

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**



**Analýza struktury alkaloidů**  
**metodami multidimenzionální NMR spektroskopie**  
(dizertační práce)

Hradec Králové, 2015

Zdeněk Novák

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“

## **Poděkování**

Za všestrannou a obětavou pomoc, cenné rady a připomínky při zpracování dizertační práce děkuji svému školiteli doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc.

Poděkování patří celému kolektivu pracovní skupiny prof. RNDr. Milana Poura, Ph.D. jmenovitě PharmDr. M. Špulákovi, Ph.D., PharmDr. E. Matoušové, Ph.D., Mgr. O. Krenkovi, Mgr. J. Kratochvílovi, Mgr. J. Mikuškovi, Mgr. P. Horkému a Mgr. Z. Hruškové za příjemné pracovní prostředí, cenné rady, životní zkušenosti a udržování pozitivní nálady. V neposlední řadě i M. Klofandové a ostatním pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie.

Za izolace přírodních látek a poskytnutí postupů izolací (viz kapitola 5.3.) patří dík prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. z Katedry farmaceutické botaniky a ekologie a jejich studentům PharmDr. J. Chlebkovi, Ph.D., Mgr. A. Hošťálkové, Ph.D., Mgr. N. Benešové a Mgr. M. Šafratové.

Disertační práce vznikla za podpory SVV 260 183 a GAČR.

Za všestrannou podporu děkuji svým rodičům a manželce.

## Abstrakt

Tato dizertační práce byla zaměřena na strukturní analýzu pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) neznámých přírodních látek izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie z rostlin *Berberis vulgaris* L., *Fumaria officinalis* L. a *Nerine bowdenii* W. Watson. Za tímto účelem byla naměřena a zinterpretována 1D ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) a 2D (gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY, ...) NMR spektra. Pro určení konstitučních izomerů byl optimalizován izotopický indukovaný efekt. Kvůli rozlišení možných stereoizomerů byly využity Mosherovy kyseliny, chirální posunová činidla, nukleární Overhauserův efekt, nepřímá spin-spinová interakce a cirkulární dichroismus. Takto byla vyřešena struktura čtyřiceti pěti alkaloidů včetně absolutní konfigurace, z čehož bylo deset zcela nových látek.

## Abstract

This Thesis was focused on the structural analysis employing nuclear magnetic resonance (NMR) of unknown natural substances, which were isolated at the Department of Pharmaceutical Botany and Ecology from the plants *Berberis vulgaris* L., *Fumaria officinalis* L. and *Nerine bowdenii* W. Watson. For this purpose, 1D ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) and 2D (gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY, ...) NMR spectra were measured and interpreted. Isotopic induced effect was optimized for the determination of the constitutional isomers. To distinguish the possible stereoisomers Mosher method, chiral shift reagent, nuclear Overhauser effect, indirect spin-spin coupling and circular dichroism were used. The structures of forty-five alkaloids were determined including their absolute configuration. Ten of them have not been yet mentioned in the literature before.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	7
1.1. Rostliny.....	8
1.1.1. <i>Berberis vulgaris</i> L. - dřevitá dráča .....	8
1.1.2. <i>Fumaria officinalis</i> L. - zemědělský lékařský .....	11
1.1.3. <i>Nerine bowdenii</i> W. Watson.....	15
1.2. Strukturní analýza.....	17
1.3. Stereochemie .....	18
1.3.1. Konstituční izomery .....	19
Izotopický indukovaný efekt.....	19
1.3.2. Stereoizomery .....	21
Cirkulární dichroismus .....	22
Nukleární Overhauserův efekt .....	23
Derivatizační činidla, Mosherovy kyseliny .....	24
Chirální posunová činidla .....	26
Nepřímá spin-spinová interakce .....	27
2. CÍL PRÁCE.....	29
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....	30
3.1. Látky izolované z rostliny <i>Berberis vulgaris</i> L. ....	31
3.1.1. 8-oxoberberin (BV1, Ckr) .....	31
3.1.2. berbidin, isokarbostyryl (BV3, E42) .....	32
3.1.3. berbanin (BV4, E51).....	33
3.1.4. racemická směs (BV2, C33).....	35
3.1.5. (+)-berbostrejdin (BV13, R623).....	36
3.1.6. (+)-chenabinol (BV12, J24).....	38
3.1.7. (–)-muraricin (BV6, HA2).....	40
3.1.8. (–)-berkristin (BV9, HCHO3) .....	44
3.1.9. (–)-verfillin (BV10, HCHO4).....	48
3.1.10. aromolin (BV8, I32) .....	49
3.1.11. obamegin (BV11, I33).....	50
3.1.12. berbamin (BV7, I1).....	51
3.1.13. (+)-bersavin (BV5, AB1).....	52
3.1.14. 8-trichloromethylhydroberberin (BV14, B11) .....	54
3.2. Látky izolované z rostliny <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	55
3.2.1. <i>N</i> -methylkorydaldin (FO6, 5/076).....	55
3.2.2. korydamin (FO20, 179-201/5).....	56
3.2.3. (–)-stylopin (FO1, MS-1) .....	57
3.2.4. (–)-sinaktin (FO2, 5/067).....	58
3.2.5. (–)-cheilanthifolin (FO16, 190-250/5/1).....	59
3.2.6. protopin (FO7, 2/002).....	60
3.2.7. kryptopin (FO8, 5/070).....	61
3.2.8. (+)-dihydrofumarilin (FO10, 22-29/4/1) .....	62

3.2.9. (-)-fumaricin (FO5, DK-1).....	64
3.2.10. (-)-fumaritin (FO17).....	66
3.2.11. (-)- <i>O</i> -methylfumarofycin (FO3, 5/085) .....	67
3.2.12. (-)-fumarofycin (FO13, Fo397) .....	68
3.2.13. (+)-fumararin (FO14, 176-189/3/1) .....	70
3.2.14. (+)-fumarilin (FO4, MS-3) .....	72
3.2.15. (+)-parfumidin (FO9, 5/075) .....	73
3.2.16. (+)-parfumin (FO19, S2) .....	74
3.2.17. (+)-bikukullin (FO11, 5/072).....	75
3.2.18. (+)-korklumin (FO15, 190-250/3) .....	77
3.2.19. (±)- <i>O</i> -methylfumarofin (FO18, 138-178/4) .....	79
3.2.20. (-)-fumarostrejdin (FO12, 94-101/2/2/2) .....	81
3.3. Látky izolované z rostliny <i>Nerine bowdenii</i> W. Watson.....	84
3.3.1. belladin (NB-1).....	84
3.3.2. krinin (NB-10) .....	85
3.3.3. epibuphanisin (5/084) .....	86
3.3.4. ambellin (1/003) .....	87
3.3.5. 1,2β-epoxyambellin (Fr.109-112/8) .....	89
3.3.6. undulatin (Fr. 37 5/074).....	90
3.3.7. 1- <i>O</i> -deacetylbowdensin (NB-5) .....	91
3.3.8. 1- <i>O</i> -deacetylbowdensin·HCl (Fr.85-92/2).....	93
3.3.9. buphanamin (NB-6 5/094).....	94
3.3.10. 1-acetylykorin (NB-9) .....	95
3.3.11. acetylkarantin (NB-8) .....	96
4. ZÁVĚR.....	97
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	99
5.1. Přístrojové vybavení .....	99
5.2. Obecné experimentální postupy .....	101
5.2.1. Izotopický indukovaný efekt .....	101
5.2.2. Chirální posunové činidlo.....	101
5.2.3. Derivatizační reakce .....	101
5.3. Izolace jednotlivých alkaloidů.....	103
5.3.1. Izolace alkaloidů z rostliny <i>Berberis vulgaris</i> L. ....	103
5.3.2. Izolace alkaloidů z rostliny <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	105
5.3.3. Izolace alkaloidů z rostliny <i>Nerine bowdenii</i> W. Watson .....	110
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	112
7. LITERATURA .....	113
8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST.....	123

## 1. ÚVOD

Život na Zemi není v současnosti zcela vyjasněná událost. Z neživé hmoty se postupem času stala hmota živá, která se začala rozmnožovat, vyvíjet a přeměňovat sebe i své okolí. Tak vzniklo rozmanité množství různých forem života, které mezi sebou začaly spolupracovat a soupeřit o zdroje i prostor. Evoluce nám tak nabízí život, který se snažíme popsat, pochopit a využít. Přes veliký konkurenční tlak si každý druh udržuje své charakteristické vlastnosti, které se projevují například rozdílnou stavbou těla, způsobem života a rozmnožování, tvorbou látek a komunikací s okolím. Přesto panuje až závratná shodnost všech dějů na molekulární úrovni napříč všemi formami života.

Říše rostlin tvořená eukaryotickými, převážně fotosyntetickými organismy obsahuje na 300 000 druhů. Každý druh je charakterizován svými vlastnostmi, vytváří své typické látky, které mají rozličné vlivy na ostatní organismy. Objevování, studium a popis takovýchto látek je součástí systematického poznání, kdy jednotlivé vlastnosti látek je možné chápat jako funkci jejich struktury.

Pro určování struktury nejen těchto látek se v průběhu posledních desetiletí objevilo množství rozličných metod, kde zásadní roli představuje nukleární magnetická rezonance (NMR). Jedná se o relativně mladou techniku s obrovskými možnostmi. Určení struktury již nepředstavuje těžko řešitelný problém, ale otázku několika málo dní, maximálně týdnů. Přesto stále ještě existují látky, u kterých se i přes technickou vybavenost dnešní doby nedaří strukturu určit.

Strukturní analýze, vedle samotné NMR spektroskopie, napomáhá k určení konstituce a konfigurace množství dalších pomocných metod jako jsou například Mosherovy kyseliny, chirální posunová činidla, nukleární Overhauserův efekt a nepřímá spin-spinová interakce.

## 1.1. Rostliny

Z velkého množství dosud známých rostlinných druhů je jen málo z nich studováno pro obsah alkaloidů příp. dalších látek. Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie bylo vybráno několik desítek druhů pro studium jejich obsahových látek. Klíčem k výběru byla zejména potenciální aktivita na inhibici acetylcholinesterázy, případně dosud neprovedené izolace alkaloidů. Následující rostliny byly vybrány pro množství strukturně zajímavých izolovaných látek.

Samotnému určování struktur vždy předchází rešeršní práce, která v tomto případě usnadní strukturní analýzu jednak znalostí již izolovaných a popsanych látek, případně charakteristických strukturních typů, jež odpovídají patřičným biochemickým cestám jejich vzniku.

### 1.1.1. *Berberis vulgaris* L. - dříšťál dráč



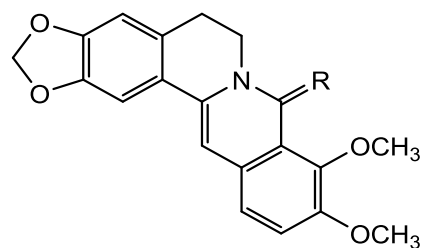
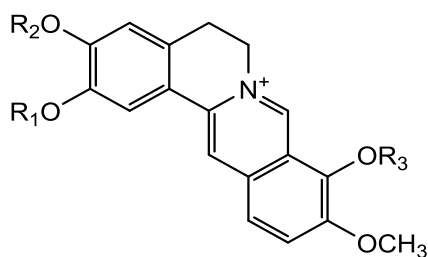
Druh rozšířený v mírném pásu Evropy. U nás roste na slunných stráních a ve světlých hájích. V různých zahradních formách se pěstuje v parcích a zahradách. Jedná se o trnitý keř až 3 m vysoký, s hladkou nazelenalou kůrou a podlouhle vejčitými vykusovanými listy, vyrůstajícími ve svazečcích v úžlabí trnů. Květy (duben až červen) jsou uspořádané do jednoduchých převislých hroznů a mají dráždivé tyčinky. Plody jsou podlouhlé červené bobule, kyselé chuti<sup>1, 2, 3, 4</sup>.

Ve fytoterapii se užívá sušená kůra kořenů případně větví sbíraná na jaře nebo sušený plod získaný v době zralosti. Kořenová droga slouží především k izolaci berberinu nebo alkaloidového komplexu. Používá se jako tonikum, cholagogum, spasmolytikum, diuretikum a jako stimulant dýchacího systému. V lidovém léčitelství se šťáva z bobulí používá při horečnatých stavech i jako osvěžující nápoj. Při předávkování dochází k podráždění centrální nervové soustavy (poruchy vazomotoriky, dýchání), omámení, zvracení a průjmu<sup>1, 2, 3, 4</sup>.

Téměř všechny části rostliny kromě plodů obsahují alkaloidy benzyltetrahydroisochinolinové biosyntetické cesty, tedy odvozené od L-tyrozinu.



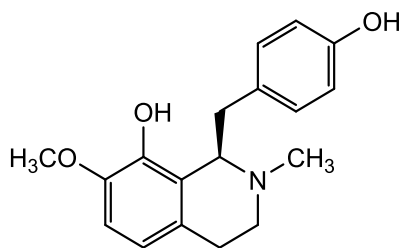
V největším množství jsou zastoupeny alkaloidy ze skupiny **protoberberinové**:<sup>1</sup> berberin **1**, jatrorhizin **2**<sup>5</sup>, kolumbamin **3**, palmatin **4**, berberrudin **5**<sup>6</sup>, 8-oxoberberin **6**, lambertin **7**<sup>7</sup>.



