.05, m 3.03, td (13.0, 3.1)
10	50.3	3.86–3.78, m, překryv 3.43–3.31, m	50.7	3.24, q (8.4) 3.15–3.05, m
11	32.7	2.94, ddd (15.1, 9.2, 2.5) 2.02–1.84, m	34.6	2.72, ddd (13.8, 8.4, 3.6) 1.90–1.60, m
12	57.3		57.0	
13	135.5		139.8	
14	123.2	7.60, d (7.5)	122.1	7.34, dd (7.4, 1.2)
15	120.9	6.83, t (7.5)	119.8	6.78, td (7.4, 1.2)
16	128.0	7.05, t (7.5)	126.7	7.00, td (7.4, 1.2)
17	110.8	6.64, d (7.5)	110.8	6.63, dd (7.4, 1.2)
18	149.0		149.9	
19	35.0	1.71–1.59, m 1.49–1.36, m	35.0	1.42, m 1.35–1.15, m
20	30.2	2.02–1.84, m 1.49–1.36, m	31.3	1.90–1.60, m 1.35–1.15, m
[ $\alpha$ ] <sub>b</sub>		+37.0 ° ( <i>c</i> = 0.3 g/ 100 ml, CHCl <sub>3</sub> , 26 °C)		–18.8 ° ( <i>c</i> = 0.8, CHCl <sub>3</sub> , 23 °C) <sup>187</sup> +12.0 ° ( <i>c</i> = 0.3, CHCl <sub>3</sub> , 20 °C) <sup>216</sup>

Je zřejmé, že se jedná o látku s jinou konfigurací, než jakou má aspidofraktinin **30b**. Co se chirálních center týče, pak zejména rezonance **30b** *N*-methinového vodíku 3.15–3.05, který se nachází v multipletu, je oproti 3.80 překrytému singletu v **30a** velice rozdílná.

Bohužel však díky velice podobným rezonancím alifatických vodíků nebylo možné určit alespoň relativní konfiguraci pomocí NOESY experimentu. Nepodařilo se připravit

ani monokrystal na rentgenovou analýzu, proto lze jen konstatovat, že **30a** je diastereomerem **30b** na základě rozdílných NMR spekter a hodnoty optické otáčivosti. Také byla provedena zkouška s posunovým činidlem, která potvrdila přítomnost pouze jednoho enantiomeru ve vzorku.

## 4 ZÁVĚR

---

V této práci bylo identifikováno třicet alkaloidů, jejichž struktura je úplně nová nebo v literatuře nedostatečně popsána z hlediska NMR spektroskopie. Z rostlin čeledi Amaryllidaceae byly izolovány látky **1a–20a**. Z rostliny *Vinca minor* L. (Apocynaceae) byly získány látky **21a–30a**.

Molekuly **1a–5a** a **21a** patří k dosud nepopsaným strukturním typům alkaloidů a látky **11a–13a** mezi deriváty vzniklé během izolace (izolační artefakty). Dále byla potvrzena struktura 23 Amaryllidaceae alkaloidů, 20 vinka alkaloidů a jednoho pseudoalkaloidu se známými interpretacemi <sup>13</sup>C NMR spekter v literatuře. Zajímavý fenomén osově chiralita byl identifikován u látek **3a**, **4a**, **6a**, **14a**, pro jehož potvrzení bylo využito dynamické NMR analýzy, kdy byla vazbám s omezenou volnou rotací dodána dostatečně velká energie v podobě zvyšující se teploty pro překonání této bariéry.

Pro splnění cílů této práce byly využity různé metody NMR spektroskopie spolu s rozsáhlou rešeršní prací. V některých případech byla zapojena do určení relativní konfigurace molekul analýza chiroptickými metodami. Nedílnou součástí bylo zjištění molekulové hmotnosti zkoumaných látek, což bylo provedeno kolegy na spolupracujících pracovištích, stejně jako zjištění hodnoty specifické optické otáčivosti, cirkulárního dichroismu a rentgenové difrakce.

Řada výsledků z této práce již byla publikována v impaktovaných časopisech a další popisované nové látky budou prezentovány v nejbližší době.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použité chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich.

### 5.1 Přístrojové vybavení a obecné experimentální postupy

<sup>1</sup>H NMR analýze byl využit spektrometr výrobce Varian VNMR S500, jehož pracovní frekvence pro jádra vodíku je 499.87 MHz a pro jádra izotopu uhlíku 125.70 MHz. Všechny NMR experimenty byly měřeny na širokopásmové, dvoukanálové gradientní sondě OneNMR. Vzorky byly rozpuštěny v některém z deuterovaných rozpouštědel (chloroform-*d*<sub>6</sub>, methanol-*d*<sub>4</sub>, dimethylsulfoxid-*d*<sub>3</sub>, pyridin-*d*<sub>5</sub> a aceton-*d*<sub>6</sub>). Zbytkový signál rozpouštědla byl referencován nepřímo k tetramethylsilanu, viz tabulka 5-1.

**Tabulka 5-1** Použité hodnoty chemických posunů deuterovaných rozpouštědel

rozpouštědlo	<sup>1</sup> H chemický posun [ppm]	<sup>13</sup> C chemický posun [ppm]
CDCl <sub>3</sub>	7.26	77.00
CD <sub>3</sub> OD	3.30	49.00
(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	2.49	39.70
C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N	7.19, 7.55, 8.71	123.50, 135.50, 149.50
(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	2.04	29.80, 206.30

Informace v interpretaci vodíkových spekter jsou uváděna v pořadí: chemický posun, integrovaná křivka, multiplicita (singlet (s), široký singlet (bs), dublet (d), široký dublet (br d), dublet dubletů (dd), dublet tripletů (dt), dublet dubletů tripletů (ddt), triplet (t), triplet dubletů (td), kvartet (q), multiplet (m)), překryv, *J*-konstanta štěpeného signálu a konečně přiřazení pozici ve struktuře.

Vodíkový experiment byl měřen se zúženou spektrální šířkou nejčastěji s 8 skeny (pro dynamickou NMR analýzu pak s 32 skeny). Počet skenů v <sup>13</sup>C NMR experimentu byl volen s ohledem na molekulovou hmotnost a velikost navážky vzorku. Podle dostupného látkového množství vzorku byly také upraveny parametry 2D NMR experimentů výchozího nastavení, viz tabulka 5-2. Pro NOESY experiment byl také upravena délka směšovacího času v rozmezí 600–800 ms.

**Tabulka 5-2** Upravované parametry výchozího nastavení 2D NMR experimentů na VNMR S500 instrumentu

experiment	Počet skenů	počet inkrementů
gCOSY	4, 8	512
NOESY	8	512
gHSQC	8, 16	512
gHMBCAD	8, 16	512, 1024
gH2BC	8, 16	194 (max.)

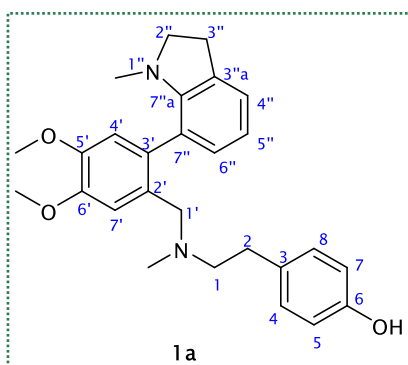
Vzorky byly měřeny při teplotě 25 °C s výjimkou dynamické NMR analýzy, při níž byla použita teplota vyšší (pro vzorek v CDCl<sub>3</sub>: 25 °C, 50 °C, 60 °C; v DMSO-*d*<sub>6</sub>: 25 °C, 50 °C, 60 °C a pak po 5 °C se zvyšovala až do 115 °C, kdy bylo dosaženo bodu koalescence).

Molekulová hmotnost látek byla měřena na přístrojích:

- Waters Synapt G2-Si s hybridním analyzátozem typu jednoduchého kvadrupólu spojeného s detektorem doby letu (Q-TOF) připojený k systému Waters Acquity I-Class UHPLC; **ESI-HRMS**
- Agilent 7890A GC 5975 vnitřní MSD pracující v EI režimu na 70 eV; **EI-MS**
- Thermo Finnigan LSQDuo; **ESI-MS**.

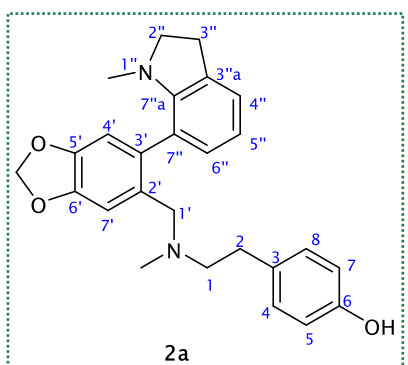
Specifická optická otáčivost byla měřena na polarimetru P3000. Cirkulární dichroismus byl měřen na spektrometru JASCO J-815 za laboratorní teploty (měřeno ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno – PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.). Rentgenovou analýzu provedl profesor Aleš Růžička z Univerzity Pardubice.

## 5.2 Charakterizace identifikovaných látek



**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.10 (1H, s, překryv, H7'), 7.09 (1H, dd, překryv,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, H4''), 7.00–6.96 (2H, m, AA'BB', H8, H4), 6.82 (1H, dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, H6''), 6.76 (1H, s, H4'), 6.72 (1H, t, překryv,  $J = 7.4$  Hz, H5''), 6.72–6.68 (2H, m, AA'BB', H7, H5), 3.84 (6H, s, C6'-OCH<sub>3</sub>, C5'-OCH<sub>3</sub>), 3.45 (1H, d,  $J = 14.0$  Hz, H1'), 3.32 (1H, dt, překryv,  $J = 17.3$  Hz,  $J = 8.8$  Hz, H2''), 3.29 (1H, d, překryv,  $J = 14.0$  Hz, H1'), 3.20 (1H, dt,  $J = 17.3$  Hz,  $J = 8.8$  Hz, H2''), 2.98 (2H, t,  $J = 8.8$  Hz, H3''), 2.65 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H2), 2.58–2.46 (2H, m, H1), 2.21 (3H, s, N1''-CH<sub>3</sub>), 2.20 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 154.0 (C6), 150.4

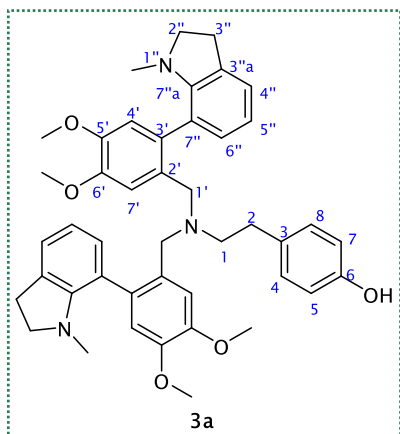
(C7''a), 148.1 (C6'), 146.9 (C5'), 132.5 (C3), 132.1 (C3'), 131.2 (C3''a), 130.5 (C6''), 130.1 (C2'), 129.8 (C4, C8), 123.3 (C4''), 123.0 (C7''), 117.9 (C5''), 115.1 (C5, C7), 113.2 (C4'), 111.1 (C7'), 59.2 (C1), 58.5 (C1'), 57.1 (C2''), 55.9 (C5'-OCH<sub>3</sub> nebo C6'-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (C5'-OCH<sub>3</sub> nebo C6'-OCH<sub>3</sub>), 42.3 (N-CH<sub>3</sub>), 38.6 (N1''-CH<sub>3</sub>), 32.8 (C2), 28.6 (C3''); **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 433.2486, nalezeno 433.2488.



**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.08 (1H, dd, překryv,  $J = 7.4$  Hz, H4''), 7.07 (1H, s, překryv, H7'), 7.00–6.94 (2H, m, AA'BB', H8, H4), 6.79 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, H6''), 6.75–6.72 (3H, m, překryv, H7, H5, H4'), 6.70 (1H, t, překryv,  $J = 7.4$  Hz, H5''), 5.99 (1H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 5.98 (1H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 3.46 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz, H1'), 3.35 (1H, dt,  $J = 17.5$  Hz,  $J = 8.7$  Hz, H2''), 3.27 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz, H1'), 3.16 (1H, dt,  $J = 17.5$  Hz,  $J = 8.7$  Hz, H2''), 3.00–2.93 (2H, m, H3''), 2.66–2.58 (2H, m, H2), 2.56–2.45 (2H, m, H1), 2.23 (3H, s, N1''-CH<sub>3</sub>), 2.18 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 153.9 (C6), 150.4

(C7''a), 147.0 (C6'), 145.9 (C5'), 133.3 (C3'), 132.2 (C3), 131.2 (C3''a), 130.6 (C2'), 130.4 (C6''), 129.7 (C4, C8), 123.4 (C4''), 122.9 (C7''), 118.1 (C5''), 115.2 (C5, C7), 110.2 (C4'), 108.6 (C7'),

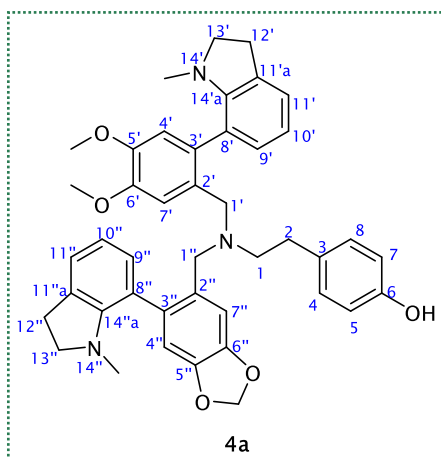
101.0 (–OCH<sub>2</sub>O–), 59.3 (C1), 58.3 (C1'), 57.1 (C2''), 41.9 (N–CH<sub>3</sub>), 38.8 (N1''–CH<sub>3</sub>), 32.7 (C2), 28.6 (C3''); **HRMS** (TOF–ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 417.2173, nalezeno 417.2172.