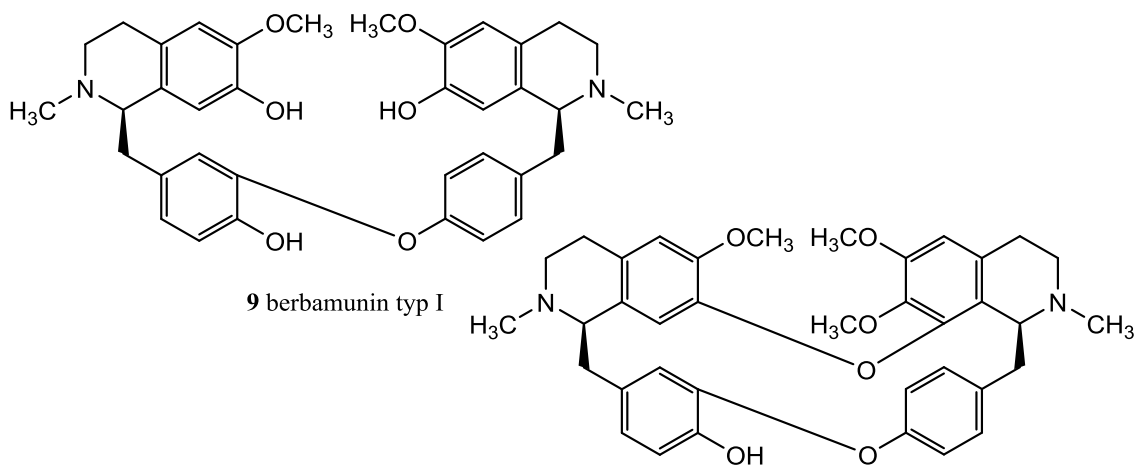
- 1** berberin       $R_1 + R_2 = \text{CH}_2, R_3 = \text{CH}_3$   
**2** jatrorhizin     $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{CH}_3$   
**3** kolumbamin     $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3$   
**4** palmatin       $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3$   
**5** berberrudin    $R_1 + R_2 = \text{CH}_2, R_3 = \text{H}$

- 6** 8-oxoberberin  $R = \text{O}$   
**7** lambertin       $R = \text{H}_2$

Ze skupiny **benzylisochinolinové** se jedná mimo jiné o yuziphin **8**<sup>7</sup>, a ze skupiny **bisbenzylisochinolinové**<sup>5, 8, 9, 10, 11, 12</sup> např. o berbaminin **9**, oxyacanthin **10** a berbamin **11**. Bisbenzylisochinolinové alkaloidy jsou řazeny do jednotlivých typů podle počtu a poloh etherických můstků mezi jednotlivými částmi<sup>8</sup>.

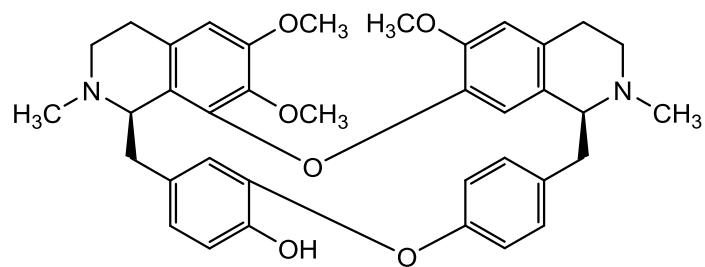


**8** yuziphin



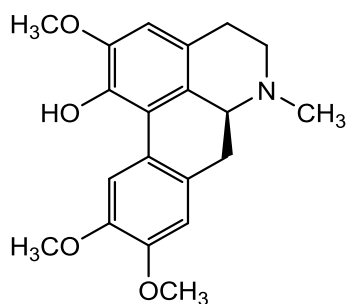
**9** berbaminin typ I

**10** oxyacanthin typ VI

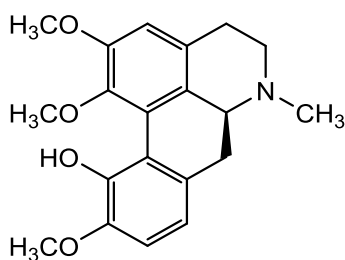


**11** berbamin typ VIII

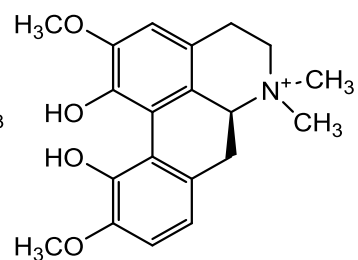
Vedle výše zmíněných strukturních skupin se v této rostlině vyskytují i **aporfiny**<sup>1</sup> talikmidin **12**, isocorydin **13**<sup>5</sup> a magnoflorin **14**<sup>13</sup>, dále pak i bervulcin a vulcarin, u nichž není struktura dosud plně určena<sup>14</sup>.



**12** talikmidin

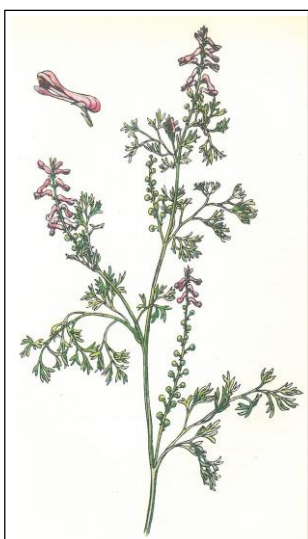


**13** isocorydin



**14** magnoflorin

### 1.1.2. *Fumaria officinalis* L. - zemědělm lékařský



Rostlina původem z Přední Asie, dnes rozšířená v celé Evropě a v Asii. U nás se vyskytuje jako plevel hojně na zahradách, polích a podél cest. Roste od nížin až do horského pásma<sup>2,3</sup>.

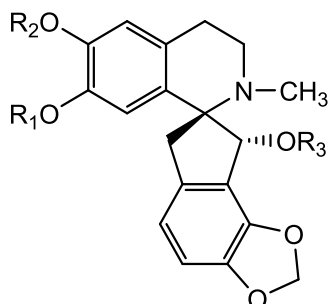
Jedná se o jednoletou, až 30 cm vysokou šedozelenou bylinu s dutou, hranatou bohatě odspodu rozvětvenou a listnatou lodyhou. Listy má světle zelené, řapíkaté, dvakrát jemně zpeřené, s lístky rovněž řapíčkátými, dlanitě dělenými v podlouhlé, asi 3 mm široké úkrojky. Světle až nachově červené květy s tupou ostruhou jsou zygomorfni, v bohatých přímých hroznech, kvete od dubna do září. Plody jsou kulovité až ledvinovité nažky na stopkách. Kromě zemědělm lékařského roste u nás dalších, velmi si podobných, 5 druhů tohoto rodu<sup>2,3</sup>.

Užívanou drogou je sušená kvetoucí nať sbíraná v květnu až červenci. Usušená je bez pachu a má poněkud slanou a nahořklou chuť. Dnes se používá omezeně v nálevech jako stomachikum, laxativum a slabé diuretikum. Převážně však jako choleretikum při žlučnickových a jaterních nemocech, žaludeční dyspepsii a při zácpě. Zevně se užívá ve formě obkladů nebo koupelí při kožních vyrážkách, ekzémech a hemoroidech (obvykle s listem vlašského ořechu)<sup>2,3</sup>.

V usušené droze je obsaženo 1,25% alkaloidů, množství hořčin a jiných dosud málo známých látek. Působením na hladké svalstvo tato rostlina urychluje střevní peristaltiku a současně má i diuretický účinek. Dále pak napomáhá látkové výměně, příznivě ovlivňuje činnost žaludku, při poruchách žlučníku. Ve větších dávkách může působit ochrnutí dýchacího centra.

Alkaloidy, na které je rostlina obzvlášť bohatá, zejména na množství druhů i jednotlivých zástupců, lze rozdělit do několika strukturních typů. Všechny však vycházejí ze stejné biosyntetické cesty vycházející z L-tyrozinu.

**Spirobenzylisochinolinový typ** alkaloidů tvoří největší skupinu obsahových látek rostliny *Fumaria officinalis*. Vznikají přeměnou protoberberinových alkaloidů. Z rostliny již byly izolovány tyto látky: (-)-fumaritin **15**<sup>15, 16</sup>, (-)-fumaricin **16**<sup>15, 16</sup>, (+)-dihydrofumarilin **17**<sup>15</sup>, fumaritrin **18**<sup>16</sup>, (-)-fumarofycin **19**<sup>15, 16, 17</sup>, (-)-*O*-methylfumarofycin **20**<sup>16, 17</sup>, (+)-parfumin **21**<sup>17</sup>, (+)-parfumidin **22**<sup>16</sup>, (+)-fumarilin **23**<sup>15, 16</sup>.



**15** (-)-fumaritin  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = H$

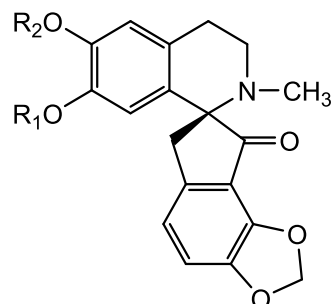
**16** (-)-fumaricin  $R_1, R_2 = CH_3, R_3 = H$

**17** (+)-dihydrofumarilin  $R_1 + R_2 = CH_2, R_3 = H$

**18** fumaritrin  $R_1, R_2, R_3 = CH_3$

**19** (-)-fumarofycin  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = COCH_3$

**20** (-)-*O*-methylfumarofycin  $R_1, R_2 = CH_3, R_3 = COCH_3$

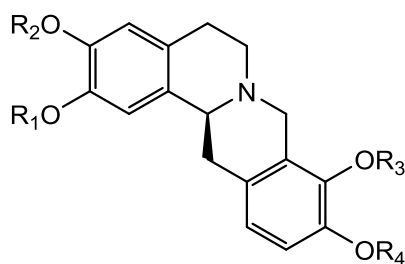


**21** (+)-parfumin  $R_1 = H, R_2 = CH_3$

**22** (+)-parfumidin  $R_1, R_2 = CH_3$

**23** (+)-fumarilin  $R_1 + R_2 = CH_2$

Druhou nejpočetnější skupinou jsou alkaloidy **protoberberinového typu**, které obsahují ve své molekule benzylisochinolinový skelet. Jedná se jednak o terciární aminy: (-)-stylopin **24**<sup>15</sup>, (±)-stylopin<sup>15</sup>, (-)-sinaktin **25**<sup>15, 17</sup>, *N*-methylsinaktin **26**<sup>15</sup>, (-)-skulerin **27**<sup>15</sup> a (-)-cheilanthifolin **28**<sup>18</sup>, tak i o kvarterní amoniové soli např. koptisin **29**<sup>19</sup>.



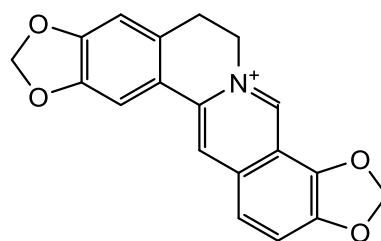
**24** (-)-stylopin  $R_1 + R_2 = CH_2, R_3 + R_4 = CH_2$

**25** (-)-sinaktin  $R_1, R_2 = CH_3, R_3 + R_4 = CH_2$

**26** *N*-methylsinaktin  $R_1, R_2 = CH_3, R_3 + R_4 = CH_2, N^+ - CH_3$

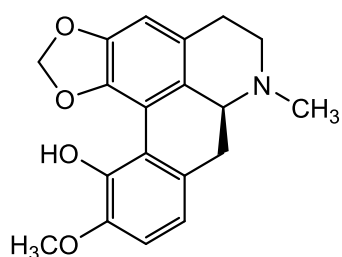
**27** (-)-skulerin  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = CH_3$

**28** (-)-cheilanthifolin  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 + R_4 = CH_2$

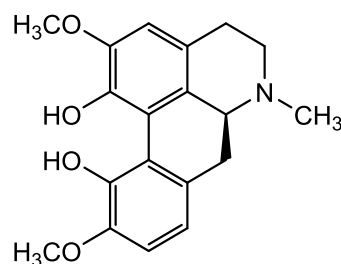


**29** koptisin

**Typ aporfinový** vzniká spojením dvou aromatických jader benzylochinolinové jednotky. Ve *Fumarii officinalis* byly identifikovány (+)-bulbokapnin **30**<sup>19</sup> a (+)-korytuberin **31**<sup>19</sup>.

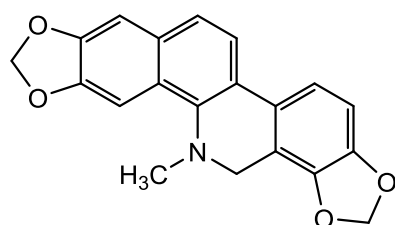


**30** (+)-bulbokapnin

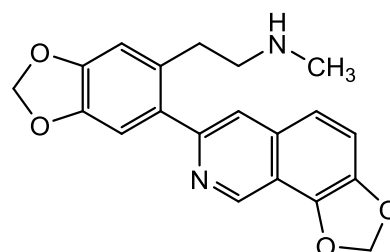


**31** (+)-korytuberin

Přeměnou protoberberinových alkaloidů vznikají látky **benzofenanthridinového** typu např. sanguinarin **32**<sup>17</sup> a otevřený alkaloid tohoto typu korydamin **33**<sup>17</sup>.

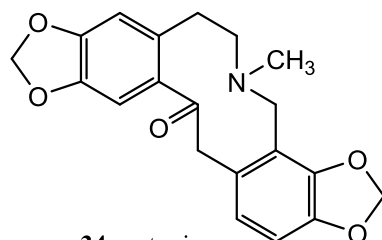


**32** sanguinarin

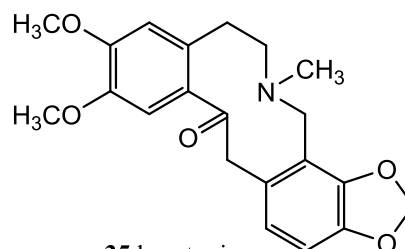


**33** korydamin

Alkaloidy **protopinového** typu protopin **34**<sup>15, 17</sup> a kryptopin **35**<sup>15, 17</sup>, vznikají oxidací protoberberinových alkaloidů.

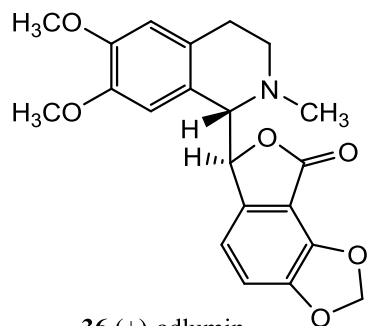


**34** protopin

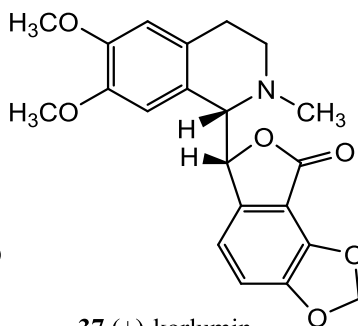


**35** kryptopin

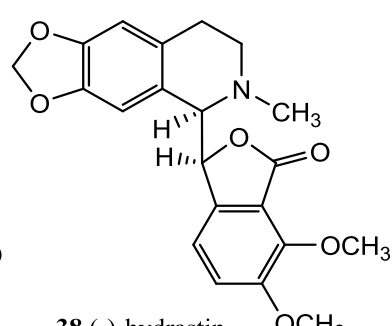
Skupinu alkaloidů s laktonovým kruhem tvoří **typ ftalidisochinolinový**, kde mezi zástupce v této rostlině patří (+)-adlumin **36**<sup>17</sup>, (+)-korklumin **37**<sup>17</sup> a (-)-hydrastin **38**<sup>17</sup> s neobvykle rozdílnými uspořádáními chirálních center.



**36** (+)-adlumin

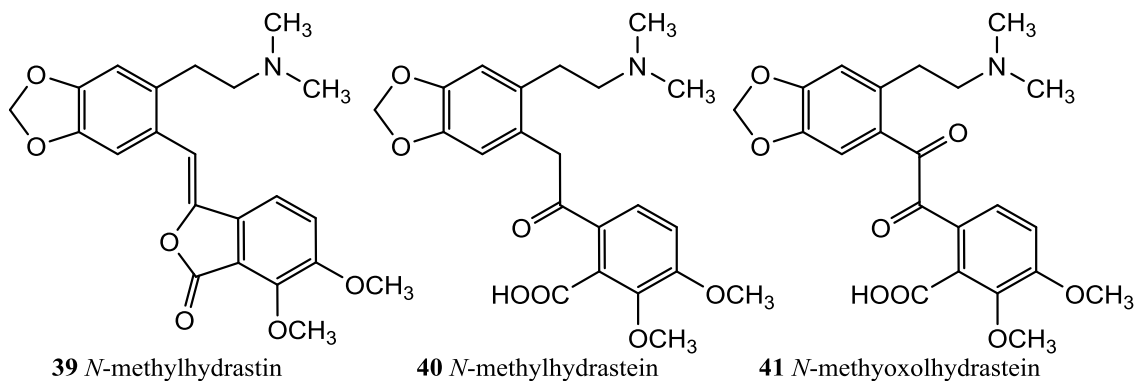


**37** (+)-korklumin

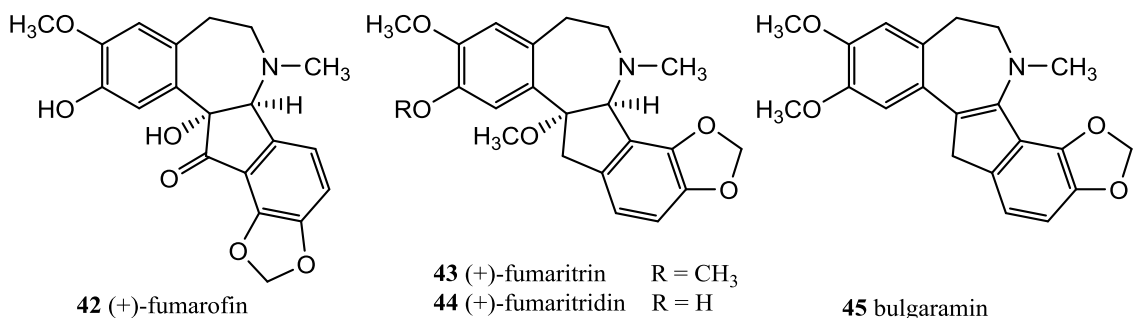


**38** (-)-hydrastin

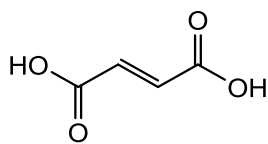
**Typ sekoftalidisochinolinový** vzniká pravděpodobně otevřením jednoho či více kruhů předchozího typu spojeného s oxidací. Z rostliny byly izolovány: *N*-methylhydrastin **39**<sup>15, 20</sup>, *N*-methylhydrastein **40**<sup>15, 20</sup> a *N*-methyloxohdrastein **41**<sup>20</sup>.



Poměrně často přítomnými látkami jsou alkaloidy **indenobenzazepinového typu**, např. (+)-fumarofin **42**<sup>15, 16</sup>, (+)-fumaritrin **43**<sup>21</sup>, (+)-fumaritridin **44**<sup>21</sup> a bulgaramin **45**<sup>22</sup>.



Vedle bohatě zastoupených alkaloidů je rostlina zdrojem i dalších obsahových látek, studiu jejich biologické aktivity se věnuje stále větší pozornost. Z fenolických látek to jsou flavanoidy isokvercetin, kvercetin-3,7-glukosid, kvercetin-3-arabinosyl-glukosid, rutin kamferol-arabinosid<sup>23, 24</sup>. V největší míře zastoupená kyselina fumarová **46** byla pokusně terapeuticky použita při léčbě lupenky<sup>25</sup>, dále u ní byl zkoumán antikarcinogenní a antifungální účinek. Z dalších obsahových látek to jsou zejména kyselina skořicová, kávová, ferulová, chlorogenová a deriváty kyseliny jablečné<sup>26</sup>.



**46** kyselina fumarová

### 1.1.3. *Nerine bowdenii* W. Watson

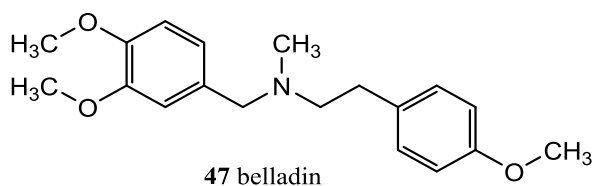


Endemická vytrvalá rostlina, domácí v jižní Africe v Dračích horách a okolí Kapského města (KwaZulu-Natal Drakensberg a Eastern Cape Provenience). Pro své květy je dnes již široce pěstovaná i jako okrasná květina, vyhledávající zejména deštivé léto a chladné suché zimy<sup>27, 28</sup>.

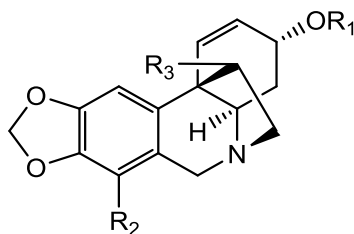
Trvalá bylina se stonkem a listy, ve tvaru pásků, vyrůstajícími z cibule (8-10 cm) do výšky až 45 cm. Stonek nese pěkně růžové květy, zřasené plátky připomínající drobně nařezané lilie. Kvete v pozdním létě a na podzim<sup>29</sup>.

Pro přítomnost množství alkaloidů jsou nejzajímavější částí rostliny cibule. V dostupné literatuře nebyla nalezena žádná zmínka o tradičním užívání této drogy, zato alkaloidní extrakty vykazují zajímavou aktivitu na acetyl- a butyrylcholin esterázu.

Z velkého množství alkaloidů je nejvíce zastoupený belladin **47**<sup>28, 30</sup>.

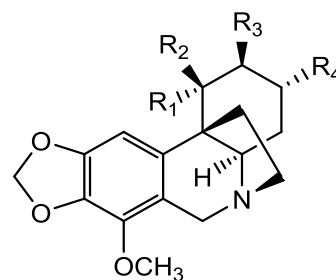


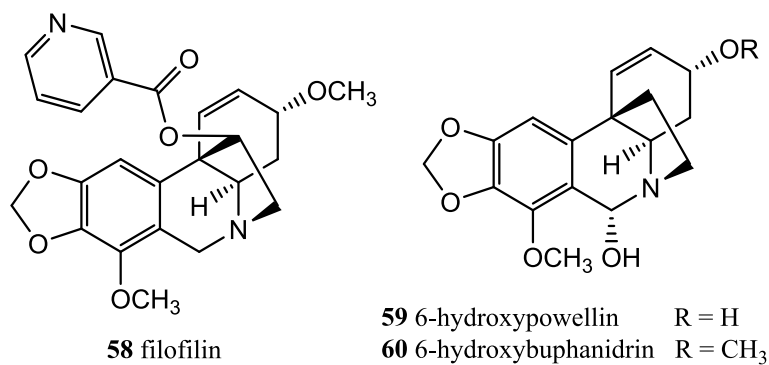
Z dalších obsahových látek se jedná zejména o alkaloidy **krininového typu**, které vznikají spojením aromatických jader derivátu belladinu. Jedná se o již izolované látky: krinamidin **48**<sup>30</sup>, undulatin **49**<sup>30</sup>, bowdensin **50**<sup>30</sup>, nerbowdin **51**<sup>30</sup>, krinin **52**<sup>30</sup>, buphanisin **53**<sup>30</sup>, krinamin **54**<sup>30</sup>, buphanidrin **55**<sup>30</sup>, ambellin **56**<sup>30, 31</sup>, 11-*O*-acetylabellin **57**<sup>27</sup> a filofilin **58**<sup>27</sup> s navázanou kyselinou nikotinovou. Alkaloidy s atypickou substitucí v poloze 6 tohoto typu jsou 6-hydroxypowellin **59**<sup>32</sup> a 6-hydroxybuphanidrin **60**<sup>32</sup>.



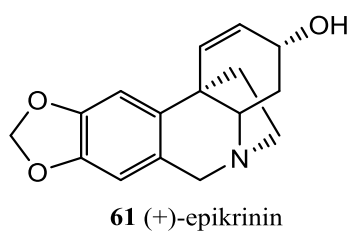
- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>52</b> krinin                      | $R_1, R_2, R_3 = H$                      |
| <b>53</b> buphanisin                  | $R_1 = CH_3, R_2, R_3 = H$               |
| <b>54</b> krinamin                    | $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH$          |
| <b>55</b> buphanidrin                 | $R_1 = CH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = H$       |
| <b>56</b> ambellin                    | $R_1 = CH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$      |
| <b>57</b> 11- <i>O</i> -acetylabellin | $R_1 = CH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OCOCH_3$ |

- |                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| <b>48</b> krinamidin | $R_1 = H, R_2 + R_3 = O, R_4 = OH$    |
| <b>49</b> undulatin  | $R_1 = H, R_2 + R_3 = O, R_4 = OCH_3$ |
| <b>50</b> bowdensin  | $R_1, R_3 = OCOCH_3, R_2, R_4 = H$    |
| <b>51</b> nerbowdin  | $R_1 = OH, R_2, R_3 = H, R_4 = OH$    |

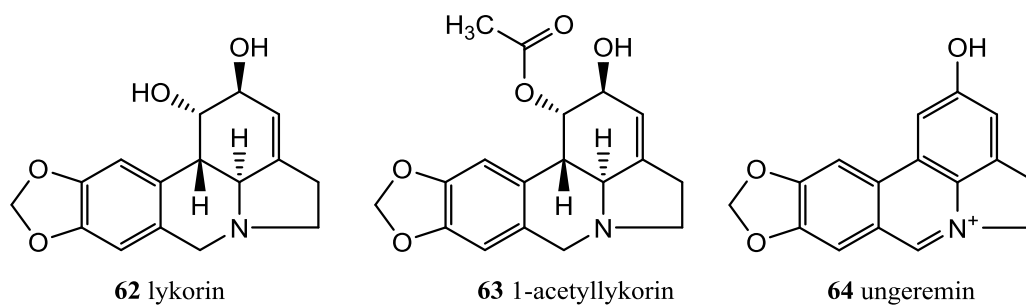




Jako jediný, zatím publikovaný, zástupce **haemanthaminového typu** je (+)-epikrinin **61**<sup>30</sup>.



Ze skupiny alkaloidů **lykorinového typu** byly popsány látky: lykorin **62**<sup>30</sup>, 1-acetyllykorin **63**<sup>30</sup> a ungeremin **64**<sup>33</sup>.





## 1.2. Strukturní analýza

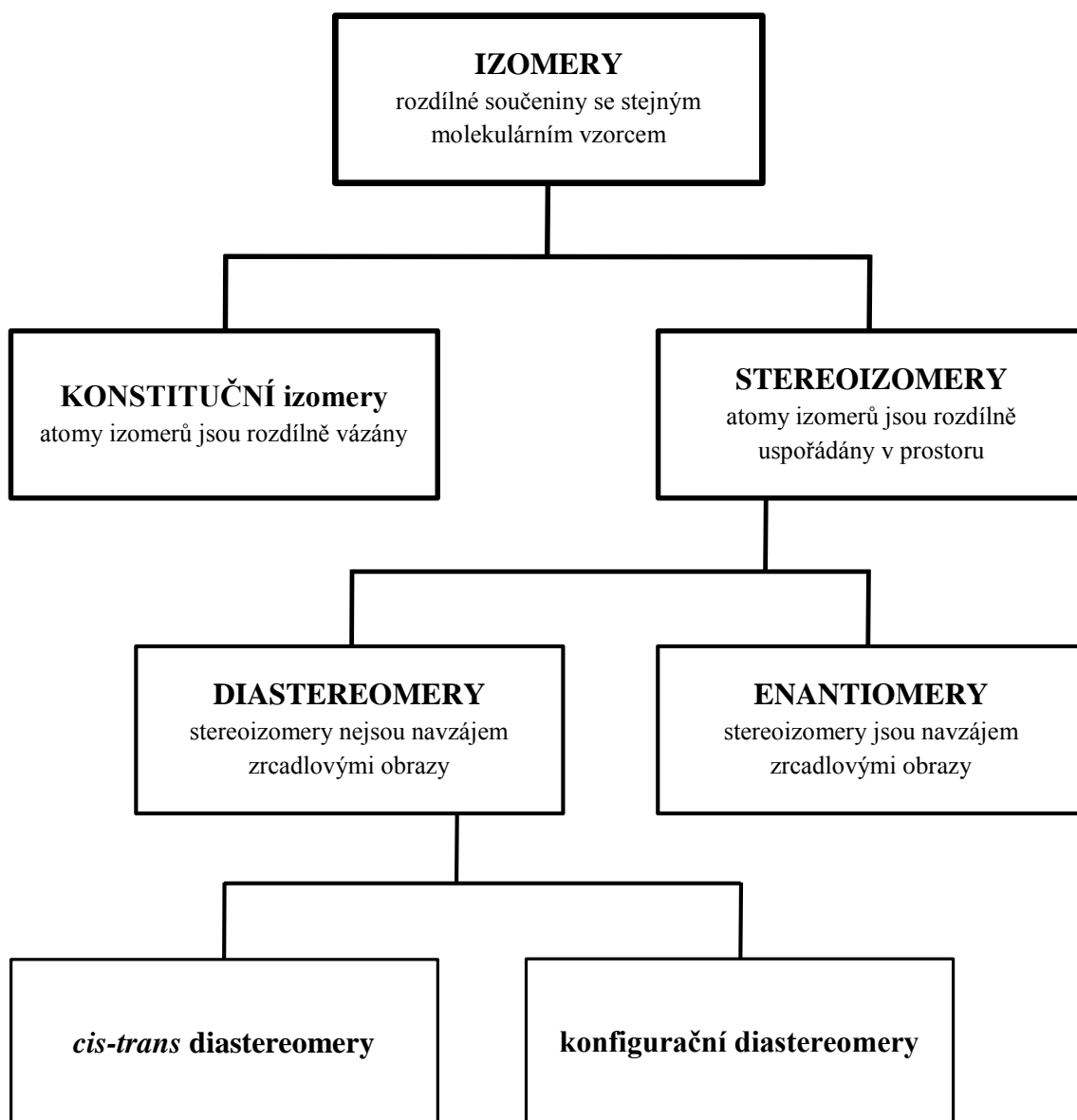
Izolací alkaloidů ze zmíněných tří rostlinných druhů bylo získáno několik desítek organických látek se záměrem nejprve určit jejich strukturu. Struktura organických látek se obvykle určuje pomocí těchto nejdůležitějších metod: hmotnostní spektrometrie (MS), infračervená spektroskopie (IR), ultrafialová spektroskopie (UV) a nukleární magnetická rezonance (NMR). Hmotnostní spektrometrie vypovídá o velikosti a složení molekuly, IR informuje o přítomnosti funkčních skupin a UV o konjugovaných systémech elektronů. Nukleární magnetická rezonance poskytuje nejvíce informací z hlediska určování struktury organických látek.