#### Směs atropoizomerů

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.15 (2H, s, H7'), 7.14 (2H, s, H7'), 7.07 (4H, d, *J* = 7.4 Hz, H4''), 6.93–6.96 (4H, m, H8, H4), 6.77 (4H, d, *J* = 7.4 Hz, H6''), 6.74 (4H, s, H4'), 6.71–6.65 (8H, m, H7, H5, H5''), 3.84 (12H, s, 5'–OCH<sub>3</sub>), 3.82 (6H, s, 6'–OCH<sub>3</sub>), 3.81 (6H, s, 6'–OCH<sub>3</sub>), 3.43 (2H, d, *J* = 14.5 Hz, H1'), 3.37 (4H, s, H1'), 3.29 (2H, d, *J* = 14.5 Hz, H1'), 3.27–3.17 (8H, m, H2''), 2.99–2.91 (8H, m, H3''), 2.66–2.42 (8H, m, H2, H1), 2.14 (6H, s, N1''–CH<sub>3</sub>), 2.12 (6H, s, N1''–CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 153.7 (2× C6), 150.3 (2× C7''a), 150.2 (2× C7''a), 147.9 (4× C6'), 146.7 (4× C5'), 132.8 (2× C3), 131.9 (2× C3'), 131.8 (2× C3'), 131.2 (2× C2'), 131.1 (4× C3''a), 131.0 (2× C2'), 130.3 (2× C6''), 130.4 (2× C6''),

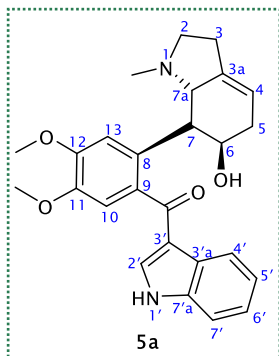
129.9 (2× C4, 2× C8), 123.3 (4× C4''), 122.8 (4× C7''), 117.9 (2× C5''), 117.8 (2× C5''), 114.9 (2× C5, 2× C7), 113.2 (2× C4'), 113.1 (2× C4'), 110.6 (2× C7'), 110.5 (2× C7'), 57.1 (2× C2''), 57.0 (2× C2''), 55.9 (4× 5'–OCH<sub>3</sub>), 55.6 (4× 6'–OCH<sub>3</sub>), 55.4 (C1), 55.2 (C1), 55.1 (2× C1'), 55.0 (2× C1'), 38.51 (2× N1''–CH<sub>3</sub>), 38.48 (2× N1''–CH<sub>3</sub>), 32.8 (2× N1''–CH<sub>3</sub>), 32.7 (2× C2), 28.6 (2× C3''); **HRMS** (TOF–ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 700.3745, nalezeno 700.3743.



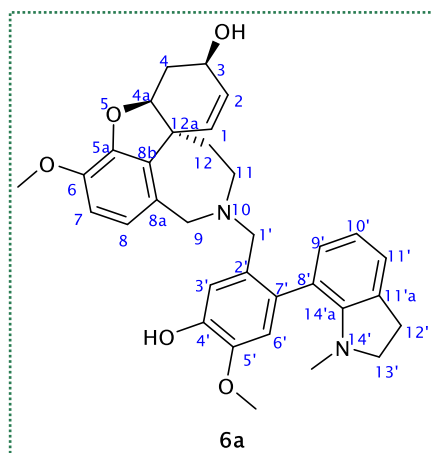
#### Směs atropoizomerů

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.17 (1H, s, H7'), 7.15 (1H, s, H7'), 7.10–6.99 (4H, m, překryv, H11', H11''), 7.03 (1H, s, překryv, H7''), 7.01 (1H, s, překryv, H7''), 6.92–6.85 (4H, m, H4, H8), 6.78–6.74 (2H, m, H9', H9''), 6.74 (1H, s, H4'), 6.73 (1H, s, H4'), 6.72–6.68 (6H, m, H5, H7, H9', H9''), 6.68 (2H, s, H4''), 6.68–6.62 (4H, m, H10', H10''), 5.96 (4H, s, –OCH<sub>2</sub>O–), 3.87 (3H, s, překryv, 6'–OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, překryv, 6'–OCH<sub>3</sub>), 3.84 (3H, s, překryv, 5'–OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, překryv, 5'–OCH<sub>3</sub>), 3.46–3.40 (2H, m, H1'), 3.40–3.34 (2H, m, H1'), 3.31–3.11 (12H, m, H13', H1'', H13''), 2.98–2.90 (8H, m, H12', H12''), 2.59–2.42 (8H, m, H1, H2), 2.16 (3H, s, překryv, N14'–CH<sub>3</sub>), 2.16 (3H, s,

překryv, N14'–CH<sub>3</sub>), 2.13 (3H, s, překryv, N14''–CH<sub>3</sub>), 2.12 (3H, s, překryv, N14''–CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 153.72 (C6), 153.68 (C6), 150.39 (C14''a), 150.36 (C14''a), 150.25 (C14'a), 150.23 (C14'a), 148.01 (2× C6'), 146.86 (2× C5''), 146.72 (2× C5'), 145.47 (2× C6''), 132.88 (2× C3, 2× C3''), 132.71 (2× C2''), 131.77 (2× C3'), 131.12 (2× C11'a, 2× C11'a), 131.06 (2× C2'), 130.41 (C9' nebo C9''), 130.31 (C9' nebo C9''), 130.29 (C9' nebo C9''), 130.19 (C9' nebo C9''), 129.79 (2× C4, 2× C8), 123.31 (2× C11', 2× C11''), 122.84 (2× C8', 2× C8''), 117.98 (C10' nebo C10''), 117.95 (C10' nebo C10''), 117.84 (C10' nebo C10''), 117.79 (C10' nebo C10''), 115.00 (2× C4, 2× C8), 113.25 (C4'), 113.15 (C4'), 110.89 (2× C7'), 110.15 (C4''), 110.08 (C4''), 108.15 (C7''), 107.97 (C7''), 100.81 (2× –OCH<sub>2</sub>O–), 57.02 (C13', C13''), 56.98 (C13', C13''), 55.95 (2× 5'–OCH<sub>3</sub>), 55.79 (2× 6'–OCH<sub>3</sub>), 55.59 (C1), 55.34 (C1), 55.19 (C1''), 55.09 (C1''), 55.03 (C1'), 54.92 (C1'), 38.66 (N14''–CH<sub>3</sub>), 38.57 (N14''–CH<sub>3</sub>, 2× N14'–CH<sub>3</sub>), 32.72 (C2), 32.53 (C2), 28.61 (2× C12', 2× C12'').



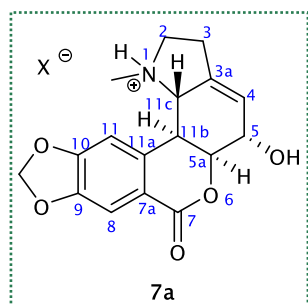
**$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.24 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H4'), 7.73 (1H, bs, H2'), 7.63 (1H, s, H13), 7.49 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H7'), 7.31–7.22 (2H, m, H6', H5'), 7.13 (1H, s, H10), 5.58–5.55 (1H, m, H4), 4.30–4.27 (1H, m, H6), 3.96 (3H, s, 12– $\text{OCH}_3$ ), 3.83 (3H, s, 11– $\text{OCH}_3$ ), 3.80–3.73 (1H, m, H7a), 3.30–3.20 (1H, m, H2), 3.11 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz, H7), 2.81–2.71 (1H, m, H2), 2.71–2.58 (1H, m, H3), 2.57–2.48 (1H, m, H3), 2.44 (1H, d,  $J = 18.0$  Hz, H5), 2.25 (1H, d,  $J = 18.0$  Hz, H5), 2.19 (3H, s, N1– $\text{CH}_3$ );  **$^{13}\text{C NMR}$**  (125.7 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 194.8 (C=O), 151.4 (C12), 148.5 (C11), 138.7 (C7'a), 138.2 (C2'), 137.4 (C3a), 134.9 (C9), 133.9 (C8), 127.5 (C3'a), 124.8 (C6'), 123.6 (C5'), 122.9 (C4'), 119.7 (C4), 119.2 (C3'), 114.1 (C13), 113.7 (C10), 113.2 (C7'), 71.0 (C6), 67.5 (C7a), 56.6 (11– $\text{OCH}_3$ ), 56.5 (12– $\text{OCH}_3$ ), 56.0 (C2), 45.4 (C7), 42.1 (N1– $\text{CH}_3$ ), 36.2 (C5), 28.1 (C3).



Směs atropoizomerů

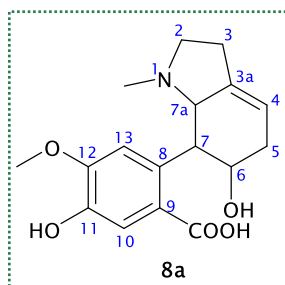
**$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.11 (1H, s, H3'), 7.08 (1H, s, H3'), 7.04 (2H, d,  $J = 7.5$  Hz, H11'), 6.87 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H9'), 6.78 (1H, s, H6'), 6.77 (1H, s, H6'), 6.73 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H9'), 6.69 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H10'), 6.66–6.59 (2H, m, H7), 6.63 (1H, t, překryv,  $J = 7.5$  Hz, H10'), 6.55 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H8), 6.44 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H8), 6.03 (1H, d, překryv,  $J = 10.1$  Hz, H1), 6.02 (1H, d, překryv,  $J = 10.1$  Hz, H1), 5.98–5.93 (2H, m, H2), 5.62 (2H, bs, OH), 4.54 (1H, bs, H4a), 4.43 (1H, bs, H4a), 4.14–4.07 (2H, m, H3), 3.98 (1H, d,  $J = 14.8$  Hz, H9), 3.86 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz, H9), 3.87 (3H, s, 5'– $\text{OCH}_3$ ), 3.86 (3H, s, 5'– $\text{OCH}_3$ ), 3.84 (6H,

s, 6– $\text{OCH}_3$ ), 3.71 (1H, d,  $J = 14.8$  Hz, H9), 3.56 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz, H9), 3.49 (1H, d,  $J = 13.7$  Hz, H1'), 3.43 (2H, s, překryv, H1'), 3.41 (1H, d, překryv,  $J = 13.7$  Hz, H1'), 3.30–3.17 (3H, m, H13'), 3.17–3.05 (3H, m, H13', H11), 3.02–2.89 (4H, m, H12', H11), 2.87–2.77 (2H, m, H12', H11), 2.69–2.61 (2H, m, H4), 2.38 (2H, bs, OH), 2.22 (3H, s, N14'– $\text{CH}_3$ ), 2.18 (3H, s, N14'– $\text{CH}_3$ ), 2.01–1.90 (3H, m, H4, H12), 1.74 (1H, td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, H12), 1.49 (1H, d,  $J = 13.4$  Hz, H12), 1.35 (1H, d,  $J = 13.6$  Hz, H12);  **$^{13}\text{C NMR}$**  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 150.4 (C14'a), 150.3 (C14'a), 145.8 (C5a), 145.7 (C5a), 145.0 (C4'), 144.8 (C4'), 144.6 (2x C5'), 143.9 (2x C6), 133.3 (2x C8b), 132.0 (C7'), 131.9 (C7'), 131.0 (2x C2', 2x C11'a), 130.5 (C9'), 130.3 (2x C8a, 2x C9'), 127.3 (2x C1), 127.3 (2x C2), 123.2 (2x C11'), 123.0 (C8'), 122.9 (C8'), 122.0 (C8), 121.9 (C8), 117.8 (2x C10'), 114.8 (C3'), 114.6 (C3'), 113.0 (C6'), 112.9 (C6'), 111.1 (C7), 111.1 (C7), 88.7 (C4a), 88.6 (C4a), 62.1 (C3), 62.1 (C3), 58.4 (C9), 58.2 (C9), 57.1 (C13'), 57.0 (C13'), 56.0 (2x 5'– $\text{OCH}_3$ ), 56.0 (2x 6– $\text{OCH}_3$ ), 54.6 (C1'), 53.8 (C1'), 51.9 (C11), 51.1 (C11), 48.3 (H12a), 48.2 (H12a), 38.6 (14'– $\text{CH}_3$ ), 38.6 (14'– $\text{CH}_3$ ), 34.7 (C12), 34.0 (C12), 29.9 (C4), 29.9 (C4), 28.6 (C12'), 28.6 (C12').



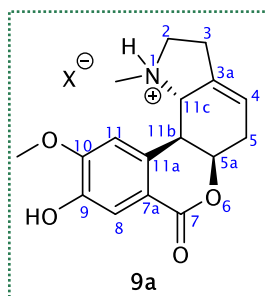
**$^1\text{H NMR}$**  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.49 (1H, s, H8), 6.95 (1H, s, H11), 6.08 (1H, s, – $\text{OCH}_2\text{O}$ –), 6.06 (1H, s, – $\text{OCH}_2\text{O}$ –), 5.69 – 5.65 (1H, m, H4), 4.62 (1H, bs, H5a), 4.43–4.40 (1H, m, H5), 3.16 (1H, dd,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 3.1$  Hz, H2), 2.87 (1H, dd,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, H11b), 2.65 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H11c), 2.57–2.46 (2H, m, H3), 2.26 (1H, dd,  $J = 19.1$  Hz,  $J = 9.6$  Hz, H2), 2.06 (3H, s, N1– $\text{CH}_3$ );  **$^{13}\text{C NMR}$**  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.7 (C7), 151.8 (C10), 147.9 (C9), 145.3 (C3a), 139.4 (C11a), 118.5 (C7a), 118.2 (C4), 109.8 (C8), 108.7 (C11), 102.1 (– $\text{OCH}_2\text{O}$ –), 82.3 (C5a), 67.1 (C5), 66.9 (C11c), 56.1 (C2), 43.6 (N1– $\text{CH}_3$ ), 39.9 (C11b),

27.8 (C3).

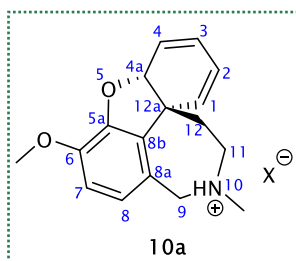


(12-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (C2), 42.7 (N1-CH<sub>3</sub>), 38.7 (C7), 30.8 (C5), 27.0 (C3).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13.38 (1H, bs, COOH), 7.60 (1H, s, H10), 7.43 (1H, s, H13), 5.78 (1H, s, H4), 4.86 (1H, d,  $J$  = 4.9 Hz, H6), 4.10–3.90 (1H, m, překryv, H2), 4.00 (3H, s, 12-OCH<sub>3</sub>), 3.55 (1H, d,  $J$  = 10.5 Hz, H7a), 3.44 (1H, d,  $J$  = 10.5 Hz, H7), 3.04–2.93 (1H, m, H2), 2.92–2.80 (2H, m, H3), 2.73 (1H, d,  $J$  = 20.0 Hz, H5), 2.64 (1H, d,  $J$  = 20.0 Hz, H5), 2.55 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 164.7 (COOH), 151.7 (C12), 146.5 (C11), 133.1 (C3a), 132.8 (C8), 120.8 (C4), 116.8 (C9), 116.3 (C10), 110.5 (C13), 76.1 (C6), 68.6 (C7a), 56.6

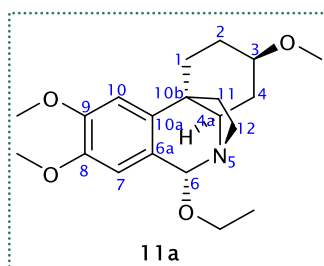


**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.91 (1H, bs), 7.44 (1H, s, H8), 7.13 (1H, s, H11), 5.72–5.67 (1H, m, H4), 4.90–4.84 (1H, m, překryv, H5a), 3.98 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.45–3.37 (1H, m, H2), 3.16 (1H, d,  $J$  = 10.1 Hz, H11c), 2.92 (1H, d,  $J$  = 10.1 Hz,  $J$  = 2.0 Hz, H11b), 2.77–2.58 (4H, m, H5, H3, H2), 2.58–2.50 (1H, m, H5), 2.28 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 167.5 (C7), 154.0 (C10), 148.3 (C9), 138.4 (C3a), 136.4 (C11a), 119.1 (C4), 118.0 (C7a), 117.3 (C8), 112.0 (C11), 78.8 (C5a), 68.6 (C11c), 57.1 (C2), 56.8 (10-OCH<sub>3</sub>), 42.8 (N1-CH<sub>3</sub>), 42.5 (C11b), 32.0 (C5), 28.1 (C3).