K určení struktury vede klikatá cesta, kde vstupní branou je molekulová hmotnost a v ideálním případě i sumární vzorec. Následuje pak sestavování jednotlivých skupin atomů, substrukturálních fragmentů a určování jejich vzájemných vztahů, což v ideálním případě vede k určení konstituce, eventuálně k několika málo konstitučním izomerům. Dalším mezníkem u některých látek je zjištěná přítomnost chirálních center, z které plyne určování relativní a v lepším případě i absolutní konfigurace. Pod pojmem struktura v užším slova smyslu je pak možné chápat i znalost nejstabilnější konformace, vazebných úhlů, délek vazeb a přítomnost všech vazebných a nevazebných interakcí. Těmito a dalšími otázkami se pak podrobněji zabývá stereochemie.

Pro řešení konstituce (rozlišení konstitučních izomerů) a zejména konfigurace neznámých látek bylo vedle klasických jedno i vícedimenzionálních experimentů použito množství speciálních technik. Zejména se jedná o Izotopický indukovaný efekt, Nukleární Overhauserův efekt, Chirální posunová činidla a Nepřímou spin-spinovou interakci. Vedle těchto metod využívajících NMR principů byla též použita Optická otáčivost a Cirkulární dichroizmus.<sup>34, 35, 36</sup>

### 1.3. Stereochemie

Stereochemie je disciplína organické chemie zabývající se studiem prostorové stavby molekul a jejím vztahem k fyzikálním a chemickým vlastnostem látek. Dvě sloučeniny se stejným sumárním vzorcem a rozdílnou chemickou strukturou nazveme izomery, které klasifikujeme na základě rozdílné struktury, viz Obr. 1<sup>34, 35</sup>.



Obr. 1 Izomerie organických sloučenin

### 1.3.1. Konstituční izomery

Izomery, ve kterých jsou jednotlivé atomy v molekule spojeny různým způsobem, nazveme konstituční izomery. Tyto sloučeniny se mohou lišit uspořádáním uhlíkatého řetězce, funkčními skupinami nebo jejich polohou<sup>35</sup>. V tomto kontextu je třeba rozlišit mezi „konstitucí“ a „strukturou“. Zatímco konstitucí je myšleno právě uspořádání uhlíkatého řetězce, poloha skupin, atd., tak pojem struktura zahrnuje celkovou architekturu (prostorovou stavbu) molekuly<sup>36</sup>. Nejen z hlediska určování konstituce je nukleární magnetická rezonance (NMR) nejcennější technika<sup>35</sup>.

Prvotní NMR data (chemické posuny a počty  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR signálů) dávají vzniknout obrovskému množství teoretických konstitučních izomerů. Limita jejich počtu přes NMR korelace ( $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  HMBC a 1,1-ADEQUATE) vede, přinejmenším, k redukci počtu možných výsledků, právě v závislosti na dostatku, přesnosti a kvalitě těchto informací<sup>37,38</sup>. Právě multidimenzionální NMR techniky jsou tím pravým klíčem ke strukturní analýze. Tento přístup je tedy v zásadě závislý na přítomnosti korelací a tak, pro zvolené experimenty, i přítomnosti protonů<sup>39</sup>. Pokud určovaná látka nebo její část trpí nedostatkem přítomných protonů, je nutné pro vyloučení teoretických konstitučních izomerů nalézat další metody. Jako jedna z možností se nabízí, pro vybrané látky, izotopický indukovaný efekt.

#### Izotopický indukovaný efekt

Bohatě substituované aromatické sloučeniny s četnými volnými i substituovanými fenolickými skupinami (typické pro bisbenzylisochinolinové alkaloidy, viz *Berberis vulgaris*) poskytují na těchto pozicích konstituční izomery. Ty nelze běžně rozlišit, protože atomy vodíků fenolických hydroxylů, vlivem chemické výměny, zpravidla neposkytují žádné korelace a etherické můstky mezi dvěma neprotonovanými atomy uhlíků opět nelze dokázat korelacemi přes větší počet vazeb. V těchto případech lze s výhodou užít izotopický indukovaný efekt deuteria.

Izotopická výměna atomu vodíku za atom deuteria např. na fenolické skupině, ... ovlivní dynamické a elektronové vlastnosti molekuly. Změny v dynamických vlastnostech se projeví mírnou změnou rotačně-vibrační geometrie molekuly a průměrnou délkou vazby (kratší a pevnější vazba). Změny elektronových vlastností se projeví ve změně chemických posunů a interakčních konstant v souvislosti i se změnou geometrie. Velikost změny chemického posunu je tedy závislá na elektronových

i dynamických změnách a je značně závislá na struktuře molekuly (vázaných atomech, hybridizaci, vzdálenosti, vazebných úhlech, atd.)<sup>40, 41, 42, 43, 44, 45, 46</sup>

Na jádra měřených atomů působí v daném místě efektivní magnetické pole  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$ , které je dáno rozdílem indukce externího  $\mathbf{B}_0$  a lokálního  $\mathbf{B}_{\text{loc}}$  magnetického pole (1). Velikost lokálního magnetického pole  $\mathbf{B}_{\text{loc}}$  je úměrná externímu  $\mathbf{B}_0$  s konstantou úměrnosti  $\sigma$  (1)<sup>47</sup>.

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}_{\text{loc}} = (1 - \sigma)\mathbf{B}_0 \quad (1)$$

$$\sigma = \sigma^{\text{dia}} + \sigma^{\text{para}} + \sigma^{\text{I}} \quad (2)$$

Kde  $\sigma$  je konstanta magnetického stínění a  $\sigma^{\text{dia}}$  je diamagnetický příspěvek zprostředkovaný magnetickým polem elektronů orbitalu  $s$  měřeného atomu (opačně orientovaný než magnetické pole  $\mathbf{B}_0$ ),  $\sigma^{\text{para}}$  paramagnetický příspěvek vytvořený elektrony orbitalů  $p$  (souhlasný se směrem  $\mathbf{B}_0$ ) a  $\sigma^{\text{I}}$  je vliv generovaný sousedními atomy a skupinami<sup>47</sup>.

Izotopická výměna atomu vodíku za deuterium vede ke změně jednotlivých příspěvků (zejména  $\sigma^{\text{I}}$ ) konstanty magnetického stínění  $\sigma$  a tedy i ke změně efektivního magnetického pole  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$  a tedy i ke změně rezonanční frekvence  $\nu$  (3) pozorovaného jádra<sup>40, 47</sup>, kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr příslušného jádra.

$$\nu = \gamma \mathbf{B}_{\text{eff}} / 2\pi \quad (3)$$

Změna rezonanční frekvence indukovaná selektivní deuterací se projeví změnou chemického posunu (4)<sup>41, 42</sup>.

$${}^n\Delta^{13}\text{C}(\text{HD}) = \delta^{13}\text{C}(\text{XD}) - \delta^{13}\text{C}(\text{XH}) \quad (4)$$

kde  $n$  je počet vazeb mezi místem výměny a pozorovaným atomem (D - X -  $^{13}\text{C}$ ,  $n = 2$ ),  $\Delta$  je rozdíl chemických posunů,  $\delta$  je chemický posun příslušného jádra. Dále bude vztah (4) užíván pro chemický posun atomů  $^{13}\text{C}$  a uváděn ve zjednodušeném tvaru (5).

$${}^n\Delta_{\delta} = \delta_D - \delta_H \quad (5)$$

### 1.3.2. Stereoizomery

Dva izomery, ve kterých jsou jednotlivé atomy v molekule spojeny stejným způsobem (ve stejném pořadí), avšak rozdílně uspořádány v prostoru, nazveme stereoizomery, viz Obr. 1. Dvojici stereoizomerů je možné dále klasifikovat podle jejich vzájemného vztahu na enantiomery (zrcadlové obrazy) a diastereomery. V množině diastereomerních vztahů dále rozeznáváme *cis-trans* izomery<sup>34,35,36</sup>.

Objev stereochemie ukázal, že konstituční vzorec necharakterizuje úplně danou sloučeninu, u takových látek musíme znát, pojmenovat jejich konfiguraci (prostorové uspořádání substituentů okolo centra chiralidy). V tomto kontextu je třeba opět rozlišit mezi znalostí „absolutní konfigurace“ a „strukturou“. Jak již bylo zmíněno, znalost struktury zahrnuje celkovou architekturu, prostorovou stavbu molekuly, kdežto konfigurace popisuje pouze vzájemnou orientaci substituentů okolo centra chiralidy<sup>34,35,36</sup>.

Pro určování absolutní konfigurace a dokonce i struktury látek je široce používána rentgenostrukturní analýza a elektronová difrakce. Ultrafialová a infračervená spektroskopie má jen minoritní přínos. Nukleární magnetická rezonance zejména díky nukleárnímu Overhauserově efektu (NOE), Karplusově rovnici, Mosherovým kyselinám atd. poskytuje velmi cenné, často nenahraditelné údaje o popisu konfigurace<sup>48</sup>. Největší přínos však pravděpodobně skýtá cirkulární dichroismus (CD) a optická rotační disperze (ORD)<sup>34,35</sup>. V následujícím textu budou tyto jednotlivé techniky přiblíženy společně se svým přínosem.

## Cirkulární dichroizmus

Optickou aktivitou nazýváme schopnost některých molekul či systémů rozdílně interagovat s pravo- a levotočivým kruhově polarizovaným elektromagnetickým zářením. Diference v absorpčních koeficientech  $\Delta\varepsilon$  (6) (příp. v absorbanci  $\Delta A$  (7)), těchto dvou záření, dává vzniknout technice cirkulárního dichroizmu (CD)<sup>49</sup>.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta A / l.c \quad [l.mol^{-1}.cm^{-1}] \quad (6)$$

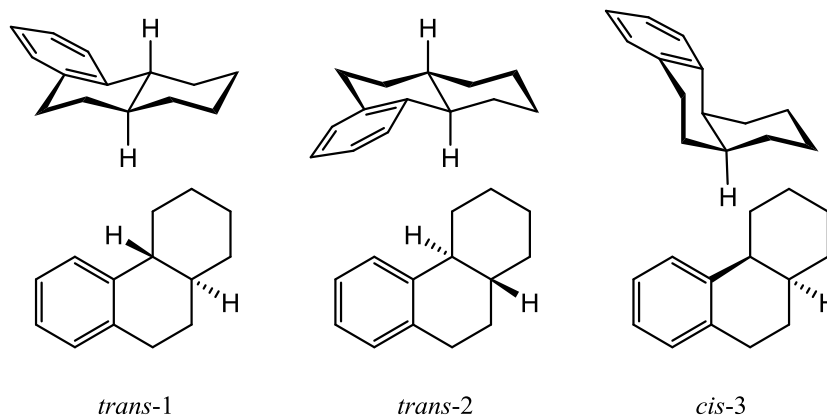
$$\Delta A = A_L - A_R \quad (7)$$

Kde  $l$  je délka optické dráhy v cm a  $c$  je molární koncentrace. Vedle nejlogičtějšího parametru  $\Delta\varepsilon$ , který přímo udává molekulární vlastnost je možné CD spektra uvádět i v hodnotách molární elipticity  $[\Theta]$  (8), kde  $\tan^{-1}\Theta = b/a$  ( $b, a$  jsou poloosy referenční elipsy na výstupu ze vzorku). Pro výpočet molární elipticity se obvykle používá přibližný vztah (9)<sup>49,51,52</sup>.

$$[\Theta] = \Theta.M / l.c.100 \quad [deg.cm^2.dmol^{-1}] \quad (8)$$

$$[\Theta] \approx 3300 \cdot \Delta\varepsilon \quad (9)$$

Křivky CD jsou citlivé na stavbu molekul, zejména na konfiguraci v blízkosti chromoforů. Typické chromofory vyskytující se v alkaloidech rostlin *Fumaria officinalis* a *Nerine bowdenii* jsou methylenedioxyfenyl případně dimethoxyfenyl. Pro tyto alkaloidy je typický i polycyklický systém tvořený jednak aromatickým jádrem chromoforu a dalšími dvěma cyklohexanovými kruhy. Na základě známých látek s polycyklickým skeletem byly vysloveny pravidla kvadrantů<sup>50</sup>. Pro jednoduchost se u alkaloidů z těchto rostlin vyskytují tři typy napojení kruhů *trans*-1, *trans*-2 a *cis*-3 viz Obr. 2<sup>51,52</sup>. CD křivky všech typů jsou rozdílné a je tedy možné určit absolutní konfigurace center chiralit na spojnicí kruhů<sup>53,54,55,56</sup>.



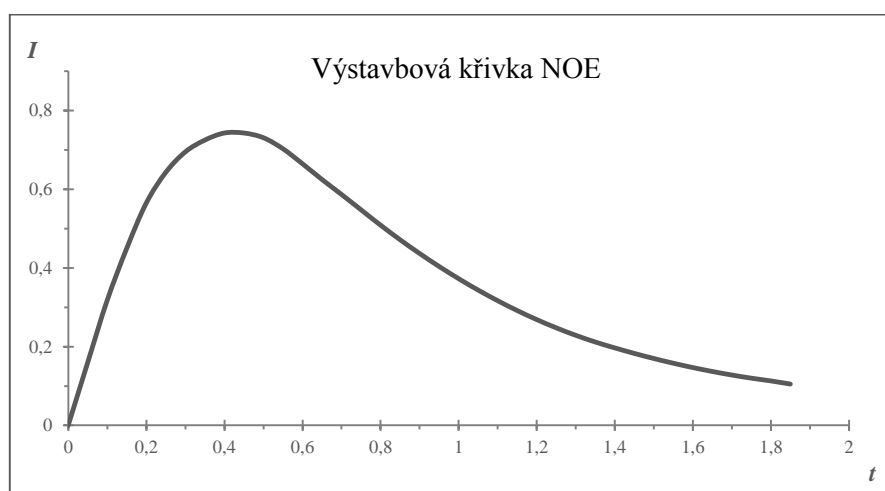
Obr. 2 Typy napojení kruhů (klíny .....  $\blacktriangleright$  odpovídají axiálním vazbám)

## Nukleární Overhauserův efekt

Změny intenzit signálů pozorovaných jader způsobené pomocí ozařovaného pole  $B_2$  jiných jader jsou označovány jako nukleární Overhauserův efekt (NOE). NOE efekt je možné pozorovat mezi jádry (X a A), jejichž hlavním relaxačním mechanismem je dipól-dipólová relaxace. Při saturaci přechodů jader X dochází ke změnám populací jader A na jednotlivých energetických hladinách a tedy ke změnám pozorovaných intenzit signálů jader A. Změnu intenzit danou poměrem při a bez ozáření je možné vyčíslit maximální hodnotou  $(10)^{47,57,58,59,60}$ , kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr příslušného jádra.

$$\text{NOE}_{(\text{max})} = \gamma_X / 2 \cdot \gamma_A \quad (10)$$

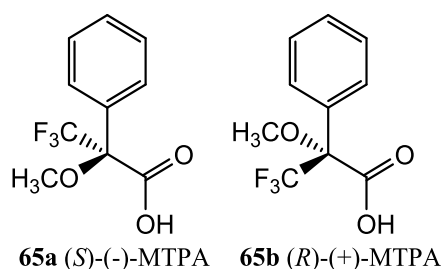
Měření prostorových vzdáleností je limitováno maximální vzdáleností cca 5 Å, kde intenzita rychle klesá úměrně s šestou mocninou vzdálenosti jader. Intenzita přenosu je dále ovlivněna směřovací časem. Při krátkých směšovacích časech  $t$  (do 100 ms) má výstavbová křivka intenzity NOE  $I$  lineární průběh viz Obr. 3. V čase 300-600 ms dosahuje svého maxima a následně převládou relaxační mechanismy (převážně  $T_1$  relaxace a spinová difuze) a dochází k poklesu intenzity  $I$  k nule viz Obr. 3. Pomocí NOE efektu je možné řešit uspořádání chirálních center tj. relativní konfiguraci, relativní vzdálenosti atomů, atd. <sup>47,57,58,59,60</sup>.



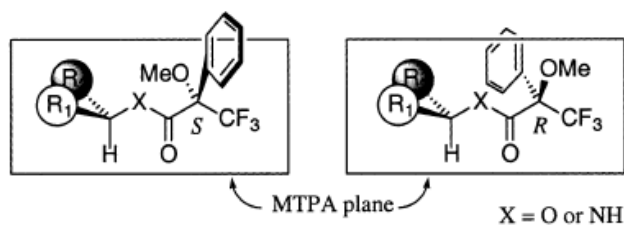
Obr. 3 Intenzita NOE  $I$  v závislosti na směšovacím čase  $t$

## Derivatizační činidla, Mosherovy kyseliny

Dva enantiomery mají odpovídající jádra a skupiny enantiotopické, jejich signály tedy izochronní a NMR spektra identická. Dva enantiomery nelze použitím standardních postupů pomocí NMR spektroskopie rozlišit. Ve dvojici diastereomerů jsou odpovídající jádra a skupiny diastereotopické, signály anizochronní a spektra rozdílná. Princip diastereotopie je mimo jiné využíván při určování absolutní konfigurace pomocí Mosherových kyselin<sup>47</sup>.



Mosherovy kyseliny jsou  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)fenyloctové kyseliny (MTPA, **65**). Jedná se o (*S*) a (*R*) stereoizomery, jejichž estery se sekundární hydroxylovou skupinou (případně aminoskupinou vázanou na sekundárním uhlíku) vytvoří dvojici diastereomerů s rozdílnými spektry. Klíčové pro určení absolutní konfigurace sekundární hydroxylové skupiny je tzv. MTPA rovina viz Obr. 4. V jedné rovině se vyskytují  $\text{CF}_3$  skupina, karbonylový kyslík a vodík terciárního uhlíku hydroxylové skupiny<sup>61,62</sup>. V přítomnosti iontů kovů, které je nutné se vyvarovat, může dojít ke koordinaci iontu na kyslík methoxyskupiny a karbonylové skupiny, čímž dojde k vychýlení  $\text{CF}_3$  skupiny z MTPA roviny a ke změně místa stínění benzenového kruhu<sup>62</sup>.

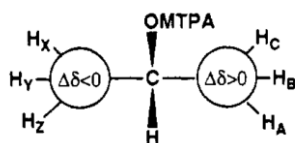


Obr. 4 MTPA rovina



Rozdíly ve stínění benzenovým jádrem u *R* a *S* izomeru se projeví změnami chemických posunů příslušných substituentů  $R_1$  a  $R_2$ . Z rozdílů chemický posunů  $\Delta\delta$  podle vztahu (11) pro každý vodíkový atom se určí oblast s kladnou a zápornou hodnotou těchto rozdílů a následně i absolutní konfigurace viz Obr. 5<sup>63,64</sup>.

$$\Delta\delta = \delta_S - \delta_R \quad (11)$$



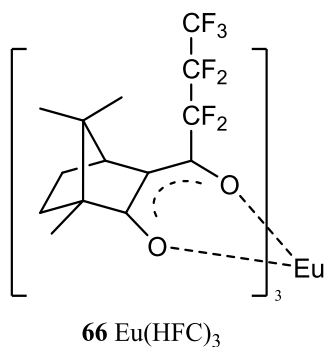
Obr. 5 Určení absolutní konfigurace v závislosti na  $\Delta\delta$

Pro přípravu příslušných esterů je mnoho postupů, většinou založených na použití příslušných chloridů kyselin, bází a dichlormethanu jako rozpouštědla<sup>61,62,63,64,65</sup>. Některé postupy jsou navrženy i na přípravu v pyridinu- $d_5$  případně v NMR kyvetách<sup>66,67,68</sup>.

## Chirální posunová činidla

Dva enantiomery mají NMR spektra identická, kdežto diastereomery mají NMR spektra rozdílná. Princip diastereotopicity je možné použít při rozlišení dvou enantiomerů jednak derivatizací Mosherovými kyselinami, kde limitujícím faktorem je přítomnost volné funkční skupiny umožňující derivatizaci. Druhou možností jsou chirální rozpouštědla přidaná ve velkém nadbytku za předpokládaného vzniku diastereomerně solvatovaných enantiomerů s rozlišitelnými spektry. Problém zde představuje jednak množství použitého nedeuterovaného rozpouštědla, tak i malá účinnost<sup>47,69,70,71,72</sup>.

Výhodnou metodou je použití chirálního lanthanidového posunového činidla. Zpravidla jeden ekvivalent těchto látek (např. europium(III) tris[3-(heptafluoropropylhydroxymethyl)-(+)-kafr] **66**) po přidání k enantiomerní směsi vytváří dynamické diastereomerní komplexy. Ty se v NMR spektrech projeví zdvojením signálů v závislosti na teplotě, ochotě tvořit komplexy a vzájemném poměru složek<sup>47,69,70,71,72</sup>.



Různě substituovaná posunová činidla nejčastěji obsahují europium(III), jako centrální atom, komplexované se třemi  $\beta$ -diketony. Tento centrální atom se silně koordinuje na aminy, alkoholy, karbonylové skupiny, epoxidy, sulfoxidy a podobné funkční skupiny. Slaběji se koordinuje např. na ethery, sulfidy, nitrolátky a nitrily<sup>69,70,71,72</sup>.

## Nepřímá spin-spinová interakce

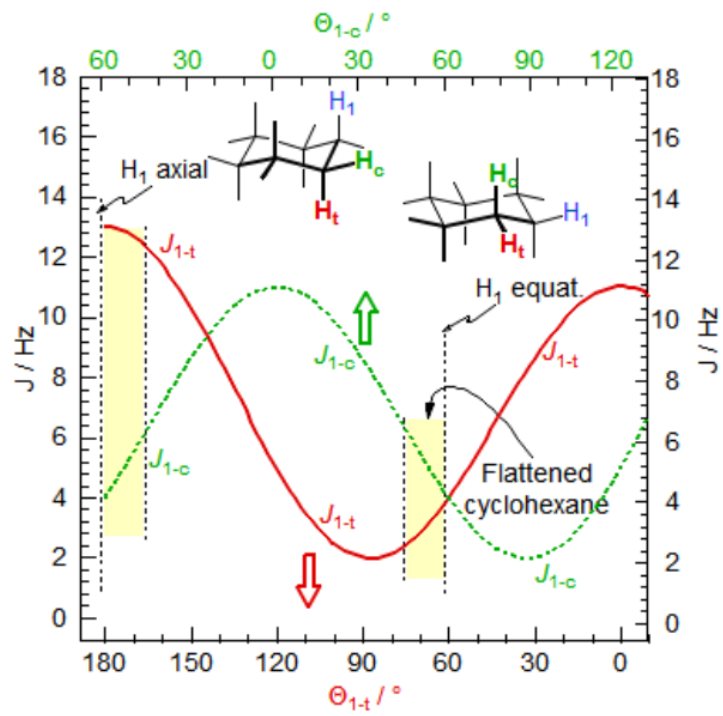
V neposlední řadě velmi užitečnou metodou k řešení stereochemie látek je nepřímá spin-spinová interakce, někdy nazývána jako skalární interakce nebo  $J$ -vazba. Jádra atomů, s nenulovým spinem, vykazují magnetický moment, který se přenáší polarizací vazebných elektronů na sousední jádra. V závislosti na orientaci magnetických momentů vůči sobě se změní efektivní magnetické pole  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$  (1) sousedních jader, což vede ke změnám jejich rezonančních frekvencí (3), ve spektrech pozorovatelné jako štěpení signálů. Velikost takového štěpení je vyjádřeno interakční konstantou  $J$  (12), kde  $K$  je funkcí strukturních parametrů molekuly (zejména jader I a S) a  $n$  je počet vazeb. Podle počtu vazeb jsou interakce označovány jako přímé ( $n=1$ ), geminální ( $n=2$ ), vicinální ( $n=3$ ) a interakce na velkou vzdálenost<sup>47</sup>.

$${}^nJ_{\text{IS}} = K \gamma_{\text{I}} \gamma_{\text{S}} \quad (12)$$

Největší vztah mezi strukturou a velikostí interakční konstanty je vyjádřen ve vicinální interakci. Závislost velikosti  ${}^3J_{\text{HH}'}$  na dihedralním úhlu  $\phi$  popisuje Karplusova rovnice<sup>73</sup> (13), kde  $A = 4$ ,  $B = -0,5$ ,  $C = 4,5$  jsou empirické konstanty závislé na hybridizaci, valenčních úhlech, délce vazeb, substituci a elektronegativitě dalších vázaných atomů, atd<sup>73,74</sup>.

$${}^3J_{\text{HH}'} = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi \quad (13)$$

Hledání konstant pro jednotlivé modely (velikost kruhu, substituce, hybridizace,...) vedlo i k získávání dalších výpočtových vztahů (Alton, Diez,...) a pochopitelně i kvantově chemickému přístupu. Model pro cyklohexan v židličkové konformaci dobře popisuje Bothner-By rovnice s parametry  $A = 7$ ,  $B = -1$ ,  $C = 5$  viz Obr. 6. Kde lze zjednodušit situaci pro stabilizovanou židličkovou konformaci na kombinaci poloh axiální a ekvatoriální (v obrázku šrafovaná část).  ${}^3J_{\text{aa}} = 8 - 11$  Hz odpovídá úhlu  $180^\circ$ ,  ${}^3J_{\text{ae}} \approx {}^3J_{\text{ee}} = 2 - 6$  Hz jsou variabilní a citlivé na dihedralní úhel<sup>74,75</sup>.



Obr. 6<sup>76</sup> Křivka velikosti interakčních konstant vicinálního štěpení cyklohexanu

„Když chceš být šťastný jeden den, opij se,  
Když chceš být šťastný jeden rok, ožeň se,  
Když chceš být šťastný celý život, začni včelařit.“  
lidová moudrost

## 2. CÍL PRÁCE

Základním cílem této práce byla analýza struktur látek přírodního původu využitím nukleární magnetické rezonance a také za pomoci dalších technik. Tento základní záměr byl rozdělen na dílčí cíle, z nichž plynou odpovídající úkoly.

1. Určení konstituce izolovaných alkaloidů z rostlin *Berberis vulgaris* L., *Fumaria officinalis* L. a *Nerine Bowdenii* W. Watson.

1D a 2D NMR spektra poskytují informace o struktuře látek, na jejichž základě je možné prvotní řešení konstituce s přiřazováním jednotlivých signálů s ohledem na další korelace. Následně je pak možná eliminace chyb uvažováním teoretických izomerů, následovaná návrhy dalších pomocných experimentů a měření pro jednoznačné stanovení konstituce a u chirálních látek následně i absolutní konfigurace.