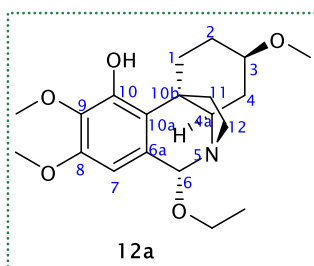
$J$  = 2.7 Hz, H12); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 149.3 (C5a), 145.8 (C6), 132.9 (C8a), 130.4 (C1), 128.8 (C3), 126.8 (C8b), 123.6 (C8), 122.2 (C2), 120.9 (C4), 112.6 (C7), 86.4 (C4a), 61.2 (C9), 56.7 (6-OCH<sub>3</sub>), 55.5 (C11), 48.1 (C12a), 43.2 (N10-CH<sub>3</sub>), 36.6 (C12);  $[\alpha]_D^{25}$  = +83.0° ( $c$  = 0.40 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.91 (1H, bs) 6.73 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H7), 6.69 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H8), 6.30 (1H, dd,  $J$  = 9.6 Hz,  $J$  = 5.5 Hz, H3), 6.22 (1H, d,  $J$  = 9.6 Hz, H1), 6.09 (2H, td,  $J$  = 9.6 Hz,  $J$  = 5.5 Hz, H2, H4), 4.81 (1H, d,  $J$  = 5.5 Hz, H4a), 4.32 (1H, d,  $J$  = 14.7 Hz, H9), 3.88–3.79 (1H, m, překryv, H9), 3.82 (3H, s, překryv, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.46 (1H, t,  $J$  = 13.6 Hz, H11), 3.14 (1H, d,  $J$  = 13.6 Hz, H11), 2.53 (3H, s, N10-CH<sub>3</sub>), 2.04 (1H, t,  $J$  = 13.6 Hz, H12), 1.80 (1H, dd,  $J$  = 13.6 Hz,

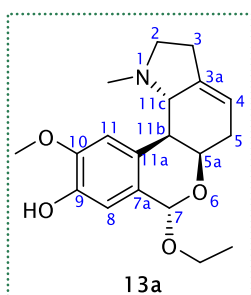


$J$  = 4.4 Hz, H1), 1.66–1.54 (1H, m, H11), 1.54–1.44 (2H, m, H2, H4), 1.29 (3H, t,  $J$  = 7.1 Hz, C6-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29–1.17 (1H, m, H4); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 148.9 (C9), 147.6 (C8), 140.9 (C10a), 125.2 (C6a), 111.5 (C7), 105.5 (C10), 94.9 (C6), 77.9 (C3), 63.7 (6-OCH<sub>2</sub>), 60.1 (C4a), 56.0 (9-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (8-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (3-OCH<sub>3</sub>), 47.1 (C12), 42.0 (C10b), 34.6 (C11), 32.9 (C4), 27.4 (C2), 26.2 (C1), 15.6 (6-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 348.2170, nalezeno 348.2177;  $[\alpha]_D^{25}$  = +49.2° ( $c$  = 0.42 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).

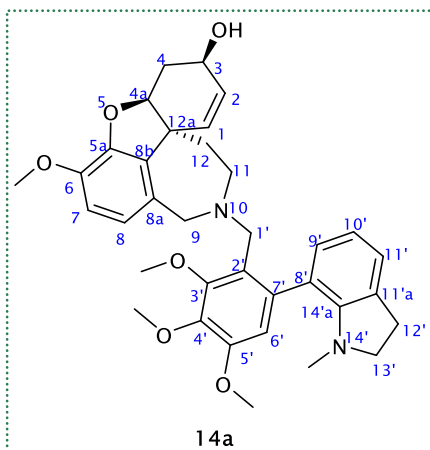




**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.38 (1H, s, H7), 6.06 (1H, bs, Ar-OH), 4.54 (1H, s, H6), 4.08 (1H, dq, *J* = 9.5 Hz, *J* = 7.1 Hz, C6-OCH<sub>2</sub>-), 3.86 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, dq, *J* = 9.5 Hz, *J* = 7.1 Hz, 6-OCH<sub>2</sub>-), 3.39 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.33 (1H, ddd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 9.9 Hz, *J* = 3.4 Hz, H12), 3.24–3.10 (2H, m, H3, H4a), 2.71–2.56 (1H, m, H12), 2.24–2.15 (1H, m, H11), 2.08–1.98 (2H, m, H2, H4), 1.80–1.68 (2H, m, H1, H11), 1.55–1.38 (1H, m, H2), 1.30 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, 6-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29–1.17 (1H, m, H4); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.3 (C8), 146.3 (C10), 135.2 (C9), 129.9 (C6a), 126.3 (C10a), 103.9 (C7), 95.0 (C6), 77.7 (C3), 63.7 (6-OCH<sub>2</sub>-), 61.1 (C4a), 60.9 (9-OCH<sub>3</sub>), 55.6 (3-OCH<sub>3</sub>, 8-OCH<sub>3</sub>), 47.4 (C12), 43.0 (C10b), 33.4 (C4), 33.1 (C11), 27.7 (C2), 26.4 (C1), 15.6 (6-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).



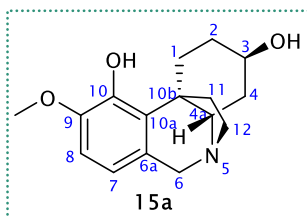
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.95 (1H, s, H11), 6.75 (1H, s, H8), 5.57 (1H, s, H7), 5.55–5.50 (1H, m, H4), 4.28 (1H, dd, *J* = 5.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, H5a), 3.93–3.83 (1H, m, 7-OCH<sub>2</sub>-), 3.88 (3H, s, překryv, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, dq, *J* = 9.7 Hz, *J* = 7.1 Hz, 7-OCH<sub>2</sub>-), 3.21 (1H, ddd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 7.7 Hz, *J* = 2.8 Hz, H2), 2.86 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H11c), 2.69–2.60 (1H, m, H5), 2.58–2.48 (2H, m, H3), 2.45 (1H, dd, *J* = 9.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, H11b), 2.42–2.32 (1H, m, H2), 2.32–2.25 (1H, m, H5), 2.14 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>), 1.26 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, 7-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 148.7 (C10), 147.1 (C9), 140.4 (C3a), 130.0 (C11a), 127.7 (C7a), 117.9 (C4), 115.5 (C8), 113.6 (C11), 98.4 (C7), 69.1 (C11c), 68.0 (C5a), 64.6 (7-OCH<sub>2</sub>-), 57.7 (C2), 56.5 (10-OCH<sub>3</sub>), 44.4 (C11b), 44.1 (N1-CH<sub>3</sub>), 32.6 (C5), 28.7 (C3), 15.7 (7-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 332.1857, nalezeno 332.1868 pro jeden izomer, pro druhý izomer 332.1857, nalezeno 332.1864; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +113.3 ° (c = 0.18 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



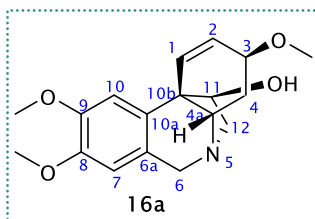
## Směs atropoizomerů

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.10 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H11'), 7.04 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H11'), 6.91 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H9'), 6.89 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H9'), 6.72 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H10'), 6.67 (1H, t, překryv, *J* = 7.5 Hz, H10'), 6.65 (1H, s, překryv, H6'), 6.63 (1H, d, překryv, *J* = 8.0 Hz, H7), 6.63 (1H, s, překryv, H6'), 6.56 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H8), 6.55 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H7), 6.25 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H8), 5.99 (1H, d, překryv, *J* = 10.3 Hz, H1), 5.99 (1H, d, překryv, *J* = 10.3 Hz, H1), 5.96–5.89 (2H, m, H2), 4.53 (1H, bs, H4a), 4.36 (1H, bs, H4a), 4.14–4.06 (2H, m, H3), 3.99–3.93 (1H, m, H9), 3.94 (3H, s, překryv, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.90 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.84–3.81 (13H, m, H9, 6-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.70–3.64 (2H, m, H9, H1'), 3.51 (1H, d, *J* = 13.4 Hz, H1'), 3.41 (1H, d, *J* = 13.4 Hz, H1'), 3.34–3.26 (3H, m, H13', H1'), 3.24 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H9), 3.16–3.05 (2H, m, H13'), 3.04–2.80 (7H, m, H11, H12'), 2.68–2.60 (3H, m, H11, H4), 2.19 (3H, s, N14'-CH<sub>3</sub>), 2.15 (3H, s, N14'-CH<sub>3</sub>), 2.01–1.85 (3H, m, H4, H12), 1.46 (1H, td, *J* = 13.4 Hz, *J* = 2.7 Hz, H12), 1.40 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, H12), 1.10 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, H12); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 152.6 (C3'), 152.4 (C3'), 151.8 (C5'), 151.6 (C5'), 150.2 (C14'a), 149.8 (C14'a), 145.6 (C5a), 145.5 (C5a), 143.7 (C6), 143.7 (C6), 141.4 (C4'), 141.1 (C4'), 136.8 (C7'), 136.7 (C7'), 133.4 (C8b), 133.4 (C8b), 131.2 (C8a), 131.1 (C8a), 131.1 (C11'a), 131.0 (C11'a), 130.7 (C9'), 130.6 (C9'), 127.4 (C1), 127.3 (C1), 127.1 (C2), 127.1 (C2), 126.0 (C2'), 126.0 (C2'), 123.4 (C8'), 123.3 (C8'), 123.3 (C11'), 123.2 (C11'), 122.0 (C8), 122.0 (C8), 117.7 (C10'), 117.7 (C10'), 110.8 (C7), 110.8 (C7), 110.3 (C6'), 109.8 (C6'), 88.8 (C4a), 88.8 (C4a), 62.2 (C3), 62.2 (C3), 61.4 (3'-

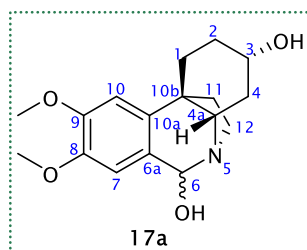
OCH<sub>3</sub>), 61.3 (3'-OCH<sub>3</sub>), 60.9 (4'-OCH<sub>3</sub>), 60.9 (4'-OCH<sub>3</sub>), 58.8 (C9), 58.8 (C9), 57.0 (C13'), 56.9 (C13'), 56.0 (5'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (6-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (6-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (5'-OCH<sub>3</sub>), 50.1 (C11), 49.5 (C11), 48.3 (C12a), 48.3 (C12a), 47.0 (C1'), 46.3 (C1'), 38.5 (N14'-CH<sub>3</sub>), 38.2 (N14'-CH<sub>3</sub>), 33.8 (C12), 32.8 (C12), 30.0 (C4), 29.9 (C4), 28.7 (C12'), 28.6 (C12'); **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>35</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 585.2959, nalezeno 585.2968; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -55.8 ° (*c* = 0.17 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>); **ECD** (*c* = 0.10 mg/ml, MeOH) λ<sub>max</sub> (Δε) 240 (-5.89), 255 (+0.14), 260 (-0.43), 284 (+9.79), 317 (-3.03).



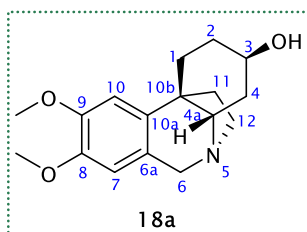
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.64 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H8), 6.60 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H7), 4.37 (1H, t, *J* = 3.4 Hz, H4a), 4.12-4.07 (1H, m, H3), 3.94 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H6), 3.89 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H6), 3.86 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 3.35 (1H, td, *J* = 14.6 Hz, *J* = 3.5 Hz, H12), 3.20-3.12 (1H, m, H12), 2.56-2.48 (1H, m, H4), 1.99-1.93 (1H, m, H11), 1.90 (1H, ddd, *J* = 16.0 Hz, *J* = 4.5 Hz, *J* = 3.3 Hz, H4), 1.86-1.76 (2H, m, H1), 1.74-1.57 (1H, m, H2), 1.66-1.55 (2H, m, H11, H2); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.4 (C10), 144.0 (C9), 136.6 (C10a), 133.2 (C6a), 120.3 (C7), 110.5 (C8), 89.9 (C4a), 65.5 (C3), 55.9 (9-OCH<sub>3</sub>), 54.0 (C6), 47.5 (C12), 47.3 (C10b), 37.8 (C11), 31.5 (C4), 27.7 (C2), 24.0 (C1); **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 276,1594, nalezeno 276,1604; *m/z* vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 298.1419, nalezeno 298.1413; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -14.0 ° (*c* = 0.20 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



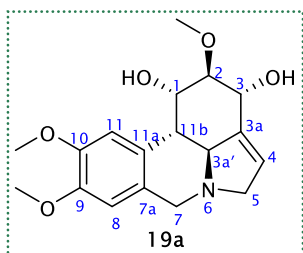
**<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR** data viz Výsledky s komentářem str. 100; **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 318.1700, nalezeno 318.1710; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +46.0 ° (*c* = 0.20 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



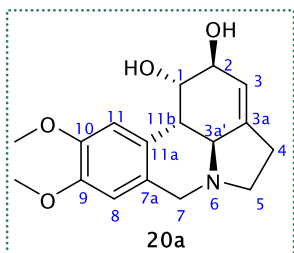
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.84 (1H, s, H7), 6.67 (1H, s, H10), 5.14 (1H, s, H6), 3.89 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.66-3.59 (1H, m, H3), 3.46 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.9 Hz, H4a), 3.42-3.33 (1H, m, H12), 2.83-2.72 (1H, m, H12), 2.48-2.40 (1H, m, H1), 2.29-2.20 (1H, m, H11), 2.06-1.96 (2H, m, C4, C2), 1.75 (1H, td, *J* = 13.4 Hz, *J* = 4.0 Hz, H1), 1.68-1.53 (2H, m, C11, C2), 1.36 (1H, dt, *J* = 24.0 Hz, *J* = 12.2 Hz, H4); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 148.9 (C9), 147.8 (C8), 139.9 (C10a), 125.4 (C6a), 111.4 (C7), 105.6 (C10), 88.4 (C6), 68.9 (C3), 59.7 (C4a), 56.0 (8-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (9-OCH<sub>3</sub>), 46.5 (C12), 41.9 (C10b), 36.2 (C4), 34.1 (C11), 30.5 (C2), 26.2 (C1); **HRMS** (TOF-ESI<sup>+</sup>): *m/z* vypočteno pro C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 306.1700, nalezeno 306.1716; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +61.2 ° (*c* = 0.17 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