2. Nalezení a užití vhodných metod pro řešení konstitučních izomerů u alkaloidů *Berberis vulgaris* L.

Pro alkaloidy izolované z této rostliny je charakteristické množství volných i substituovaných fenolických hydroxylů. Přítomnost aromatických (neprotonovaných) substituentů vedle volných fenolických hydroxylů vede k obtížně rozlišitelným polohovým izomerům.

3. Nalezení metod pro řešení stereochemie alkaloidů z *Fumaria officinalis* L. a *Nerine Bowdenii* W. Watson a určení jejich absolutní konfigurace.

Alkaloidy těchto rostlin obsahují nejčastěji 2 - 4 chirální centra. U některých popsaných látek chybí údaje o konfiguraci případně o způsobu určení absolutní konfigurace.

### **3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM**

Od všech izolovaných látek byly nejprve naměřeny  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra, na základě kterých bylo rozhodnuto o dalším postupu. V případě rozhodnutí o určování struktury byla naměřena sada dvoudimenzionálních spekter, podle které byla následně řešena konstituce. Podle potřeby byly některé experimenty opakovány s optimálnějšími parametry, či zařazena další měření, což postupně vedlo k určení struktury.

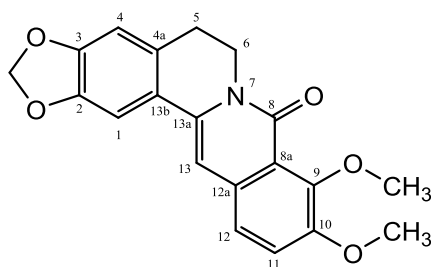
Studované látky jsou řazeny u každé rostliny podle strukturní podobnosti. Značení látek je respektováno s ohledem na způsob a pořadí izolace. První v pořadí je pak skutečné pojmenování látky. U jednotlivých látek je nastíněna problematika analýzy struktury. U nových látek je pak ukázán podrobný postup získání struktury.

### 3.1. Látky izolované z rostliny *Berberis vulgaris* L.

Z rostliny *Berberis vulgaris* L. byla určena struktura u čtrnácti alkaloidů, z čehož sedm bylo v literatuře popsanych.

#### 3.1.1. 8-oxoberberin (BV1, Ckr)

Mr = 351, m = 9,8 mg, C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>



6 8-oxoberberin

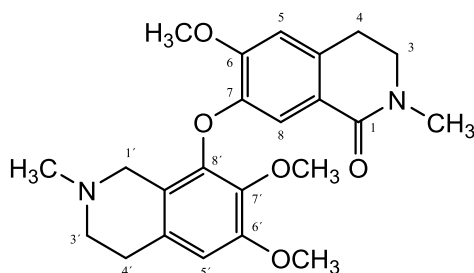
Z naměřených NMR spekter byl jednoznačně určen 8-oxoberberin **6**. Chemické posuny atomů <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C se shodovaly s publikovanými hodnotami<sup>77</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.31 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H11), 7.27 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H12), 7.21 (1H, s, H1), 6.71 (1H, s, H13), 6.70 (1H, s, H4), 6.00 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.29 (2H, dd, *J* = 7.0, 5.5 Hz, H6), 4.01 (3H, s, C9 - OCH<sub>3</sub>), 3.94 (3H, s, C10 - OCH<sub>3</sub>), 2.89 (2H, dd, *J* = 7.0, 5.5 Hz, H5).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 160.1 (C8), 151.4 (C10), 149.5 (C9), 148.4 (C3), 147.3 (C2), 135.6 (C13a), 132.3 (C12a), 130.0 (C4a), 123.7 (C13b), 122.3 (C12), 119.4 (C8a), 119.0 (C11), 107.9 (C4), 104.7 (C1), 101.4 (OCH<sub>2</sub>O), 101.3 (13), 61.6 (C9 - OCH<sub>3</sub>), 56.9 (C10 - OCH<sub>3</sub>), 39.3 (C6), 28.7 (C5).

### 3.1.2. berbidin, isokarbostyrl (BV3, E42)

Mr = 412, m = 3,9 mg, C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>



67 berbidin

Analýzou NMR spekter byla určena struktura berbidinu **67**, někdy také nazvaný jako isokarbostyrl. Naměřená spektra byla ve shodě s publikovanými hodnotami<sup>78,79</sup>.

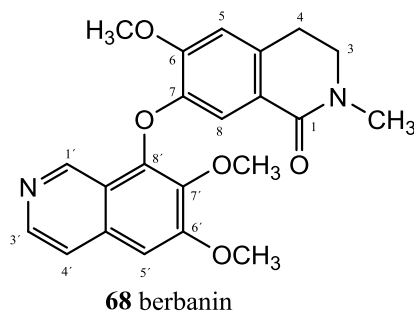
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.19 (1H, s, H8), 6.72 (1H, s, H5), 6.59 (1H, s, H5'), 4.41 (1H, dd, *J* = 16.0, 3.9 Hz, H1'), 3.96 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.83 (1H, dd, *J* = 16.0, 5.0 Hz, H1'), 3.68 (3H, s, C7' - OCH<sub>3</sub>), 3.60-3.46 (3H, m, H3, H3, H3'), 3.45-3.36 (1H, m, H4'), 3.29-3.20 (1H, m, H3'), 3.07 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 3.05-2.88 (3H, m, H4, H4, H4'), 2.83 (3H, d, *J* = 5.0 Hz, N2' - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.2 (C1), 154.0 (C6'), 151.7 (C6), 145.8 (C7), 145.4 (C8'), 141.2 (C7'), 133.8 (C4a), 125.6 (C4a'), 122.0 (C8a), 113.0 (C8a'), 113.6 (C8), 110.5 (C5), 108.9 (C5'), 61.0 (C7' - OCH<sub>3</sub>), 56.2 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 56.1 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 50.0 (C3'), 49.4 (C1'), 48.2 (C3), 40.9 (N2' - CH<sub>3</sub>), 35.0 (N2 - CH<sub>3</sub>), 27.6 (C4), 23.7 (C4').

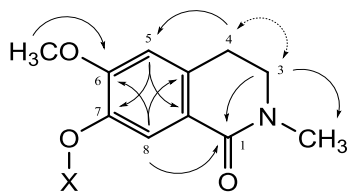


### 3.1.3. berbanin (BV4, E51)

Mr = 394, m = 5,5 mg, C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

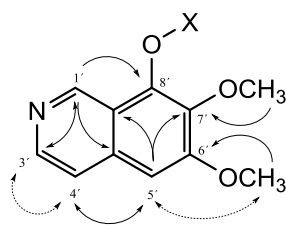


Ve vodíkovém <sup>1</sup>H NMR spektru bylo na první pohled patrných šest alifatických a šest aromatických signálů. Jednoznačně zde byly určeny tři methoxy skupiny a jeden methyl (δ 3.04 ppm) vázaný na amidický dusík. Dva triplety (δ 3.54 (H3) a 2.99 (H4), *J* = 6.7 Hz), podle stejné interakční konstanty i podle COSY spektra spolu jednoznačně sousedily, z čehož jeden vykázal dobré korelace v gHMBC spektru na amidický uhlík (C1) i na methyl vázaný na amidickém dusíku a druhý pak na aromatické jádro Obr. 7. Z korelací aromatických vodíků δ 6.81 (H5) a 7.19 (H8) ppm byla zřejmá i zbývající substituce tohoto tetrahydroisochinolinového fragmentu v podobě methoxy skupiny a substituované fenolické skupiny.



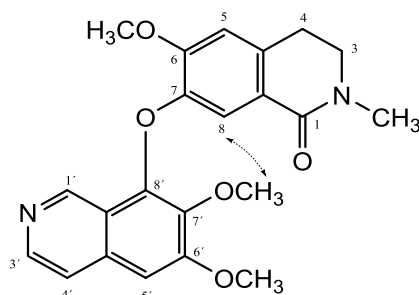
Obr. 7

Pro druhou část molekuly zbývalo devět aromatických uhlíků, dvě methoxy skupiny a jeden atom dusíku. Odstíněné aromatické vodíky podle chemických posunů (δ 9.23 (H1'), 8.33 (H3'), 7.96 (H4') ppm) a interakčních konstant tvořily základ pyridinového jádra, dále měly četné korelace na *ortho*-kondenzované aromatické jádro Obr. 8. Devět aromatických uhlíků s jedním atomem dusíkem tvořily opět isochinolinový skelet. Podle korelací aromatických vodíků δ 7.20 (H5') a 9.23 (H1') ppm na stíněné aromatické uhlíky δ 162.0, 144.8, 143.5 ppm byly určeny pozice methoxy skupin jednoznačně (C6', C7') Obr. 8.



Obr. 8

Spojení obou fragmentů etherickým můstkem bylo prokázáno jednak změřenou molekulovou hmotností (HRMS-TOF MS EI: 394.1533), tak i slabou NOESY korelací aromatického vodíku  $\delta$  7.19 (H8) ppm s methoxyskupinou  $\delta$  3.93 (C7'-OCH<sub>3</sub>) ppm Obr. 9. Tento alkaloid **68** byl izolován prvně, nazván berbanin<sup>80</sup>.



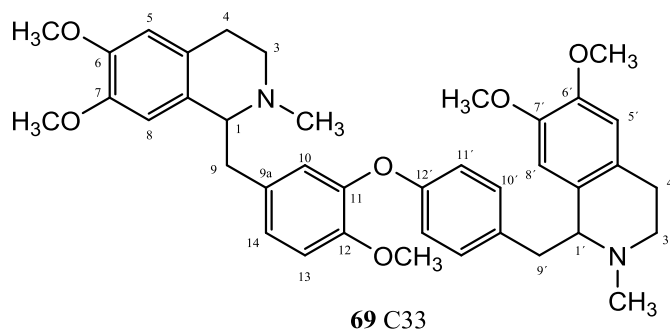
Obr. 9

<sup>1</sup>H NMR (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>): 9.23 (1H, d,  $J$  = 5.64 Hz, H1'), 8.35 – 8.31 (1H, m, H3'), 7.96 (1H d,  $J$  = 6.5 Hz, H4'), 7.20 (1H, s, H5'), 7.19 (1H, s, H8), 6.81 (1H, s, H5), 4.14 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 4.01 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, C7' - OCH<sub>3</sub>), 3.54 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, H3), 3.04 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>), 2.99 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.9 (C1), 162.0 (C6'), 151.6 (C6), 146.2 (C7), 144.8 (C7'), 143.5 (C8'), 139.1 (C1'), 137.0 (C4a'), 135.0 (C4a), 130.8 (C3'), 122.5 (C4'), 122.1 (C8a), 119.3 (C8a'), 114.8 (C8), 110.7 (C5), 102.9 (C5'), 61.4 (C7' - OCH<sub>3</sub>), 57.1 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 56.4 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 48.1 (C3), 35.0 (N2 - CH<sub>3</sub>), 27.6 (C4).

### 3.1.4. racemická směs (BV2, C33)

Mr = 638, m = 9,7 mg, C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = 0 (c 0,12; CHCl<sub>3</sub>)



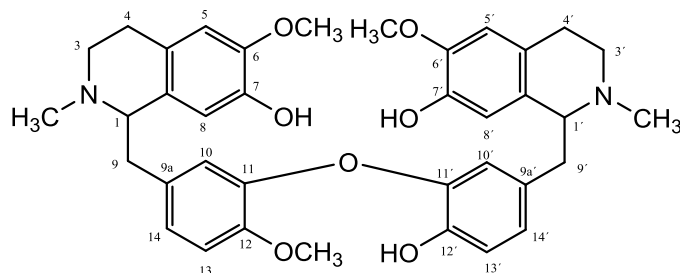
Analýzou multidimenzionálních NMR spekter byla získána struktura **69** odpovídající bisbenzylisochinolinovému strukturnímu typu I s jedním etherovým můstkem. Tento alkaloid obsahuje ve své molekule dvě chirální centra. Pro určení absolutní konfigurace byly vyhledány možné stereoizomery včetně optických otáčivostí. Ze čtyř možných stereoizomerů byly publikovány tyto tři: *O*-methyldauricin (1*R*,1'*R*, [α]<sup>20</sup> = -78,8 (ethanol))<sup>8</sup> (str. 27), (+)-*O*-methylthalibrin (1*S*,1'*S*, [α]<sup>20</sup> = +109 (c 0,22; CH<sub>3</sub>OH))<sup>9</sup> (str. 19),<sup>81</sup> *O,O'*-dimethylgrisabin (1*S*,1'*R*, [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = -26 (c 0,19; CHCl<sub>3</sub>))<sup>12</sup> (str. 942). Jako zástupce čtvrtého stereoizomeru je možné považovat strukturně podobnou, na třech místech demetylovanou látku espinin (1*R*, 1*S'* [α] = +31 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 27). Z naměřené otáčivosti [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = 0 (c 0,12; CHCl<sub>3</sub>) však plyne, že se jedná o blíže neurčený racemát. Pro vzdálenost chirálních center se nepodařilo ani určit relativní konfigurace obsažených alkaloidů.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.00 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H10'), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H14), 6.83 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, H15), 6.78 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H11'), 6.72 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H11), 6.56 (1H, s), 6.53 (1H, s), 6.04 (1H, s), 5.97 (1H, s), 3.83 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.81-3.75 (1H, m), 3.79 (3H, s), 3.73-3.68 (1H, m), 3.59 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.30-3.10 (4H, m), 2.91-2.71 (6H, m), 2.68-2.59 (2H, m), 2.57 (3H, s), 2.52 (3H, s).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 156.5, 149.8, 147.5 (2C), 146.5 (2C), 144.5, 133.1, 132.4, 130.8 (2C), 127.9 (2C), 126.1, 125.3, 125.0, 122.5, 116.7 (2C), 112.5, 111.2, 111.1, 111.0, 110.9, 64.8, 64.7, 56.1, 55.7 (2C), 55.6, 55.5, 46.5, 46.3, 42.2, 42.1, 40.4, 40.3, 24.8, 24.9.