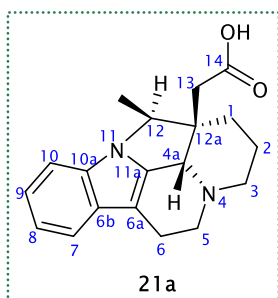
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.76 (1H, s, H10), 6.52 (1H, s, H7), 4.49 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H6), 4.28 (1H, m, H3), 3.88 (1H, d, překryv, *J* = 16.4 Hz, H6), 3.88 (3H, s, překryv, 9-OCH<sub>3</sub>), 3.84 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.53-3.45 (1H, m, H12), 3.45-3.40 (1H, m, H4a), 2.96-2.88 (1H, m, H12), 2.31-2.21 (2H, m, H11, H1), 2.18 (1H, td, *J* = 13.4 Hz, *J* = 4.7 Hz, H1), 2.12-2.04 (1H, m, H4), 1.93-1.76 (3H, m, H11, H2), 1.49 (1H, t, *J* = 13.0 Hz, H4); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 147.7 (C9), 147.5 (C8), 139.8 (C10a), 123.7 (C6a), 109.1 (C7), 106.2 (C10), 66.1 (C3), 63.0 (C4a), 61.3 (C6), 56.1 (9-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (8-OCH<sub>3</sub>), 51.9 (C12), 42.2 (C10b), 37.1 (C11), 33.2 (C4), 27.8 (C2), 22.3 (C1), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +43.1 ° (*c* = 0.07 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



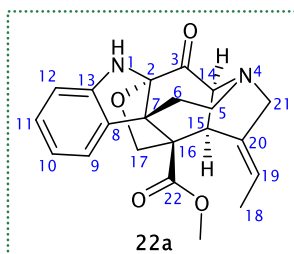
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.01 (1H, s, H11), 6.89 (1H, s, H8), 5.78–5.73 (1H, m, H4), 4.78–4.73 (1H, m, H1), 4.64–4.60 (1H, bs, H3), 4.10 (1H, d, překryv,  $J = 12.8$  Hz, H7), 4.07–3.96 (2H, m, H5, H3a'), 3.87 (3H, s, 10–OCH<sub>3</sub>), 3.82 (3H, s, 9–OCH<sub>3</sub>), 3.72 (1H, t,  $J = 2.9$  Hz, H2), 3.67–3.57 (1H, m, překryv, H5), 3.65 (1H, d, překryv,  $J = 12.8$  Hz, H7), 3.47 (3H, s, 2–OCH<sub>3</sub>), 2.85 (1H, dd,  $J = 11.1$  Hz,  $J = 1.9$  Hz, H11b); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 149.8 (C10), 148.8 (C9), 141.5 (C3a), 131.8 (C11a), 129.8 (C7a), 122.8 (C4), 112.5 (C8), 109.8 (C11), 82.8 (C2), 69.2 (C1), 69.1 (C3), 64.1 (C3a'), 63.0 (C5), 58.3 (2–OCH<sub>3</sub>), 56.8 (10–OCH<sub>3</sub>, 9–OCH<sub>3</sub>), 55.5 (C7), 42.1 (C11b);  $[\alpha]_D^{25} = -19.4^\circ$  ( $c = 0.17$  g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



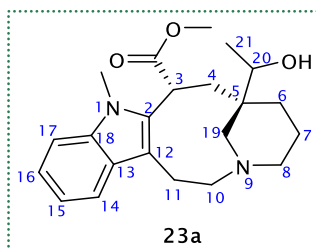
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.96 (1H, s, H11), 6.76 (1H, s, H8), 5.58–5.54 (1H, m, H3), 4.55–4.51 (1H, m, H1), 4.21–4.17 (1H, m, překryv, H2), 4.17 (1H, d, překryv,  $J = 14.2$  Hz, H7), 3.86 (3H, s, 10–OCH<sub>3</sub>), 3.81 (3H, s, 9–OCH<sub>3</sub>), 3.56 (1H, d,  $J = 14.2$  Hz, H7), 3.39–3.33 (1H, m, H5), 2.88 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz, H3a'), 2.75 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz, H11b), 2.72–2.65 (1H, m, H4), 2.64–2.74 (1H, m, H4), 2.44 (1H, dd,  $J = 17.9$  Hz,  $J = 8.9$  Hz, H5); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 149.4 (C10), 149.2 (C9), 143.8 (C3a), 129.7 (C7a), 128.7 (C11a), 119.1 (C3), 112.1 (C8), 109.8 (C11), 73.2 (C2), 71.9 (C1), 62.6 (C3a'), 57.5 (C7), 56.6 (9–OCH<sub>3</sub>), 54.8 (10–OCH<sub>3</sub>), 41.3 (C11b), 29.2 (C4),  $[\alpha]_D^{25} = 21.2^\circ$  ( $c = 0.53$  g/100ml, CHCl<sub>3</sub>)



**<sup>1</sup>H NMR** (500MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.28–8.25 (1H, m, H8), 7.48–7.44 (1H, m, H10), 7.30–7.26 (2H, m, H9, H7), 4.67–4.64 (1H, m, H4a), 4.53 (1H, q,  $J = 6.4$  Hz, H12), 3.33–3.31 (2H, m, H5), 3.13 (1H, d,  $J = 16.8$  Hz, H13), 2.99–2.90 (1H, m, H6), 2.66–2.53 (2H, m, H3), 2.49 (1H, td,  $J = 11.9$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, H6), 2.40 (1H, d,  $J = 16.8$  Hz, H13), 1.76–1.57 (2H, m, H1, H2), 1.47–1.38 (1H, m, H2), 1.20 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, 12–CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, td,  $J = 13.8$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, H1); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 168.1 (C14), 134.3 (C10a), 131.9 (C11a), 130.2 (C6b), 124.3 (C9), 123.8 (C8), 118.0 (C7), 116.3 (C10), 112.6 (C6a), 66.2 (C12), 53.1 (C4a), 50.6 (C5), 44.0 (C3), 42.8 (C12a), 38.2 (C13), 27.2 (C1), 20.5 (C2), 17.3 (C6), 16.5 (12–CH<sub>3</sub>); **HRMS** (TOF–ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 311.1760, nalezeno 311.1759;  $[\alpha]_D^{25} = -31.3^\circ$  ( $c = 0.64$  g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).

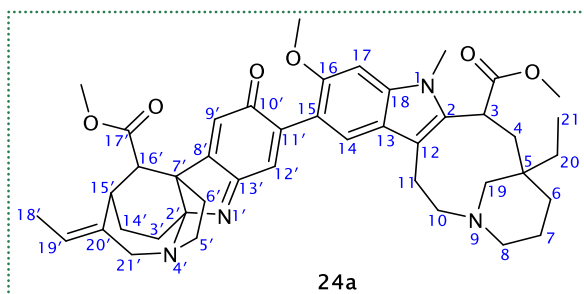


**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.14 (1H, td,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, H11), 6.98 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H9), 6.83 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H12), 6.81 (1H, td,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, H10), 5.60 (1H, q,  $J = 7.0$  Hz, H19), 5.14 (1H, bs, NH), 4.10 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H17), 3.91 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H17), 3.87 (1H, d,  $J = 5.7$  Hz, H14), 3.85–3.82 (1H, m, H21), 3.80 (3H, s, překryv, 22–OCH<sub>3</sub>), 3.53 (1H, d,  $J = 17.0$  Hz, H21), 3.51–3.43 (2H, m, H15, H6), 2.97 (1H, td,  $J = 13.9$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, H5), 2.78 (1H, dd,  $J = 15.5$  Hz,  $J = 5.2$  Hz, H5), 1.68 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H18), 1.44 (1H, dd,  $J = 15.5$  Hz,  $J = 4.0$  Hz, H6); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 193.3 (C3), 170.4 (C22), 146.2 (C13), 141.1 (C20), 133.8 (C8), 128.6 (C11), 122.5 (C9), 121.2 (C10), 121.1 (C19), 112.3 (C12), 101.3 (C2), 79.2 (C17), 70.7 (C14), 58.6 (C16), 58.4 (C7), 57.2 (C21), 51.9 (22–OCH<sub>3</sub>), 51.6 (C15), 50.8 (C5), 30.4 (C6), 15.7 (C18); **HRMS** (TOF–ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 367.1658, nalezeno 367.1658;  $[\alpha]_D^{25} = +40.8^\circ$  ( $c = 0.49$  g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



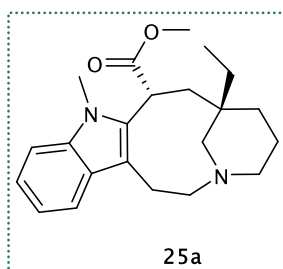
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.53 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, H14), 7.27 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H17), 7.19 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, H16), 7.09 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, H15), 4.39 (1H, t,  $J = 3.8$  Hz, H3), 3.75–3.70 (1H, m, překryv, H19), 3.72 (3H, s, překryv, 3–COOCH<sub>3</sub>), 3.54 (3H, s, N1–CH<sub>3</sub>), 3.47 (1H, q,  $J = 6.5$  Hz, H20), 3.05–2.85 (2H, m, H11), 2.63–2.55 (2H, m, H10, H4), 2.38–2.22 (3H, m, H8, H10), 1.92 (1H, dd,  $J = 14.3$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, H4),

1.64 (1H, d,  $J = 12.5$  Hz, H19), 1.52–1.39 (1H, m, H7), 1.36–1.21 (2H, m, překryv, H7, H6) 1.29 (3H, d, překryv,  $J = 6.5$  Hz, H21), 1.06 (1H, td,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 5.5$  Hz, H6); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.0 (C=O), 139.1 (C2), 136.7 (C18), 127.0 (C13), 120.7 (C16), 118.5 (C15), 118.1 (C14), 110.3 (C12), 108.6 (C17), 74.2 (C20), 56.6 (C19), 55.2 (C8), 53.6 (C10), 52.7 (3–COOCH<sub>3</sub>), 42.9 (C5), 38.7 (C3), 31.7 (C6), 31.1 (C4), 30.3 (N1–CH<sub>3</sub>), 22.3 (C11), 22.3 (C7), 17.6 (C21); **HRMS** (TOF–ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 371.3929, nalezeno 371.3939;  $[\alpha]_D^{26} = +27.8^\circ$  ( $c = 0.12$  g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).

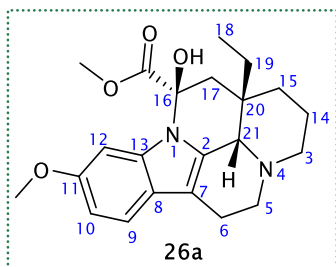


**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.40 (1H, s, H12'), 7.31 (1H, s, H14), 6.77 (1H, s, H17), 6.63 (1H, s, H9'), 6.16 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz, H3), 5.45 (1H, q,  $J = 7.2$  Hz, H19'), 4.04 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H21'), 3.86 (3H, s, 16–OCH<sub>3</sub>), 3.81–3.77 (1H, m, překryv, H15'), 3.80 (3H, s, překryv, 17'–OCH<sub>3</sub>), 3.66 (3H, s, 3–COOCH<sub>3</sub>), 3.59 (3H, s, N1–CH<sub>3</sub>), 3.04 (1H, d,

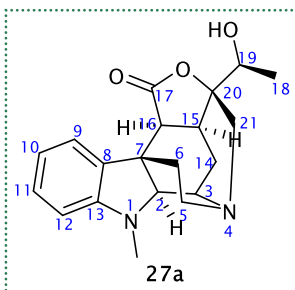
$J = 15.4$  Hz, H21'), 2.98–2.81 (4H, m, H11, H8, H14', H5'), 2.80 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H16'), 2.78–2.69 (2H, m, H5', H3'), 2.65–2.50 (2H, m, H10, H6'), 2.49–2.43 (1H, m, H8), 2.40 (1H, d,  $J = 14.5$  Hz, H4), 2.36–2.30 (1H, m, H10), 2.29 (1H, d,  $J = 11.9$  Hz, H19), 2.02–1.92 (2H, m, H4, H6'), 1.93–1.85 (3H, m, H19, H11, H14'), 1.83–1.72 (1H, m, H7), 1.68–1.60 (1H, m, překryv, H6), 1.66 (3H, dd, překryv,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, H18'), 1.58–1.50 (1H, m, H7), 1.44–1.32 (1H, m, H3'), 1.13–0.96 (3H, m, H20, H6), 0.71 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H21); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 187.5 (C10'), 175.0 (C=O), 172.7 (C17'), 164.6 (C13'), 158.0 (C8'), 153.8 (C16), 146.5 (C11'), 139.3 (C20'), 138.5 (C18), 135.9 (C2), 130.8 (C12'), 123.3 (C9'), 123.0 (C19'), 121.5 (C13), 120.3 (C14), 118.1 (C15), 112.3 (C12), 104.0 (C2'), 91.8 (C17), 60.9 (C19), 59.1 (C21'), 56.8 (C7'), 56.2 (16–OCH<sub>3</sub>), 54.1 (C10), 53.8 (C5'), 53.5 (C8), 52.2 (3–COOCH<sub>3</sub>), 51.9 (17'–OCH<sub>3</sub>), 50.3 (C16'), 41.0 (C6'), 39.0 (C3), 38.9 (C6), 35.7 (C6), 35.7 (C15'), 35.1 (C20), 35.1 (C5), 31.1 (N1–CH<sub>3</sub>), 27.7 (C3'), 26.7 (C11), 26.7 (C14'), 23.1 (C7), 13.8 (C18'), 7.5 (C21); **ESIMS**:  $m/z$  vypočteno pro C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 721.3960, nalezeno 721.4719;  $[\alpha]_D^{27} = -325.6^\circ$  ( $c = 0.86$  g/100ml; CHCl<sub>3</sub>).



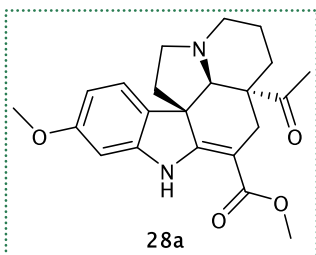
NMR data a hodnota specifické optické otáčivosti uvedena ve Výsledcích s komentářem na str. 125.



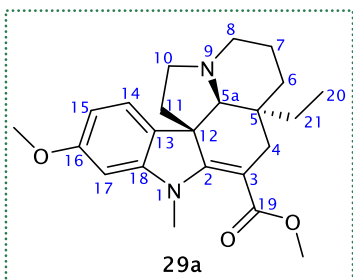
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H9), 6.90 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H12), 6.80 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.3 Hz, H10), 3.91 (1H, bs, H21), 3.80 (3H, s, 11-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.22 (1H, dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, H5), 3.11 (1H, td, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, H5), 2.96-2.85 (1H, m, H6), 2.67-2.53 (2H, m, H3), 2.62 (1H, d, překryv, *J* = 14.7 Hz, H17), 2.43 (1H, ddd, *J* = 16.2 Hz, *J* = 6.0 Hz, H6), 2.19-2.11 (1H, dq, *J* = 15.2 Hz, *J* = 7.6 Hz, H19), 2.09 (1H, d, *J* = 14.7 Hz, H17), 1.80-1.67 (1H, m, H14), 1.44 (1H, dq, *J* = 15.2 Hz, *J* = 7.6 Hz, H19), 1.36-1.20 (3H, m, H15, H14), 0.89 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H18); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172.5 (C=O), 156.0 (C11), 136.5 (C13), 129.7 (C2), 122.8 (C8), 118.5 (C9), 109.4 (C10), 105.9 (C7), 97.0 (C12), 82.9 (C16), 58.8 (C21), 55.8 (11-OCH<sub>3</sub>), 53.4 (COOCH<sub>3</sub>), 50.9 (C5), 47.0 (C17), 44.4 (C3), 36.5 (C20), 28.9 (C19), 24.1 (C15), 20.4 (C14), 16.5 (C6), 7.5 (C18);  $[\alpha]_D^{25} = -29.1^\circ$  (*c* = 0.21 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



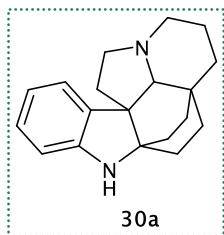
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.42 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H9), 7.12 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H11), 6.83 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H10), 6.65 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H12), 3.97 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, H3), 3.69-3.61 (2H, m, H19, OH), 3.41-3.32 (1H, m, překryv, H5), 3.35 (1H, d, překryv, *J* = 8.0 Hz, H16), 3.28 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, H21), 3.14-3.08 (1H, m, H15), 2.79 (1H, dd, *J* = 14.2 Hz, *J* = 7.5 Hz, H5), 2.72 (3H, s, překryv, N1-CH<sub>3</sub>), 2.70 (1H, d, překryv, *J* = 16.3 Hz, H21), 2.56 (1H, s, H2), 2.12 (1H, dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 4.7 Hz, H14), 1.99-1.88 (1H, m, H6), 1.73 (1H, dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 4.6 Hz, H14), 1.46 (1H, dd, *J* = 15.3 Hz, *J* = 7.5 Hz, H6), 1.29 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H18); **<sup>13</sup>C NMR** (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.2 (C17), 153.1 (C13), 141.4 (C8), 127.0 (C11), 120.6 (C9), 120.1 (C10), 109.6 (C12), 90.6 (C20), 78.7 (C2), 68.8 (C19), 53.8 (C21), 50.4 (C5), 48.4 (C16), 45.8 (C3), 40.7 (C7), 34.5 (N1-CH<sub>3</sub>), 33.6 (C6), 32.2 (C15), 30.0 (C14), 17.6 (C18);  $[\alpha]_D^{27} = +14.9^\circ$  (*c* = 0.19 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



NMR data a hodnota specifické optické otáčivosti uvedena ve Výsledcích s komentářem na str. 134.



**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.10 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H14), 6.44 (1H, dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.2 Hz, H15), 6.40 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H17), 3.82 (3H, s, 16-OCH<sub>3</sub>), 3.75 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.23 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>), 3.15-3.08 (1H, m, H8), 2.93 (1H, dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 6.1 Hz, H10), 2.89 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, H4), 2.62-2.56 (1H, m, H10), 2.48-2.38 (2H, m, překryv, H8, H4), 2.47 (1H, s, překryv, H5a), 1.99 (1H, td, *J* = 11.2 Hz, *J* = 6.5 Hz, H11), 1.90-1.77 (2H, m, H7, H6), 1.63 (1H, dd, *J* = 11.4 Hz, *J* = 4.6 Hz, H11), 1.56-1.49 (1H, m, H7), 1.29-1.15 (1H, m, H6), 0.94-0.86 (1H, m, H21), 0.70-0.56 (1H, m, H21), 0.66 (3H, t, překryv, *J* = 6.7 Hz, H20); **<sup>13</sup>C NMR** data ve Výsledcích s komentářem str. 137;  $[\alpha]_D^{28} = -158.6^\circ$  (*c* = 0.17 g/100ml, CHCl<sub>3</sub>).



NMR data a hodnota specifické optické otáčivosti jsou uvedeny ve Výsledcích s komentářem na str. 140.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

---

1. Amirkia, V.; Heinrich, M., Alkaloids as Drug Leads - A Predictive Structural and Biodiversity-Based Analysis. *Phytochem. Lett.* **2014**, *10*, XLVIII-LIII.
2. Wink, M., *A Short History of Alkaloids*. Springer: Boston, 1998.
3. <https://www.metmuseum.org/art/collection/search/436105>, citováno dne 10.7.2020.
4. Hotti, H.; Rischer, H., The killer of Socrates: Coniine and Related Alkaloids in the Plant Kingdom. *Molecules* **2017**, *22*, 1962.
5. Jahodář, L. H., V.; Martinec, Z.; Měrka, V., *Přírodní toxiny a jedy*. Galén: 2004.
6. Gates, M.; Tschudi, G., The Synthesis of Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1109–1110.
7. Bross-Walch, N.; Kuhn, T.; Moskau, D.; Zerbe, O., Strategies and Tools for Structure Determination of Natural Products Using Modern Methods of NMR Spectroscopy. *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 147–177.
8. Shitara, N.; Hirasawa, Y.; Hasumi, S.; Sasaki, T.; Matsumoto, M.; Wong, C. P.; Kaneda, T.; Asakawa, Y.; Morita, H., Four New Amaryllidaceae Alkaloids from *Zephyranthes candida*. *J. Nat. Med.* **2014**, *68*, 610–614.
9. Abouzeid, S.; Beutling, U.; Surup, F.; Bar, F. M. A.; Amer, M. M.; Badria, F. A.; Yahyazadeh, M.; Bronstrup, M.; Selmar, D., Treatment of *Vinca minor* Leaves with Methyl Jasmonate Extensively Alters the Pattern and Composition of Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2905–2909.
10. Dračinský, M. <https://nmr.group.uochb.cz/cs/kurz-nmr-i>, NMR skripta (Ver.4), staženo dne 18.6.2020.
11. Harris, R. K.; Becker, E. D.; De Menezes, S. M. C.; Goodfellow, R.; Granger, P., NMR Nomenclature. Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts - (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1795–1818.
12. Levitt, M. H., *Spin Dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. 2<sup>nd</sup> ed.; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, England, 2008.
13. Silverstein, R. M. W., Webster F. X.; Kiemle, D. J., *Spectrometric identification of organic compounds*. 7<sup>th</sup> ed.; John Wiley & Sons, Inc.: USA, 2005.
14. Sauri, J.; Bermel, W.; Buevich, A. V.; Sherer, E. C.; Joyce, L. A.; Sharaf, M. H. M.; Schiff, P. L.; Parella, T.; Williamson, R. T.; Martin, G. E., Homodecoupled 1,1- and 1, n-ADEQUATE: Pivotal NMR Experiments for the Structure Revision of Cryptospirolepine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10160–10164.
15. Shampo, M. A.; Kyle, R. A.; Steensma, D. P., Richard Ernst-Nobel Prize for Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Mayo Clin. Proc.* **2012**, *87*, E109.
16. Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R., Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3744–3779.
17. Karplus, M., Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.
18. Karplus, M., Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15.
19. Haasnoot, C. A. G.; Deleeuw, F. A. A. M.; Altona, C., The Relationship between Proton-Proton NMR Coupling-Constants and Substituent Electronegativities – I: An Empirical Generalization of the Karplus Equation. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783–2792.
20. Brown, T. H.; Schug, J. C.; Karplus, M., Spin Resonance Spectra of Substituted Aromatic Ions - Perturbation Model. *J. Chem. Phys.* **1963**, *38*, 1749.



21. Davies, D. B.; Rajani, P.; Sadikot, H., Determination of Glycosidic Bond Conformations of Pyrimidine Nucleosides and Nucleotides Using Vicinal Carbon Proton Coupling-Constants. *J. Chem. Soc.* **1985**, 279–285.
22. Wang, X. C.; Woods, R. J., Insights into Furanose Solution Conformations: Beyond the Two-state Model. *J. Biomol. NMR* **2016**, *64*, 291–305.
23. Stenutz, R.; Carmichael, I.; Widmalm, G.; Serianni, A. S., Hydroxymethyl Group Conformation in Saccharides: Structural Dependencies of  $^2J_{\text{HH}}$ ,  $^3J_{\text{HH}}$ , and  $^1J_{\text{CH}}$  Spin-Spin Coupling Constants. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 949–958.
24. Forrest, T. P., Conformations of Sugars - Proton Dihedral Angles from Gauche Coupling-Constants. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 4095–4100.
25. <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/2008/03/2d-nmr.html>, staženo dne 21.7.2020.
26. Simpson, A. J.; Woods, G.; Mehrzad, O., Spectral Editing of Organic Mixtures into Pure Components Using NMR Spectroscopy and Ultraviscous Solvents. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 186–194.
27. Neuhaus, D., *Nuclear Overhauser Effect*. In: *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons: 2011.
28. Couto, U. R.; Navarro-Vázquez, A.; Tormena, C. F., Unexpected Behavior of the  $^3J_{\text{CH}}$  Coupling Constant in Unsaturated Compounds. *Magn. Reson. Chem.* **2019**, *57*, 939–945.
29. Nyberg, N. T.; Duus, J. O.; Sorensen, O. W., Heteronuclear Two-Bond Correlation: Suppressing Heteronuclear Three-Bond or Higher NMR Correlations while Enhancing Two-Bond Correlations Even for Vanishing  $^2J_{\text{CH}}$ . *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6154–6155.
30. Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S., Alpha-Methoxy-Alpha-Trifluoromethylphenylacetic Acid, a Versatile Reagent for Determination of Enantiomeric Composition of Alcohols and Amines. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543.
31. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., Assignment of the Absolute Configuration of Polyfunctional Compounds by NMR Using Chiral Derivatizing Agents. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4603–4641.
32. Wenzel, T. J.; Chisholm, C. D., Assignment of Absolute Configuration Using Chiral Reagents and NMR Spectroscopy. *Chirality* **2011**, *23*, 190–214.
33. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., The Assignment of Absolute Configuration by NMR. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17–118.
34. Seco, J. M.; Latypov, S. K.; Quiñoá, E.; Riguera, R., Choosing the Right Reagent for the Determination of the Absolute Configuration of Amines by NMR: MTPA or MPA? *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7569–7574.
35. Kriegelstein, M.; Profous, D.; Lyčka, A.; Travníček, Z.; Příbylka, A.; Volná, T.; Benická, S.; Cankař, P., Axially Chiral Trifluoromethylbenzimidazolylbenzoic Acid: A Chiral Derivatizing Agent for  $\alpha$ -Chiral Primary Amines and Secondary Alcohols To Determine the Absolute Configuration. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11911–11921.
36. Kessler, J.; Dračínský, M.; Bouř, P., Determination of Absolute Configuration in Chiral Solvents with Nuclear Magnetic Resonance. A Combined Molecular Dynamics/Quantum Chemical Study. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 5260–5268.
37. Yang, L.; Wenzel, T.; Williamson, R. T.; Christensen, M.; Schafer, W.; Welch, C. J., Expedited Selection of NMR Chiral Solvating Agents for Determination of Enantiopurity. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 332–340.
38. Pirkle, W. H.; Sikkenga, D. L., Use of Chiral Solvating Agents for Nuclear Magnetic Resonance Determination of Enantiomeric Purity and Absolute Configuration of Lactones - Consequences of Three-Point Interactions. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1370–1374.
39. Goering, H. L.; Eikenberry, J. N.; Koerner, G. S., Tris[3-(trifluoromethylhydroxymethylene)-D-camphorato]europium(III) - Chiral Shift Reagent for Direct Determination of Enantiomeric Compositions. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 5913–5914.



40. Farjon, J.; Giraud, N.,  $^1\text{H}$  NMR Analyses of Enantiomeric Mixtures Using Chiral Liquid Crystals. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *33*, 1–8.
41. Payagala, T.; Armstrong, D. W., Chiral Ionic Liquids: A Compendium of Syntheses and Applications (2005–2012). *Chirality* **2012**, *24*, 17–53.
42. Toenjes, S. T.; Gustafson, J. L., Atropisomerism in Medicinal Chemistry: Challenges and Opportunities. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 409–422.
43. Elleraas, J.; Ewanicki, J.; Johnson, T. W.; Sach, N. W.; Collins, M. R.; Richardson, P. F., Conformational Studies and Atropisomerism Kinetics of the ALK Clinical Candidate Lorlatinib (PF-06463922) and Desmethyl Congeners. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3590–3595.
44. Zask, A.; Murphy, J.; Ellestad, G. A., Biological Stereoselectivity of Atropisomeric Natural Products and Drugs. *Chirality* **2013**, *25*, 265–274.
45. Clayden, J.; Moran, W. J.; Edwards, P. J.; LaPlante, S. R., The Challenge of Atropisomerism in Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6398–6401.
46. Zimmer, K. D.; Shoemaker, R.; Ruminski, R. R., Synthesis and Characterization of a Fluxional Re(I) Carbonyl Complex *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(dpop')Cl] with the Nominally Tri-dentate Ligand Dipyrido (2,3-*a*:3',2'-*j*)phenazine (dpop'). *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1478–1484.
47. Hirsch, D. R.; Metrano, A. J.; Stone, E. A.; Storch, G.; Miller, S. J.; Murelli, R. P., Troponoid Atropisomerism: Studies on the Configurational Stability of Tropone-Amide Chiral Axes. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2412–2415.
48. Tranter, G. E., *Circularly Polarized Components*. In: *Comprehensive Chirality*. Elsevier Science: 2012.
49. De Angelis, G. G.; Wildman, W. C., Circular Dichroism Studies – I: A Quadrant Rule for Optically Active Aromatic Chromophore in Rigid Polycyclic Systems. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 5099–5112.
50. Hesse, M., *Alkaloids: Nature's Curse Or Blessing?* John Wiley & Sons: Weinheim, 2002.
51. Lewis, J. R., Amaryllidaceae, Sceletium, Imidazole, Oxazole, Thiazole, Peptide and Miscellaneous Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 95–128.
52. Bienz, S.; Bisegger, P.; Guggisberg, A.; Hesse, M., Polyamine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 647–658.
53. Al Mamun, A.; Maříková, J.; Hulcová, D.; Janoušek, J.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Korábečný, J.; Cahlíková, A., Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **2020**, *10*, 800.
54. Křesadlová, L.; Vilím, S., *Encyklopedie tulipánů, hyacintů, begonií a dalších okrasných cibulnatých a hlíznatých rostlin*. Computer Press: Brno, 2009.
55. Zhang, Q.; Zhang, F. M.; Zhang, C. S.; Liu, S. Z.; Tian, J. M.; Wang, S. H.; Zhang, X. M.; Tu, Y. Q., Catalytic Asymmetric Total Syntheses of (–)-Galanthamine and (–)-Lycoramine. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 12664–12671.
56. Li, L.; Yang, Q.; Wang, Y.; Jia, Y. X., Catalytic Asymmetric Total Synthesis of (–)-Galanthamine and (–)-Lycoramine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6255–6259.
57. Zang, Y.; Ojima, I., Pd-Catalyzed Asymmetric Allylic Etherification Using Chiral Biphenol-Based Diphosphinite Ligands and Its Application for The Formal Total Synthesis of (–)-Galanthamine. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4013–4018.
58. Chen, J. Q.; Xie, J. H.; Bao, D. H.; Liu, S.; Zhou, Q. L., Total Synthesis of (–)-Galanthamine and (–)-Lycoramine via Catalytic Asymmetric Hydrogenation and Intramolecular Reductive Heck Cyclization. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2714–2717.
59. Magnus, P.; Sane, N.; Fauber, B. P.; Lynch, V., Concise Syntheses of (–)-Galanthamine and (±)-Codeine via Intramolecular Alkylation of a Phenol Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16045–16047.