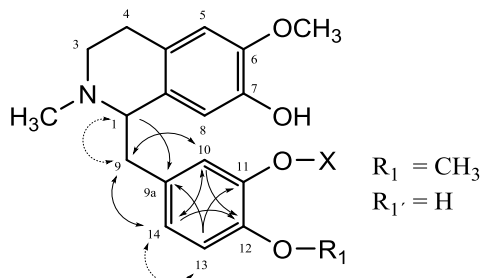
### 3.1.5. (+)-berbostrejdin (BV13, R623)

Mr = 626, m = 20 mg, C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +25,2 (c 0,127; CHCl<sub>3</sub>)



70 berbostrejdin

Naměřená spektra vykazovala na první pohled signály dvou velmi podobných látek obsahujících benzyloisochinolinové uskupení. Pro změřenou molekulovou hmotnost Mr = 626 bylo ale zřejmé, že se jednalo o jednu molekulu, tedy tyto dvě jednotky musely být vzájemně spojeny. Nejpodobnější částí s množstvím zcela překrytých signálů byl isochinolinový skelet substituovaný v poloze č. 6 methoxyskupinou a v poloze č. 7 volným fenolickým hydroxylem. Větší rozdíly v chemických posunech měly zbývající části molekuly. Oba vodíky H1 i H1' měly každý v COSY spektrech korelace po řadě na vodíky H9 a H9', které následně korelacemi přes tři vazby určily dvě různě substituovaná 1,2,4 trisubstituovaná jádra Obr. 10.



Obr. 10

Rozdílná substituce v podobě methoxy skupiny ( $\delta$  3.78 ppm) s korelací na atom uhlíku  $\delta$  148.8 (C12) ppm, a volného fenolického hydroxylylu na atomu uhlíku  $\delta$  145.9 (C12') ppm prokázaného pomocí deuteriem indukovaným posunem  $\Delta\delta_{(C12')} = -0,33$  ppm, způsobila jen malé rozdíly v chemických posunech. Posledním krokem k určení struktury bylo propojení těchto dvou částí etherovým můstkem, pro který se nabízejí uhlíky C7, C7', C11, C11' a C12'. Chemický posun zmíněných uhlíků a izotopický indukovaný efekt prokázal přítomnost této vazby mezi uhlíky C11 a C11' (v poloze C12' je volná hydroxylová skupina). U této látky **70** nebyla nalezena v dostupné literatuře žádná podobná struktura, byla proto pojmenována berbostrejdin. Pro určení relativní

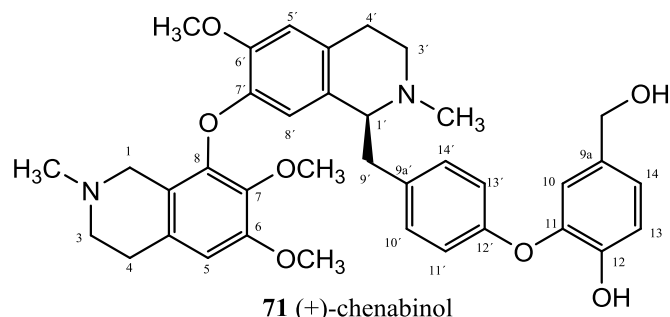
konfigurace pomocí NOESY spekter jsou chirální centra příliš vzdálená. Pro rentgenostrukturní analýzu se nepodařilo připravit krystalickou formu.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.83-6.80 (3H, m, H13, H14, H13'), 6.74 (1H, bs, H10), 6.70 (1H, bs, H10'), 6.65 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz, H14'), 6.50 (1H, s, H5), 6.48 (1H, s, H5'), 6.28 (1H, s, H8), 6.26 (1H, s, H8'), 3.80 (6H, s, C6 -  $\text{OCH}_3$ , C6' -  $\text{OCH}_3$ ), 3.78 (3H, s, C12 -  $\text{OCH}_3$ ), 3.74-3.68 (2H, m, H1, H1'), 3.17-3.05 (4H, m, H3, H9, H3', H9'), 2.82-2.73 (6H, m, H3, H4, H9, H3', H4', H9'), 2.60-2.53 (2H, m, H4, H4'), 2.47 (3H, s, N2 -  $\text{CH}_3$ ), 2.45 (3H, s, N2' -  $\text{CH}_3$ ).

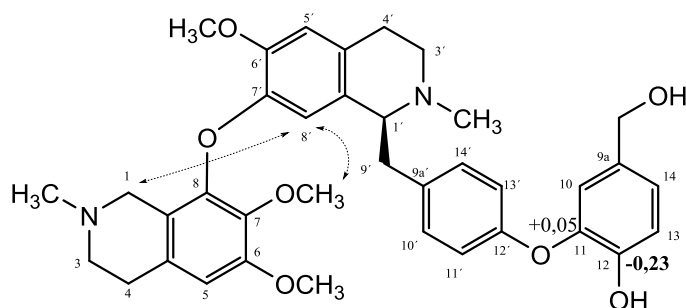
$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 148.8 (C12), 145.9 (C12'), 145.8 (C6), 145.7 (C6'), 145.0 (C11), 144.2 (C11'), 143.8 (C7), 143.7 (C7'), 132.3 (C9a), 131.1 (C9a'), 128.6 (C8a'), 128.5 (C8a), 125.4 (C14), 125.3 (C14'), 124.3 (C4a), 124.3 (C4a'), 121.2 (C10), 119.8 (C10'), 116.0 (C13'), 114.4 (C8), 114.2 (C8'), 112.4 (C13), 110.8 (C5), 110.7 (C5'), 64.4 (C1), 64.4 (C1'), 55.9 (C12 -  $\text{OCH}_3$ ), 55.7 (C6 -  $\text{OCH}_3$ ), 55.7 (C6' -  $\text{OCH}_3$ ), 46.7 (C3), 46.7 (C3'), 42.0 (N2' -  $\text{CH}_3$ ), 41.9 (N2 -  $\text{CH}_3$ ), 40.7 (C9'), 40.3 (C9), 24.6 (C4), 24.5 (C4').

### 3.1.6. (+)-chenabinol (BV12, J24)

Mr = 626, m = 24 mg, C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +57,3 (c 0,119; CHCl<sub>3</sub>)



Na základě 2D NMR experimentů byla určena konstituce a byly přiřazeny jednotlivé signály. První etherický můstek C8 - O - C7' byl určen na základě NOESY korelací H8' - H1 a H8' - C7OCH<sub>3</sub> (Obr. 11). Kvůli biogenetické podobnosti k berbaminu byl druhý etherický můstek očekáván mezi atomy uhlíků δ 156.2 (C12') a 133.1 (C11) ppm, ale ani na základě NOESY korelací nebylo možné jednoznačně vyloučit vazbu na aromatický uhlík δ 149.1 (C12) ppm. Poloha volného fenolického hydroxyly (HO - C12) a tedy i etherického můstku byla určena pomocí deuteriem indukovaného posunu (Obr. 11), kde Δδ<sub>(C12)</sub> = -0,23 ppm a Δδ<sub>(C11)</sub> = +0,05 ppm.



Obr. 11

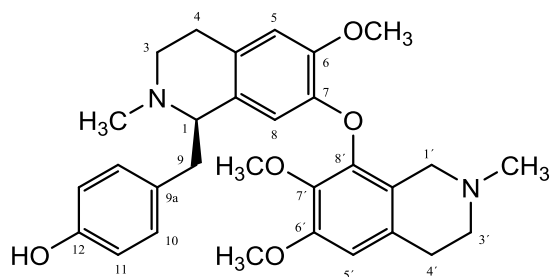
Neznámá látka byla určena jako chenabinol, pro kterou se nepodařilo nalézt publikovanou optickou otáčivost. Na základě publikované optické otáčivosti pro (+)-chenabinolmethylether (jedná se o methylether na volném alifatickém hydroxyly) [α]<sub>D</sub> = +21 (c 0,11; CH<sub>3</sub>OH)<sup>79</sup> a změřené optické otáčivosti [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +57,3 (c 0,119; CHCl<sub>3</sub>) byla stanovena absolutní konfigurace na atomu uhlíku C1' jako (S) tedy literaturou již známý (+)-chenabinol **71**<sup>79</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.00 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H14), 6.95 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H13), 6.87 (1H, s, H10), 6.77 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H10'), 6.70 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H11'), 6.66 (1H, s, H5'), 6.45 (1H, s, H5), 5.47 (1H, s, H8'), 4.49 (2H, s, CH<sub>2</sub>OH), 3.89 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.76 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.55 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H1), 3.49 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.5 Hz, H1'), 3.38 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H1), 3.34 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 3.28-3.20 (1H, m, H3'), 3.10 (1H, dd, *J* = 12.7, 2.5 Hz, H9'), 3.05-2.96 (1H, m, H4), 2.95-2.78 (3H, m, H3, H3', H4'), 2.78-2.66 (2H, m, H4, H4'), 2.61-2.51 (2H, m, H3, H9'), 2.47 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.45 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 156.2 (C12'), 152.1 (C6), 149.1 (C12), 148.3 (C6'), 146.4 (C8), 145.3 (C7'), 143.8 (C9a), 138.8 (C7), 133.1 (C11), 132.9 (C9a'), 131.0 (2C10'), 129.0 (C4a), 128.0 (C8a'), 127.1 (C4a'), 124.0 (C14), 119.7 (C10), 119.6 (C8a), 118.0 (C13), 116.5 (2C11'), 116.2 (C8'), 112.1 (C5'), 108.2 (C5), 64.6 (CH<sub>2</sub>OH), 64.5 (C1'), 60.1 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 55.9 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 51.8 (C1), 51.7 (C3), 45.8 (C3'), 44.9 (N2 - CH<sub>3</sub>), 41.9 (N2' - CH<sub>3</sub>), 39.7 (C9'), 27.4 (C4), 25.0 (C4').

### 3.1.7. (-)-muraricin (BV6, HA2)

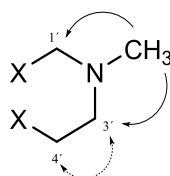
Mr = 504, m = 8 mg, C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -17,4 (c 0,115; CHCl<sub>3</sub>)



72 (-)-muraricin

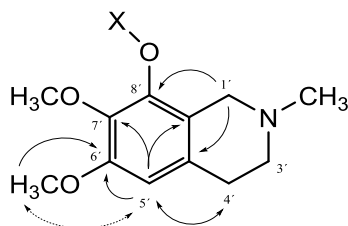
V aromatické části <sup>1</sup>H NMR spektra byly naměřeny čtyři signály, z čehož jsou dva singlety a dva signály odpovídají AA'BB' systému. Aromatická část uhlíkového spektra pak byla tvořena šestnácti signály, což odpovídalo třem aromatickým kruhům (jeden para-substituovaný). V alifatické části vodíkového spektra se nacházely tři methoxy skupiny, dva methyly vázané na atomy dusíku a množství dalších signálů.

Vodíky methylové skupiny  $\delta$  2.61 ppm, jež náležely uhlíku  $\delta$  45.0 ppm (N2' - CH<sub>3</sub>), korelovaly přes tři vazby s atomy uhlíků methylenových skupin  $\delta$  52.5 (C1') a 52.0 (C3') ppm. Dva atomy vodíků H3' vykazaly každý svůj signál vlivem konformace a volného elektronového páru na dusíku. V COSY spektru byly pozorovány dobré korelace na atomy vodíků H4', viz Obr. 12 čárkovaně.



Obr. 12

Korelace přes tři vazby vodíků H4' a H1' směřovaly do aromatické oblasti a společně s dalšími korelacemi aromatického vodíku H5' tvořily celé aromatické jádro, viz Obr. 13.

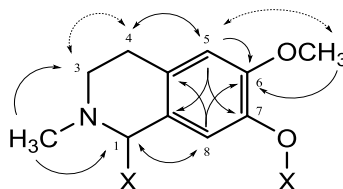


Obr. 13



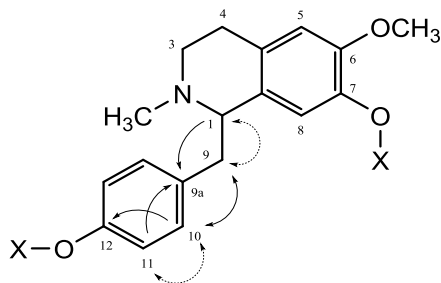
Poloha dvou methoxy skupin byla jednoznačně určena jednak díky korelacím přes tři vazby na uhlíky C6' a C7', tak i NOESY korelací jedné z nich (čárkovaně Obr. 13) na atom vodíku H5'. V místě uhlíkového atomu C8'  $\delta$  144.1 ppm nebyly korelace přes více vazeb na další část molekuly. Bylo určeno, že substituent X nenesse proton.

Druhý alifatický methyl  $\delta$  2.60 ppm, jež náležel uhlíku  $\delta$  41.2 ppm (N2 - CH<sub>3</sub>), byl vázaný na atom dusíku a koreloval přes tři vazby s atomy uhlíků  $\delta$  64.7 (C1) a 44.9 (C3) ppm, kde methylenové vodíky H3 měly COSY korelace na vodíky H4 vázané na atomu uhlíku  $\delta$  24.1 (C4) ppm. Stejně jako u předchozího fragmentu měly atomy vodíků H1 a H4 korelace na aromatické jádro a společně s korelacemi aromatických vodíků H5 a H8 tvořily tetrahydroisochinolinový skelet Obr. 14. Na aromatickém uhlíku  $\delta$  144.2 (C7) ppm byl, podle chemického posunu, navázaný atom kyslíku se zatím neznámou substitucí.



Obr. 14

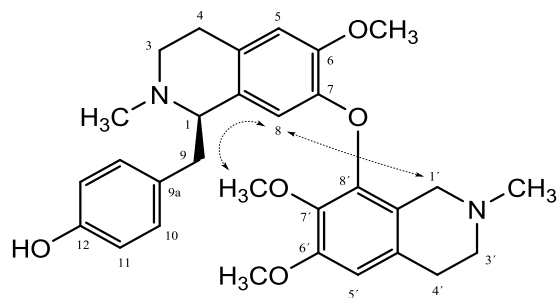
Od prvního fragmentu (Obr. 13) se tato část molekuly ještě lišila substitucí na alifatickém uhlíku C1, který v tomto případě nesl pouze jeden atom vodíku  $\delta$  3.61 ppm s COSY korelací na atomy vodíků H9 vázané na uhlík  $\delta$  39.3 (C9) ppm (Obr. 15). Diastereotopické vodíky H9 měly korelace přes tři vazby a přes dvě vazby na poslední aromatické jádro tedy výše zmíněný AA', BB' systém, pro který bylo mnoho dalších korelací. Aromatický uhlík  $\delta$  156.2 (C12) ppm s chemickým posunem typickým pro fenolický hydroxyl měl opět nejasnou substituci.