60. Trost, B. M.; Tang, W. P.; Toste, F. D., Divergent Enantioselective Synthesis of (–)-Galanthamine and (–)-Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14785–14803.
61. Trost, B. M.; Tang, W. P., An Efficient Enantioselective Synthesis of (–)-Galanthamine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2795–2797.
62. Mucke, H. A., The Case of Galantamine: Repurposing and Late Blooming of a Cholinergic Drug. *Future Sci. OA* **2015**, *1*.
63. Ferdausi, A.; Chang, X. M.; Hall, A.; Jones, M., Galanthamine Production in Tissue Culture and Metabolomic Study on Amaryllidaceae Alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *144*, 112058.
64. <https://www.talbotnurseryandpoultry.com/DAFFODIL-LARGE-CUP-CARLTON-Narcissus-p/30-12-daffodilgcupcarlton.htm>, staženo dne 20.7.2020.
65. Berkov, S.; Osorio, E.; Viladomat, F.; Bastida, J., *Chemodiversity, Chemotaxonomy and Chemoecology of Amaryllidaceae Alkaloids*. In: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Elsevier Inc.: 2020; Vol. 83.
66. Bastida, J. L., R.; Viladomat, F., *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Elsevier: San Diego, 2006; Vol. 63.
67. Bastida, J. B., S.; Torras, L.; Pigni, N.B.; De Andrade, J.P.; Martínez, V.; Codina, C.; Viladomat, F., *Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids*. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Transworld Research Network: Trivandrum, India, 2011.
68. Breiterová, K.; Koutová, D.; Maříková, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Majorošová, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Jenčo, J.; Rezáčová, M.; Cahlíková, L., Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity. *Plants* **2020**, *9*, 137.
69. Pigni, N. B.; Ríos-Ruiz, S.; Martínez-Francés, V.; Nair, J. J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1643–1647.
70. Viladomat, F.; Llabrés, J. M.; Bastida, J.; Cusidó, R. M.; Codina, C., Ontogenic Variations in the Alkaloids of *Narcissus assoanus*. *Physiol. Plant.* **1986**, *68*, 657–661.
71. Bastida, J.; Contreras, J. L.; Codina, C.; Wright, C. W.; Phillipson, J. D., Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1549–1551.
72. Hulcová, D.; Maříková, J.; Korábečný, J.; Hošťálková, A.; Jun, D.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Opletal, L.; De Simone, A.; Nováková, L.; Andrisano, V.; Růžička, A.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as Potential Drugs in Treatment of Alzheimer's Disease. *Phytochemistry* **2019**, *165*, 112055.
73. Šafratová, M.; Host'alková, A.; Hulcová, D.; Breiterová, K.; Hrabcová, V.; Machado, M.; Fontinha, D.; Prudêncio, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Nováková, L.; Havelek, R.; Seifrtová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L., Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of Various Structural Types and Their Biological Activity. *Arch. Pharmacol Res.* **2018**, *41*, 208–218.
74. Kornienko, A.; Evidente, A., Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and Its Congeners. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1982–2014.
75. Řezanka, T.; Řezanka, P.; Sigler, K., Glycosides of Benzodioxole-Indole Alkaloids from *Narcissus* Having Axial Chirality. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 301–306.
76. De Andrade, J. P.; Pigni, N. B.; Torras-Claveria, L.; Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J., Bioactive Alkaloid Extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass Spectral Studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 13–25.
77. Cedrón, J. C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Bucio, M. A.; Pérez-Hernández, N.; Joseph-Nathan, P., Bioactive Montanine Derivatives from Halide-Induced Rearrangements of Haemanthamine-Type Alkaloids. Absolute Configuration by VCD. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1491–1494.

78. Labraña, J.; Machocho, A. K.; Kricsfalusy, V.; Brun, R.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J., Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 847–852.
79. Cozanitis, D. A.; Friedmann, T.; Fürst, S., Study of the Analgesic Effects of Galanthamine, a Cholinesterase Inhibitor. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1983**, *266*, 229–238.
80. Harvey, A. L., The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogs. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *68*, 113–128.
81. Pearson, V. E., Galantamine: A New Alzheimer Drug with a Past Life. *Ann. Pharmacother.* **2001**, *35*, 1406–1413.
82. Abdallah, O. M., Narcisine, an Alkaloid from *Narcissus tazetta*. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1447–1448.
83. Pigni, N. B.; Ríos-Ruiz, S.; Luque, F. J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Wild Daffodils of the Section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a Source of Mesembrine Alkaloids. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 384–393.
84. Prickaerts, J.; Heckman, P. R. A.; Blokland, A., Investigational Phosphodiesterase Inhibitors in Phase I and Phase II Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2017**, *26*, 1033–1048.
85. Krstenansky, J. L., Mesembrine Alkaloids: Review of Their Occurrence, Chemistry, and Pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *195*, 10–19.
86. Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rubiralta, M.; Quirion, J. C., A Heterodimer Alkaloid from *Narcissus pallidiflorus*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2685–2687.
87. [https://en.wikipedia.org/wiki/Zephyranthes\\_citrina#/media/File:Zephyranthes\\_citrina\\_108.6605.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Zephyranthes_citrina#/media/File:Zephyranthes_citrina_108.6605.jpg), staženo 18.6.2020.
88. <http://bauble.botanicalgarden.ubc.ca/zephyranthes-citrina1.jpg>, staženo dne 20.7.2020.
89. Herrera, M. R.; Machocho, A. K.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Crinine and Lycorane Type Alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Med.* **2001**, *67*, 191–193.
90. Katoch, D.; Singh, B., Phytochemistry and Pharmacology of Genus *Zephyranthes*. *Med. Aromat. Plants* **2015**, *4*, 1000212.
91. Parenty, A. D. C.; Guthrie, K. M.; Song, Y. F.; Smith, L. V.; Burkholder, E.; Cronin, L., Discovery of an Imidazo-Phenanthridine Synthone Produced in a 'Five-Step One-Pot Reaction' Leading to a New Family of Heterocycles with Novel Physical Properties. *Chem. Commun.* **2006**, 1194–1196.
92. Zhan, G. Q.; Qu, X. L.; Liu, J. J.; Tong, Q. Y.; Zhou, J. F.; Sun, B.; Yao, G. M., Zephycandidine A, the First Naturally Occurring Imidazo[1,2-*f*]phenanthridine Alkaloid from *Zephyranthes candida*, Exhibits Significant Anti-tumor and Anti-acetylcholinesterase Activities. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33990.
93. [http://www.biolib.de/batava/band6/high/IMG\\_2284.html](http://www.biolib.de/batava/band6/high/IMG_2284.html), staženo dne 10.7.2020.
94. <https://www.flickr.com/photos/14922165@N00/7037186129>, staženo dne 20.7.2020.
95. Farahanikia, B.; Akbarzadeh, T.; Jahangirzadeh, A.; Yassa, N.; Ardekani, M. R. S.; Mirnezami, T.; Hadjiakhoondi, A.; Khanavi, M., Phytochemical Investigation of *Vinca minor* Cultivated in Iran. *Iran J. Pharm. Res.* **2011**, *10*, 777–785.
96. Grujić, S. M.; Radojević, I. D.; Vasić, S. M.; Čomić, L. R.; Topuzović, M. D., Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Secondary Metabolites from *Vinca minor* L. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2015**, *51*, 572–578.
97. Vas, A.; Gulyás, B., Eburnamine Derivatives and the Brain. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 737–757.
98. Martino, E.; Casamassima, G.; Castiglione, S.; Cellupica, E.; Pantalone, S.; Papagni, F.; Rui, M.; Siciliano, A. M.; Collina, S., *Vinca* Alkaloids and Analogues as Anti-cancer Agents: Looking Back, Peering Ahead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2816–2826.

99. Chen, Q.; Lu, X.; Guo, X.; Guo, Q.; Li, D., Metabolomics Characterization of Two Apocynaceae Plants, *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*, Using GC-MS and LC-MS Methods in Combination. *Molecules* **2017**, *22*, 997.
100. Khanavi, M.; Pourmoslemi, S.; Farahanikia, B.; Hadjiakhoondi, A.; Ostad, S. N., Cytotoxicity of *Vinca minor*. *Pharm. Biol.* **2010**, *48*, 96–100.
101. Schlittler, E.; Furlenmeier, A., Vincamin, Ein Alkaloid Aus *Vinca minor* L. (Apocynaceae). *Helv. Chim. Acta* **1953**, *3*, 2017–2020.
102. Döpke, W., *The Eburnamine-Vincamine Alkaloids*. In: *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Academic Press: 1981; Vol. 20.
103. Hasa, D.; Perissutti, B.; Dall'Acqua, S.; Chierotti, M. R.; Gobetto, R.; Grabnar, I.; Cepek, C.; Voinovich, D., Rationale of Using *Vinca minor* Linne Dry Extract Phytocomplex as a Vincamine's Oral Bioavailability Enhancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 138–144.
104. Smeyers, Y. G.; Smeyers, N., J.; Randez, J., J.; Hernandez-Laguna, A.; Galvez-Ruano E., A Structural and Pharmacological Study of Alkaloids of *Vinca Minor*. *Mol. Eng.* **1991**, *1*, 153–160.
105. Proksa, B.; Grossmann, E., High Performance Liquid Chromatographic Determination of Alkaloids from *Vinca minor* L. *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 74–76.
106. Döpke, W.; Meisel, H.; Spittelle, G., Alkaloids from *Vinca Minor* L. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 6065–6066.
107. Antropow, A. H.; Garcia, N. R.; White, K. L.; Movassaghi, M., Enantioselective Synthesis of (–)-Vallesine: Late-Stage C17-Oxidation via Complex Indole Boronation. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3647–3650.
108. Mokřý, J.; Kompiš, I.; Spitteller, G., Alkaloids from *Vinca Minor* L. XX. Further Minor Alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1967**, *32*, 2523–2531.
109. Mokřý, J.; Kompiš, I.; Dúbravková, L.; Šeřčovič, P., Vincadifformin Und Minovin, Zwei Weitere Racemische Alkaloide Aus *Vinca Minor* L. *Experientia* **1963**, *19*, 311.
110. Tan, P. W.; Seayad, J.; Dixon, D. J., Expeditious and Divergent Total Syntheses of *Aspidosperma* Alkaloids Exploiting Iridium(I)-Catalyzed Generation of Reactive Enamine Intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13436–13440.
111. Kutney, J. P.; Chan, K. K.; Failli, A.; Fromson, J. M.; Gletsos, C.; Leutwiler, A.; Nelson, V. R.; de Souza, J. P., Total Synthesis of Indole and Dihydroindole Alkaloids. VI. The Total Synthesis of Some Monomeric *Vinca* Alkaloids: dl-vincadine, dl-vincaminoreine, dl-vincaminorine, dl-vincadifformine, dl-minovine and dl-vincaminoridine. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 1648–1671.
112. Mokřý, J.; Kompiš, I.; Dúbravková, L.; Šeřčovič, P., Alkaloids of *Vinca Minor* L. - The Structure of Vincadine and Vincaminoreine. *Tetrahedron Lett.* **1962**, 1185–1188.
113. Votický, Z.; Grossmann, E.; Potier, P., Alkaloids from *Vinca Minor* L. .25. Vinoxetine, a Novel Type of Indole Alkaloid. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 548–552.
114. Bannasar, M. L.; Zulaica, E.; Alonso, Y.; Vidal, B.; Vázquez, J. T.; Bosch, J., Addition of Chiral Enolates to *N*-alkyl-3-acylpyridinium salts. Total Synthesis of (+)-16-Epivinoxine and (–)-Vinoxine. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 95–106.
115. Dolby, L. J.; Nelson, S. J., Model Studies of the Synthesis of Echitamine and Related Indole Alkaloids. II. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2882–2887.
116. Dolby, L. J.; Esfandiari, Z., Model Studies of the Synthesis of Echitamine and Related Indole Alkaloids. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 43–46.
117. Bannasar, M. L.; Zulaica, E.; López, M.; Bosch, J., Studies on the Synthesis of Akuammiline-Type Alkaloids - Construction of the Hexahydro-1,5-methanoazocino[3,4-B]indole Fragment. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2361–2364.

118. Zhang, X.; Kakde, B. N.; Guo, R.; Yadav, S.; Gu, Y. C.; Li, A., Total Syntheses of Echitamine, Akuammiline, Rhazicine, and Pseudoakuammigine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6053–6058.
119. Chen, Z. T.; Xiao, T.; Tang, P.; Zhang, D.; Qin, Y., Total Synthesis of Akuammiline Alkaloid (+)-Strictamine. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 1129–1134.
120. Xie, X. N.; Wei, B.; Li, G.; Zu, L. S., Unified Total Syntheses of Structurally Diverse Akuammiline Alkaloids. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5430–5433.
121. Smith, J. M.; Moreno, J.; Boal, B. W.; Garg, N. K., Total Synthesis of the Akuammiline Alkaloid Picrinine. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4504–4507.
122. Zi, W. W.; Xie, W. Q.; Ma, D. W., Total Synthesis of Akuammiline Alkaloid (–)-Vincorine via Intramolecular Oxidative Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9126–9129.
123. Ramírez, A.; García-Rubio, S., Current Progress in the Chemistry and Pharmacology of Akuammiline Alkaloids. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1891–1915.
124. Proksa, B.; Uhrín, D.; Grossmann, E.; Votický, Z., (–)-1-Norvincorine, a New Alkaloid from *Vinca Minor*. *Planta Med.* **1987**, 120–120.
125. Adams, G. L. S., A. B. III., *The Chemistry of the Akuammiline Alkaloids*. In: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Elsevier Inc.: 2016; Vol. 76.
126. Eckermann, R.; Gaich, T., The Akuammiline Alkaloids; Origin and Synthesis. *Synthesis* **2013**, *45*, 2813–2823.
127. Cameron, M.; Cohen, J.; Miller, A.; Goodman, A.; Goldman, M.; Elfont, R.; Souza-Prien, C.; Felt, L.; Patni, R., INROADS: A Phase 3 Study to Assess the Efficacy and Safety of ADS-5102 (Amantadine) Extended Release Capsules in Multiple Sclerosis (MS) Patients with Walking Impairment. *Neurology* **2019**, *92*.
128. Proksa, B.; Uhrín, D.; Grossmann, E.; Votický, Z.; Fuska, J., Relative Configuration and Cytotoxic Activity of Vincarubine - A Novel Bisindole Alkaloid from *Vinca minor*. *Planta Med.* **1988**, 214–218.
129. Proksa, B.; Uhrin, D.; Grossmann, E.; Voticky, Z., Vincarubine, a Novel Bisindole Alkaloid from *Vinca Minor* L. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5413–5416.
130. Kuehne, M. E.; Huebner, J. A.; Matsko, T. H., Studies in Biomimetic Alkaloid Syntheses. IV. Alternative Route to Secodine Intermediates Providing Syntheses of Minovine, Vincadiformine, Ervinceine, and N(a)-Methylervinceine. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2477–2480.
131. Kutney, J. P.; Bunzlitrepp, U.; Chan, K. K.; Souza, J. P. D.; Fujise, Y.; Honda, T.; Katsube, J.; Klein, F. K.; Leutwiler, A.; Morehead, S.; Rohr, M.; Worth, B. R., Total Synthesis of Indole and Dihydroindole Alkaloids. 14. A Total Synthesis of Vindoline. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4220–4224.
132. Chatterjee, A.; Ghosh, A. K.; Hagaman, E. W., Indole Alkaloids of *Rauwolfia reflexa* – C-13 Nuclear Magnetic Resonance Structural Analysis of the Bis(indole) Alkaloid Flexicorine. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1732–1734.
133. Bahadori, F.; Topcu, G.; Boga, M.; Turkekul, A.; Kolak, U.; Kartal, M., Indole Alkaloids from *Vinca major* and *V. minor* Growing in Turkey. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 731–734.
134. Yamamoto, N.; Okada, T.; Harada, Y.; Kutsumura, N.; Imaide, S.; Saitoh, T.; Fujii, H.; Nagase, H., The Application of a Specific Morphinan Template to the Synthesis of Galanthamine. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 5751–5758.
135. Chen, P.; Bao, X.; Zhang, L. F.; Ding, M.; Han, X. J.; Li, J.; Zhang, G. B.; Tu, Y. Q.; Fan, C. A., Asymmetric Synthesis of Bioactive Hydrodibenzofuran Alkaloids: (–)-Lycoramine, (–)-Galanthamine, and (+)-Lunarine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8161–8166.
136. Fan-Chiang, T. T.; Wang, H. K.; Hsieh, J. C., Synthesis of Phenanthridine Skeletal Amaryllidaceae Alkaloids. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 5640–5645.



137. Campbell, W. E.; Nair, J. J.; Gammon, D. W.; Codina, C.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Smith, P. J.; Albrecht, C. F., Bioactive Alkaloids from *Brunsvigia radulosa*. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 587–591.
138. Bohno, M.; Sugie, K.; Imase, H.; Yusof, Y. B.; Oishi, T.; Chida, N., Total Synthesis of Amaryllidaceae Alkaloids, (+)-Vittatine and (+)-Haemanthamine, Starting from D-Glucose. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6977–6989.
139. Jeffs, P. W.; Aboudonia, A.; Campau, D.; Staiger, D., Alkaloids of the Amaryllidaceae. 27. Structures of 9-*O*-Demethylhomolycorine and 5 $\alpha$ -Hydroxyhomolycorine - Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum*, and *C. latifolium* - Assignment of Aromatic Substitution Patterns from <sup>1</sup>H-Coupled <sup>13</sup>C Spectra. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1732–1737.
140. Kreh, M.; Matusch, R., *O*-Methyloduline and *N*-Demethylmasonine, Alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1533–1535.
141. Codina, C. V., F.; Bastida, J.; Rubiralta, M.; Quirion, J.C., 2D NMR Studies of Lycorenine as a Model for the Structural Assignment of Lycorenine-Type Alkaloids. *Nat. Prod. Lett.* **1992**, *2*, 85–92.
142. Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Rubiralta, M.; Quirion, J. C.; Husson, H. P.; Ma, G. E., *Narcissus* Alkaloids, XIII. Complete Assignment of the NMR Spectra of Papyramine and 6-*Epi*-Papyramine by Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1456–1462.
143. Jegorov, A.; Buchta, M.; Sedmera, P.; Kuzma, M.; Havlíček, V., Accurate Product Ion Mass Spectra of Galanthamine Derivatives. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 544–548.
144. Almanza, G. R.; Fernández, J. M.; Wakori, E. W. T.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Alkaloids from *Narcissus cv Salome*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1375–1378.
145. Evidente, A.; Andolfi, A.; Abou-Donia, A. H.; Touema, S. M.; Hammada, H. M.; Shawky, E.; Motta, A., (–)-Amarbellisine, a Lycorine-Type Alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. Growing in Egypt. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2113–2118.
146. Cedrón, J. C.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Ravelo, Á. G.; Estévez-Braun, A., Preparation and Antimalarial Activity of Semisynthetic Lycorenine Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 722–730.
147. Latvala, A.; Önür, M. A.; Gözler, T.; Linden, A.; Kivçak, B.; Hesse, M., Nitrogen Inversion in 9-*O*-Demethylhomolycorine. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 361–364.
148. Bozkurt, B.; Coban, G.; Kaya, G. I.; Önür, M. A.; Unver-Somer, N., Alkaloid Profiling, Anticholinesterase Activity and Molecular Modeling Study of *Galanthus elwesii*. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *113*, 119–127.
149. Han, S. Y.; Sweeney, J. E.; Bachman, E. S.; Schweiger, E. J.; Forloni, G.; Coyle, J. T.; Davis, B. M.; Joullié, M. M., Chemical and Pharmacological Characterization of Galanthamine, an Acetylcholinesterase Inhibitor, and Its Derivatives - A Potential Application in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 673–687.
150. Marques, L. A.; Maada, I.; de Kanter, F. J. J.; Lingeman, H.; Irth, H.; Niessen, W. M. A.; Giera, M., Stability-Indicating Study of the Anti-Alzheimer's Drug Galantamine Hydrobromide. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 85–92.
151. Trost, B. M.; Toste, F. D., Enantioselective Total Synthesis of (–)-Galanthamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11262–11263.
152. Kohelová, E.; Maříková, J.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Kučera, T.; Jun, D.; Chlebek, J.; Jenčo, J.; Šafratová, M.; Hrabínová, M.; Ritomská, A.; Malaník, M.; Peřinová, R.; Breiterová, K.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and Their Implication to Alzheimer's Disease: Isolation, Structural Elucidation and Biological Activity. *Bioorg. Chem.* **2021**, *107*, 104567.
153. Zetta, L.; Gatti, G.; Fuganti, C., <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Amaryllidaceae Alkaloids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1973**, 1180–1184.

154. Baldwin, S. W.; Debenham, J. S., Total Syntheses of (–)-Haemanthidine, (+)-Pretazettine, and (+)-Tazettine. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 99–102.
155. Zuo, X. D.; Guo, S. M.; Yang, R.; Xie, J. H.; Zhou, Q. L., Bioinspired Enantioselective Synthesis of Crinine-Type Alkaloids via Iridium-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation of Enones. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6202–6206.
156. Bru, C.; Thal, C.; Guillou, C., Concise Total Synthesis of (±)-Maritidine. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1845–1846.
157. Das, M. K.; Kumar, N.; Bisai, A., Catalytic Asymmetric Total Syntheses of Naturally Occurring Amaryllidaceae Alkaloids, (–)-Crinine, (–)-*epi*-Crinine, (–)-Oxocrinine, (+)-*epi*-Elwesine, (+)-Vittatine, and (+)-*epi*-Vittatine. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4421–4424.
158. De Andrade, J. P.; Guo, Y.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Dutilh, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J., Crinine-Type Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptrotum*. *Phytochemistry* **2014**, *103*, 188–195.
159. Cho, N.; Du, Y. L.; Valenciano, A. L.; Fernández-Murga, M. L.; Goetz, M.; Clement, J.; Cassera, M. B.; Kingston, D. G. I., Antiplasmodial Alkaloids from Bulbs of *Amaryllis belladonna* Steud. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 40–42.
160. Šafratová, M.; Novák, Z.; Kulhánková, A.; Kuneš, J.; Hrabínová, M.; Jun, D.; Macáková, K.; Opletal, L.; Cahlíková, L., Revised NMR Data for 9-*O*-Demethylgalanthine: An Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and Its Biological Activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 787–788.
161. Bastida, J.; Fernández, J. M.; Viladomat, F.; Codina, C.; De la Fuente, G., Alkaloids from *Narcissus tortuosus*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 549–551.
162. Abou-Donia, A. H.; Amer, M. E.; Darwish, F. A.; Kassem, F. F.; Hammada, H. M.; Abdel-Kader, M. S.; Zhou, B. N.; Kingston, D. G., Two New Alkaloids of the Crinane Series from *Pancreatum sickenbergeri*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 379–381.
163. Kihara, M. K., T.; Imakura, Y.; Kida, K.; Shingu, T.; Kobayashi, S., Alkaloidal Constituents of *Hymenocallis rotata* HERB. (Amaryllidaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1070.
164. Nair, J. J.; Machocho, A. K.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Alkaloids from *Crinum macowanii*. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 945–950.
165. Watson, W. H. T., Z.; Silva, M.; Pacheco, P., 1,2,3,4,4a,6-Hexahydro-10-hydroxy-3,8,9-trimethoxy-5,10b-ethanophenanthridinium picrate. *Cryst. Struct. Commun.* **1977**, *6*, 797.
166. Pacheco, P. S., M.; Steglich, W.; Watson, W. H., Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae I Hippeastidine and *epi*-Homolycorine Two Novel Alkaloids. *Rev. Latinoam. Quim.* **1978**, *9*, 28–32.
167. Watson, W. H. Z., V.; Silva, M.; Pacheco, P., Hippeastidine, C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N. *Cryst. Struct. Commun.* **1982**, *11*, 157.
168. Cavallaro, V.; Alza, N. P.; Murray, M. G.; Murray, A. P., Alkaloids from *Habranthus tubispathus* and *H. jamesonii*, Two Amaryllidaceae with Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibition Activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 159–162.
169. Kulhánková, A.; Cahlíková, L.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Opletal, L., Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activity. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 1120–1127.
170. Via, J.; Arriortua, M. I.; Ochando, L. E.; Reventos, M. M.; Amigo, J. M.; Bastida, J., Structure of Eugenine, an Alkaloid from *Narcissus eugeniae*. *Acta Crystallogr. C* **1989**, *45*, 2020–2022.
171. Guo, Y.; De Andrade, J. P.; Pigni, N. B.; Torras-Claveria, L.; Tallini, L. R.; Borges, W. D.; Viladomat, F.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J., New Alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. *Helv. Chim. Acta* **2016**, *99*, 143–147.
172. Wang, Y. H.; Zhang, Z. K.; Yang, F. M.; Sun, Q. Y.; He, H. P.; Di, Y. T.; Mu, S. Z.; Lu, Y.; Chang, Y.; Zheng, Q. T.; Ding, M.; Dong, J. H.; Hao, X. J., Benzylphenethylamine Alkaloids from *Hosta plantaginea* with Inhibitory Activity Against Tobacco Mosaic Virus and Acetylcholinesterase. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1458–1461.

173. Huang, S. D.; Zhang, Y.; He, H. P.; Li, S. F.; Tang, G. H.; Chen, D. Z.; Cao, M. M.; Di, Y. T.; Hao, X. J., A New Amaryllidaceae Alkaloid from the Bulbs of *Lycoris radiata*. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 406–410.
174. Labraña, J.; Choy, G.; Solans, X.; Font-Bardia, M.; De la Fuente, G.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **1999**, *50*, 183–188.
175. Meijer, T. M.; Schmid, H., Uber Die Konstitution Des Eugenins. *Helv. Chim. Acta* **1948**, *31*, 1603–1607.
176. Zhang, F. M.; Tu, Y. Q.; Liu, J. D.; Fan, X. H.; Shi, L.; Hu, X. D.; Wang, S. H.; Zhang, Y. Q., A General Approach to Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloids: Total Syntheses of (±)-Haemanthidine, (±)-Pretazettine, (±)-Tazettine, and (±)-Crinamine. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9446–9455.
177. Wijnberg, J. B. P. A.; Speckamp, W. N., Total Syntheses of *dl*-Mesembrine, *dl*-Dihydromaritidine and *dl*-epi-Dihydromaritidine Via Regioselective NaBH<sub>4</sub>/H<sup>+</sup> Reduction of Imides. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2579–2586.
178. Hoshino, O.; Sawaki, S.; Shimamura, N.; Onodera, A.; Umezawa, B., Synthesis of Sceletium and Amaryllidaceae Alkaloids, (±)-Mesembrine and (±)-Dihydromaritidine, (±)-Epidihydromaritidine, (±)-Elwesine, and (±)-Epielwesine. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2734–2743.
179. Kihara, M.; Ozaki, T.; Kobayashi, S.; Shingu, T., Alkaloidal Constituents of *Leucojum autumnale* L. (Amaryllidaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 318–320.
180. Immirzi, A.; Fuganti, C., Crystal Structure of Narcissidine Methiodide. *J. Chem. Soc. B* **1971**, 1218–1220.
181. Evidente, A.; Iasiello, I.; Randazzo, G., Isolation of Sternbergine, a New Alkaloid from Bulbs of *Sternbergia lutea*. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 1003–1008.
182. Roques, R.; Piquion, J.; Fourme, R.; André, D., The Crystal and Molecular Structure of the Alkaloid Lycorine. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci., Cryst. Eng. Mater.* **1974**, *30*, 296–299.
183. Hong, A. Y.; Vanderwal, C. D., A Sequential Cycloaddition Strategy for the Synthesis of Alsmaphorazine B Traces a Path Through a Family of *Alstonia* Alkaloids. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 4160–4171.
184. Wenkert, E.; Liu, S., Total Synthesis of (±)-Aspidofractinine and (±)-Aspidospermidine. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7677–7682.
185. Ma, H. C.; Xie, X. G.; Jing, P.; Zhang, W. W.; She, X. G., Concise Total Synthesis of (±)-Aspidospermidine. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5255–5259.
186. Yagudaev, M. R., NMR Study of Alkaloids. VI. A Comparison the Stereochemistries of Pseudokopsinine and 14,15-Dihydrovindolinine by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. *Chem. Nat. Compd.* **1984**, 334–337.
187. Varga, S.; Angyal, P.; Martin, G.; Egyed, O.; Holczbauer, T.; Soós, T., Total Syntheses of (–)-Minovincine and (–)-Aspidofractinine through a Sequence of Cascade Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 13547–13551.
188. Williams, D.; Qu, Y.; Simionescu, R.; De Luca, V., The Assembly of (+)-Vincadiformine- and (–)-Tabersonine-Derived Monoterpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Involves Separate Branch Pathways. *Plant J.* **2019**, *99*, 626–636.
189. Li, G.; Piemontesi, C.; Wang, Q.; Zhu, J. P., Stereoselective Total Synthesis of Eburnane-Type Alkaloids Enabled by Conformation-Directed Cyclization and Rearrangement. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 2870–2874.
190. Kitajima, M.; Anbe, M.; Kogure, N.; Wongseripipatana, S.; Takayama, H., Indole alkaloids from *Kopsia jasminiflora*. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9099–9106.
191. Ali, E.; Chakraborty, P. K.; Chakravarty, A. K.; Pakrashi, S. C., Synthesis and Stereochemistry of (±)-Vincatine. *Heterocycles* **1982**, *19*, 1667–1671.



192. Martin, C. L.; Nakamura, S.; Otte, R.; Overman, L. E., Total Synthesis of (+)-Condylocarpine, (+)-Isocondylocarpine, and (+)-Tubotaiwine. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 138–141.
193. Attaurrahman; Abbas, S. A.; Nighat, F.; Ahmed, G.; Choudhary, M. I.; Alvi, K. A.; Habiburrehman; Desilva, K. T. D.; Arambewela, L. S. R., Chemical Constituents of *Alstonia macrophylla*. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 750–754.
194. Attaurrahman; Zaman, K.; Perveen, S.; Habiburrehman; Muzaffar, A.; Choudhary, M. I.; Pervin, A., Alkaloids from *Rhazya stricta*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1285–1293.
195. Ravao, T.; Richard, B.; Zeches, M.; Massiot, G.; Lemenolivier, L., The Configuration of Venoterpine. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 837–838.
196. Beniddir, M. A.; Martin, M. T.; Dau, M. E. T. H.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M., Bisindole Alkaloid Artifacts from *Gonioma malagasy*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2115–2119.
197. Li, L. M.; Yang, T.; Liu, Y.; Liu, J.; Li, M. H.; Wang, Y. T.; Yang, S. X.; Zou, Q.; Li, G. Y., Calophylline A, a New Rearranged Monoterpenoid Indole Alkaloid from *Winchia calophylla*. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3450–3453.
198. Hudson, B. M.; Harrison, J. G.; Tantillo, D. J., Assessing the Viability of Biosynthetic Pathways for Calophylline A Formation - Are Pericyclic Reactions Involved? *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2952–2955.
199. Mokřý, J.; Kompiš, I.; Shamma, M.; Shine, R. J., The Structure of Vincaminorine and Its Relationship to Vincaminoreine and Vincadine. *Chem. Ind.* **1964**, 1988–1989.
200. Štrouf, O.; Trojánek, J., On Alkaloids. X. Structure of Vincine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 447–456.
201. Neuss, N.; Boaz, H. E.; Occolowitz, J. L.; Wenkert, E.; Schell, F. M.; Potier, P.; Kan, C.; Plat, M. M.; Plat, M., Structure of Vincarodine. *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 2660–2666.
202. Vachnadze, V. Y. D., É. Z.; Robakidze, Z. V.; Chkhikvadze, G. V.; Mudzhiri, M. M.; Abuladze, G. V.; Chuchulashvili, N. A., Chemical Composition and Pharmacological Activity of Alkaloids from the Common Periwinkle Cultured in Georgia. *Pharm. Chem. J.* **2001**, *35*, 268–270.
203. Desmaële, D.; Mekouar, K.; d'Angelo, J., Stereocontrolled Elaboration of Quaternary Carbon Centers through the Asymmetric Michael-Type Alkylation of Chiral Imines Secondary Enamines: Enantioselective Synthesis of (+)-Vincamine. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3890–3901.
204. Pauptit, R. A.; Trotter, J., Crystal-Structure of Raucubaine. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 1007–1009.
205. Mamataskalamaras, S.; Sevenet, T.; Thal, C.; Potier, P., Alkaloids of *Alstonia quaternata* Cyanogenesis of Araceae. II. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1849–1854.
206. Jacquier, M. J.; Vercauteren, J.; Massiot, G.; Lemenolivier, L.; Pusset, J.; Sevenet, T., Alkaloids of *Alstonia plumosa*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2973–2977.
207. Sierra, P.; Novotný, L.; Samek, Z.; Buděšínský, M.; Dolejš, L.; Bláha, K., Alkaloids of *Rauwolfia salicifolia* Griseb Species. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1982**, *47*, 2912–2921.
208. Subhadhirasakul, S.; Takayama, H.; Aimi, N.; Ponglux, D.; Sakai, S., Novel Indole Alkaloids from the Leaves of *Rauwolfia sumatrana* Jack in Thailand. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1427–1431.
209. Laforteza, B. N.; Pickworth, M.; MacMillan, D. W. C., Enantioselective Total Synthesis of (–)-Minovincine in Nine Chemical Steps: An Approach to Ketone Activation in Cascade Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11269–11272.
210. Döpke, W.; Meisel, H., 16-Methoxyvincadifformin, a New Alkaloid from *Vinca Minor*. *Pharmazie* **1968**, *23*, 521–522.
211. Zachystalová, D.; Štrouf, O.; Trojánek, J., New Alkaloids of *Vinca Minor* L. *Chem. Ind.* **1963**, 610–611.
212. Yuan, Z. Q.; Ishikawa, H.; Boger, D. L., Total Synthesis of Natural (–)- and *ent*(+)-4-Desacetoxy-6,7-dihydrovindorosine and Natural and *ent*-Minovincine: Oxadiazole Tandem Intramolecular Diels-Alder/1,3-dipolar Cycloaddition Reaction. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 741–744.

213. Pandey, G.; Khamrai, J.; Mishra, A.; Maly, P.; Chikkade, P. K., Iminium Ion-Enamine Cascade Reaction Enables the Asymmetric Total Syntheses of *Aspidosperma* Alkaloids Vincadifformine and Ervinceine. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6317–6327.
214. Saya, J. M.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A., Total Synthesis of *Aspidosperma* and *Strychnos* Alkaloids through Indole Dearomatization. *Chem.-Eur. J.* **2019**, *25*, 8916–8935.
215. Wang, S. H.; Si, R. Q.; Zhuang, Q. B.; Guo, X.; Ke, T.; Zhang, X. M.; Zhang, F. M.; Tu, Y. Q., Collective Total Synthesis of Aspidofractinine Alkaloids through the Development of a Bischler-Napieralski/Semipinacol Rearrangement Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 21954–21958.
216. Gagnon, D.; Spino, C., Stereoselective Synthesis of (+)-Aspidofractinine. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6035–6041.

## 7 SEZNAM PRACÍ KANDIDÁTA

---

Práce jsou řazeny chronologicky od nejstarších.

### Publikace

1. Habartová, K.; Havelek, R.; Seifrtová, M.; Královec, K.; Cahlíková, L.; Chlebek, J.; Čermáková, E.; Mazánková, N.; **Maříková, J.**; Kuneš, J.; Nováková, L.; Řežáčová, M. Scoulerine Affects Microtubule Structure, Inhibits Proliferation, Arrests Cell Cycle and Thus Culminates in the Apoptotic Death of Cancer Cells, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4829.  
DOI: 10.1038/s41598-018-22862-0; IF<sup>2017</sup> 4.122 (Q1), AIS<sup>2017</sup> 1.356 (Q1)
2. Hošťálková, A.; **Maříková, J.**; Opletal, L.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Peréz, D.I.; Jun, D.; Kučera, T.; Andrisano, V.; Siatka, T.; Cahlíková, L. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease, *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 239–248.  
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00592; IF<sup>2018</sup> 4.257 (Q1/Q1/Q1), AIS<sup>2018</sup> 0.827 (Q1/Q1/Q2)
3. Kohelová, E.; Perinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; **Maříková, J.**; Kučera, T.; Gonzalez, L. M.; Hrabínová, M.; Vorčáková, K.; Nováková, L.; De Simone, A.; Havelek, R.; Cahlíková, L. Derivatives of the  $\beta$ -Crinine Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease, *Molecules* **2019**, *24*, 1307.  
DOI: 10.3390/molecules24071307; IF<sup>2018</sup> 3.060 (Q2), AIS<sup>2018</sup> 0.620 (Q2)
4. Brůža, Z.; Kratochvíl, J.; Harvey, J. N.; Rulišek, L.; Nováková, L.; **Maříková, J.**; Kuneš, J.; Kočovský, P.; Pour, M. A New Insight into the Stereoelectronic Control of the Pd<sup>0</sup>-Catalyzed Allylic Substitution: Application for the Synthesis of Multisubstituted Pyran-2-ones via an Unusual 1,3-Transposition, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 8053.  
DOI: 10.1002/chem.201900323; IF<sup>2018</sup> 5.160 (Q1), AIS<sup>2018</sup> 1.152 (Q1)
5. Hulcová, D.; **Maříková, J.**; Korábečný, J.; Hošťálková, A.; Jun, D.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Opletal, L.; De Simone, A.; Nováková, L.; Andrisano, V.; Růžička, A.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as Potential Drugs in Treatment of Alzheimer's Disease, *Phytochemistry* **2019**, *165*, 112055.  
DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112055; IF<sup>2018</sup> 2.905 (Q1/Q2), AIS<sup>2018</sup> 0.761 (Q1/Q1)
6. Al Shammari, L.; Al Mamun, A.; Koutová, A.; Majorošová, M.; Hulcová, D.; Šafratová, M.; Breiterová, K.; **Maříková, J.**; Havelek, R.; Cahlíková, L. Alkaloid Profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids, and Evaluation of Their Cytotoxicity, *Rec. Nat. Prod.* **2020**, *14*, 154–159.  
DOI: 10.25135/rnp.147.19.06.1302; IF<sup>2019</sup> 1.268 (Q3/Q3/Q3), AIS<sup>2019</sup> 0.195 (Q3/Q3/Q4)
7. Breiterová, K.; Koutová, D.; **Maříková, J.**; Havelek, R.; Kuneš, J.; Majorošová, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Jenčo, J.; Řežáčová, M.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity, *Plants* **2020**, *9*, 137.  
DOI: 10.3390/plants9020137; IF<sup>2019</sup> 4.082 (Q1)

8. Al Mamun, A.; **Maříková, J.**; Hulcová, D.; Janoušek, J.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Korábečný, J.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **2020**, *10*, 800.  
DOI: 10.3390/biom10050800; IF<sup>2019</sup> 4.082 (Q2)
9. Peřinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Kohelová, E.; De Simone, A.; Al Mamun, A.; Hulcová, D.; Marková, J.; Kučera, T.; Jun, D.; Šafratová, M.; **Maříková, J.**; Andrisano, V.; Jenčo, J.; Kuneš, J.; Martínez, A.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Functionalized Aromatic Esters of the Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* Biological Activity Connected to Alzheimer's Disease, *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*.  
DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103928; IF<sup>2019</sup> 4.831 (Q1/Q1), AIS<sup>2019</sup> 0.643 (Q2/Q2)
10. **Maříková, J.**; Ritomská, A.; Korábečný, J.; Peřinová, R.; Al Mamun, A.; Kučera, T.; Kohelová, E.; Hulcová, D.; Koblrová, T.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Aromatic Esters of the Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Ambelline as Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 1359–1367.  
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00561; IF<sup>2019</sup> 3.779 (Q1/Q2/Q2), AIS<sup>2019</sup> 0.778 (Q1/Q1/Q2)
11. Matouš, P.; Kadaník, M.; Timoracký, M.; Kuneš, J.; **Maříková, J.**; Růžička, A.; Kočovský, P.; Pour, M. Nucleophile-assisted Cyclization of  $\beta$ -Propargylamino Acrylic Compounds Catalyzed by Gold(I): a Rapid Construction of Multisubstituted Tetrahydropyridines and their Fused Derivatives. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7*, 3356–3367.  
DOI: 10.1039/D0QO00653J; IF<sup>2019</sup> 5.155 (Q1), AIS<sup>2019</sup> 1.062 (Q1)
12. Al Shammari, L.; Hulcová, D.; **Maříková, J.**; Kučera, T.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Schmidt, M.; Pulkrábková, L.; Janoušek, J.; Soukup, O.; Kuneš, J.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and Preparation of Vittatine Derivatives as Potential Ligands for Alzheimer's Disease. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *136*, 137–146.  
DOI: 10.1016/j.sajb.2020.06.024; IF<sup>2019</sup> 1.792 (Q2), AIS<sup>2019</sup> 0.348 (Q3)
13. Kohelová, E.; **Maříková, J.**; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Kučera, T.; Jun, D.; Chlebek, J.; Jenčo, J.; Šafratová, M.; Hrabínová, M.; Ritomská, A.; Malaník, M.; Peřinová, R.; Breiterová, K.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and Their Implication to Alzheimer's Disease: Isolation, Structural Elucidation and Biological Activity. *Bioorg. Chem.* **2021**, *107*, 104567.  
DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104567; IF<sup>2019</sup> 4.831 (Q1/Q1), AIS<sup>2019</sup> 0.643 (Q2/Q2)

## Účast na konferencích

1. NMR Spectroscopy – The Identification of The Isolated Substance from *Nerine bowdenii* (krátké sdělení), XXII. Student Scientific Conference of Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Česká republika, 22.–23.04.2015
2. The Identification of The Isolated Alkaloids from *Nerine bowdenii* Employing NMR Spectroscopy (poster sekce), 51<sup>st</sup> Conference: Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry - “Liblice 2016”, Lázně Bělohrad, Česká republika, 11.–13.11.2016
3. The Identification of the Isolated Alkaloids from *Glaucium flavum* Employing NMR Spectroscopy (krátké sdělení), 7<sup>th</sup> Postgraduate and 5<sup>th</sup> Postdoctoral Scientific Conference, Hradec Králové, Česká republika, 7.–8.2.2017
4. The Identification of The Isolated Alkaloids from *Papaver rhoeas* Employing NMR Spectroscopy (poster sekce), 52<sup>nd</sup> Conference: Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry - “Liblice 2017”, Lázně Bělohrad, Česká republika, 3.–5.11.2017
5. NMR Elucidation of Alkaloids Isolated from *Magnolia x soulangeana* (krátké sdělení), 8<sup>th</sup> Postgraduate and 6<sup>th</sup> Postdoctoral Scientific Conference, Hradec Králové, Česká republika, 24.–25.1.2018
6. Structural Elucidation of Isolated Alkaloids from *Papaver rhoeas* Employing NMR Spectroscopy (krátké sdělení), Central European NMR meeting „33<sup>rd</sup> NMR Valtice“, Valtice, Česká republika, 23.–25.4.2018
7. The Identification of The Isolated Alkaloids from *Papaver rhoeas* Employing NMR Spectroscopy (poster sekce), 53<sup>rd</sup> Conference: Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry - “Liblice 2018”, Lázně Bělohrad, Česká republika, 3.–5.11.2018
8. *Papaver rhoeas*: A Source of Alkaloids for NMR Elucidation (krátké sdělení), 9<sup>th</sup> Postgraduate and 7<sup>th</sup> Postdoctoral Scientific Conference, Hradec Králové, Česká republika, 24.–25.1.2019
9. NMR Elucidation of New Alkaloids from *Berberis vulgaris* (poster sekce), Small Molecule NMR Conference - „SMASH 2019“, Porto, Portugalsko, 23.–25.9.2019
10. NMR Elucidation of Alkaloids from *Vinca minor* L. (poster sekce), 54<sup>th</sup> Conference: Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry - “Liblice 2019”, Špindlerův Mlýn, Česká republika, 6.–8.11.2019
11. NMR Elucidation of Acetylcaranine (krátké sdělení), 10<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Scientific Conference, Hradec Králové, Česká republika, 22.–23.1.2020
12. Structure Elucidation of Amaryllidaceae Alkaloids (krátké sdělení), 11<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Scientific Conference, Hradec Králové, Česká republika, 27.–28.1.2021