Obr. 15

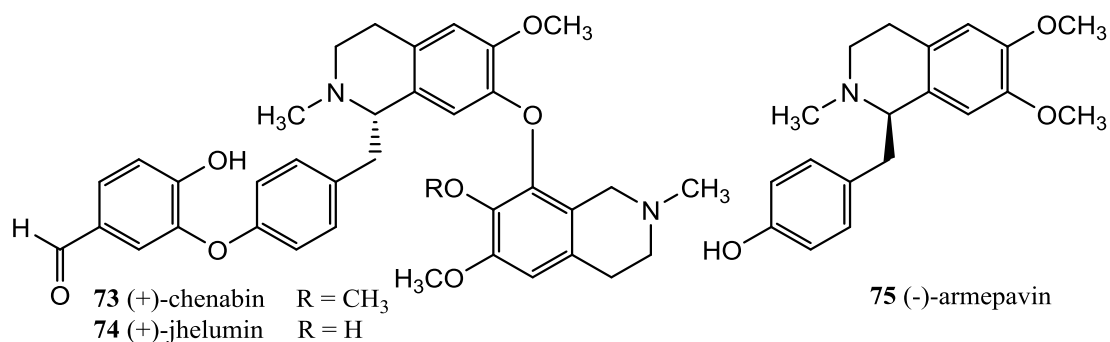
Z naměřené molekulové hmotnosti a následně spočteného molekulového vzorce vyplýval jeden etherický můstek mezi získanými dvěma fragmenty (Obr. 13 a Obr. 15) a jeden volný fenolický hydroxyl. Pro přítomnost NOESY korelací mezi atomy vodíků

H8 - H1' a H8 - C7'OCH<sub>3</sub> (Obr. 16) byly získané dvě části propojeny vazbou C7 - O - C8' a v poloze C12 byl ponechán volný fenolický hydroxyl.



Obr. 16

Z vyřešené konstituce látky **72** (Obr. 16) byla určena přítomnost jednoho chirálního uhlíku (C1), ale pro malé množství získané látky (8mg) se nepodařilo připravit monokrystal (pro rentgenostrukturní analýzu), a tak byla změřena optická otáčivost  $[\alpha]_D^{25} = -17,4$  (*c* 0,115; CHCl<sub>3</sub>). Hodnota byla porovnána s nejpodobnějšími publikovanými látkami (+)-chenabinol **71**  $[\alpha]_D^{25} = +57,3$  (*c* 0,119; CHCl<sub>3</sub>)<sup>změřená</sup>, (+)-chenabin **73**  $[\alpha]_D^{25} = +40$  (*c* 0,18; CH<sub>3</sub>OH)<sup>82</sup>, (+)-jhelumin **74**  $[\alpha]_D^{25} = +28$  (*c* 0,6; CH<sub>3</sub>OH)<sup>82</sup>. Nejbližší menší, ve smyslu periferní substituce, alkaloid byl publikovaný (+)-armepavin  $[\alpha]_D^{20} = +117$  (*c* 1; CHCl<sub>3</sub>)<sup>83</sup> a (-)-armepavin **75**  $[\alpha]_D^{21} = -110$  (*c* 0,5; CHCl<sub>3</sub>)<sup>84</sup>. Pro změřenou zápornou optickou otáčivost (-)-muraricinu **72** byla určena absolutní konfigurace na uhlíku C1 jako (*R*).



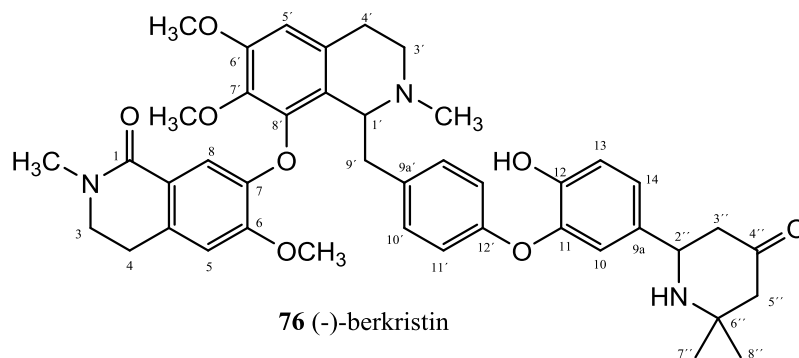
<sup>1</sup>H NMR (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.66 (1H, s, H5), 6.61 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H10), 6.54 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H11), 6.47 (1H, s, H5'), 4.86 (1H, s, H8), 3.89 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.78 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H1'), 3.61 (1H, dd, *J* = 11.4, 3.1 Hz, H1), 3.42-3.39 (1H, m, H3), 3.39 (3H, s, C7' - OCH<sub>3</sub>), 3.37-3.29 (2H, m, H4', H9), 3.30 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H1'), 3.17-3.12 (1H, m, H3'), 3.05-2.99 (2H, m, H3, H4), 2.80 (1H, ddd,

$J = 14.8, 5.7, 0.7$  Hz, H4), 2.72 (1H, ddd,  $J = 16.1, 3.5, 1.3$  Hz, H4'), 2.61 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.60 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 2.52 (1H, dd,  $J = 2.5, 11.4$  Hz, H9), 2.47 (1H, ddd,  $J = 15.3, 11.7, 4.2$  Hz, H3').

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  156.2 (C12), 152.1 (C6'), 147.5 (C6), 144.2 (C7), 144.1 (C8'), 138.8 (C7'), 130.8 (C10), 128.9 (C9a), 128.7 (C4a'), 125.6 (C8a), 125.3 (C4a), 118.2 (C8a'), 117.9 (C11), 115.1 (C8), 111.8 (C5), 108.1 (C5'), 64.7 (C1), 60.0 (C7' - OCH<sub>3</sub>), 56.1 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 55.9 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 52.5 (C1'), 52.0 (C3'), 45.0 (N2' - CH<sub>3</sub>), 44.9 (C3), 41.2 (N2 - CH<sub>3</sub>), 39.3 (C9), 27.7 (C4'), 24.1 (C4).

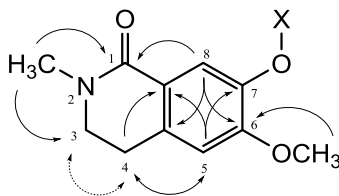
### 3.1.8. (-)-berkristin (BV9, HCHO3)

Mr = 735, m = 23 mg, C<sub>43</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -18,7 (c 0,235; CHCl<sub>3</sub>)



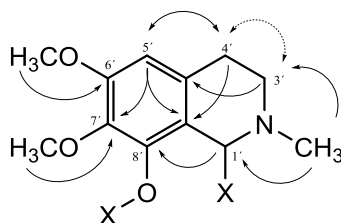
Aromatická část <sup>1</sup>H NMR spektra poukázala na přítomnost jednoho para substituovaného, jednoho 1,2,4 trisubstituovaného a dalších dvou více substituovaných aromatických kruhů. V alifatické části spektra jsou pak patrné tři methoxy skupiny, dvě N-CH<sub>3</sub> skupiny a dva alifatické methyly.

Odstíněná methylová skupina δ 3.04 (N2 - CH<sub>3</sub>) ppm korelovala přes tři vazby na amidický uhlík C1 a na methylenovou skupinu C3, jejíž atomy vodíků měly COSY korelaci na sousední skupinu (H4). Z dalších korelací znázorněných na Obr. 17 (plné šipky HMBC, čárkované COSY) bylo možné sestavit první část s tetrahydroisochinolinovým skeletem se substitucí na uhlíku C6 methoxy skupinou a na uhlíku C7 další částí molekuly, na kterou byly patrné NOESY korelace vodíků H8.



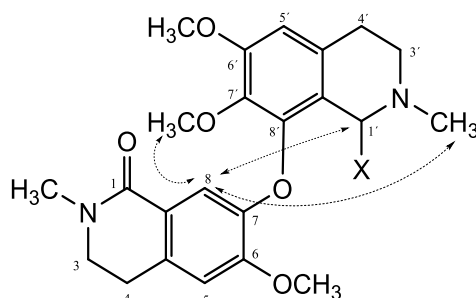
Obr. 17

Jedna ze zmíněných NOESY korelací byla i na methylovou skupinu  $\delta$  2.32 (N2' - CH<sub>3</sub>) vázanou na atom dusíku s korelacemi přes tři vazby na CH skupinu C1' a na methylen C3', jež opět sousedí s dalším methylenem C4'. Zmíněné skupiny dále korelovaly přes více vazeb s aromatickým jádrem, se kterým utvořily bohatě substituovaný tetrahydroisochinolin (Obr. 18).



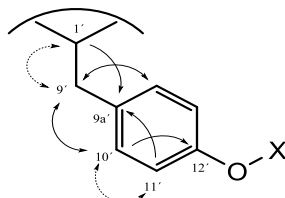
Obr. 18

Aromatické atomy uhlíku C6' a C7' nesou methoxy skupiny (Obr. 18) a atom uhlíku C8' pak substituovaný fenolický hydroxyl. Pro NOESY korelace atomu vodíku H8 z předchozího fragmentu (Obr. 17) na atomy H1', N2' - CH<sub>3</sub> a C7' - OCH<sub>3</sub> bylo určeno propojení prvních dvou částí mezi atomy uhlíků C7 a C8' viz Obr. 19.



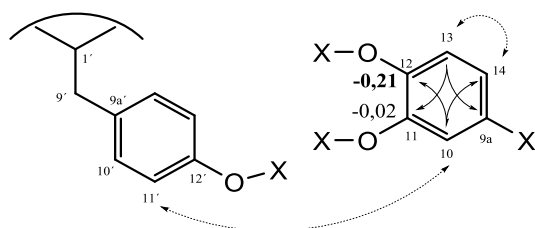
Obr. 19

Alifatický atom vodíku  $\delta$  3.87 (C1') ppm koreloval přes tři vazby na další část molekuly, jímž bylo para substituované aromatické jádro. Mezi zmíněnými byl navázán benzylový methylen  $\delta$  40.1 (C9') ppm s dalšími korelacemi Obr. 20. V para poloze aromatického jádra, na atomu uhlíku  $\delta$  155.1 (C12') ppm pak byl identifikován substituovaný fenolický hydroxyl.



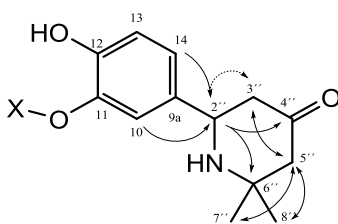
Obr. 20

Z na začátku zmíněných čtyř aromatických jader již zbýval k přiřazení 1,2,4 trisubstituovaný aromatický kruh. Z korelací v tomto kruhu vyplynula přítomnost dvou sousedních fenolických hydroxylů, vázaných na atomech uhlíků  $\delta$  143.7 (C11) a 147.4 (C12) ppm viz Obr. 21, z nichž jeden (vázaný na C12) po přidání deuteria vykázal výrazný indukovaný posun  $\Delta\delta_{(C12)} = -0,21$  ppm, svědčící o volném fenolickém hydroxyly. Logické propojení etherovým můstkem C11 - O - C12' bylo potvrzeno i NOESY korelací mezi atomy vodíků H11' a H10 (Obr. 21).



Obr. 21

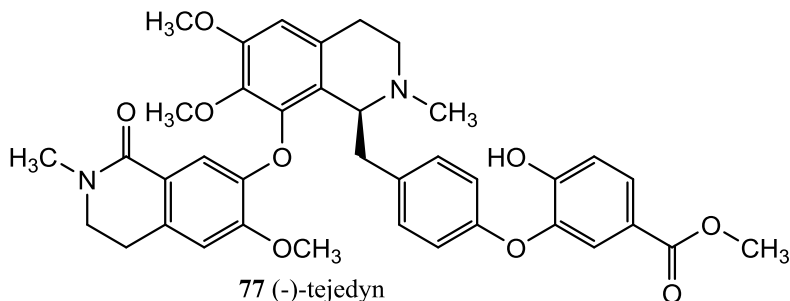
Korelace 1,2,4 trisubstituovaného jádra směřovaly do alifatické oblasti, konkrétně na odstíněný atom uhlíku  $\delta$  55.4 (H2'') ppm, jehož vodík  $\delta$  4.05 (H2'') ppm měl korelace ve spektru gHMBC jednak na sousední vodíky (H3''), tak i na odstíněný kvarterní uhlík  $\delta$  53.9 (C6'') ppm a na uhlík karbonylové skupiny  $\delta$  209.5 (C4'') ppm. Oba odstíněné atomy H2'' a H6'' se nacházely v sousedství atomu dusíku, na který poukázaly jednak jejich chemické posuny, tak i dopočtená molekulová hmota. Atom vodíku H3'' vzájemně koreloval přes tři vazby s atomem uhlíku C5'', který dále koreloval se dvěma alifatickými methyly vázanými na atomu uhlíku C6'' viz Obr. 22.



Obr. 22

Látka **76**, podle určené konstituce, obsahuje dvě chirální centra. Všechny signály posledních dvou částí (Obr. 22) byly ve spektrech "štěpeny" respektive zdvojeny s poloviční intenzitou, z čehož byla vyvozena přítomnost dvou diastereomerů na chirálním uhlíku C2''. Tomuto nasvědčovala i hypotéza o vzniku zakončení na Obr. 22 až v průběhu zpracování rostlinného materiálu, což se ale nepotvrdilo opětovnou izolací jinými rozpouštědly.

Pro určení absolutní konfigurace na chirálním uhlíku C1' byly v literatuře vyhledány strukturně podobné látky k nově popsanému (-)-berkristinu **76** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -18,7 (*c* 0,235; CHCl<sub>3</sub>). Z nich strukturně nejbližší zástupce s absolutní konfigurací (*S*) byl zvolen (-)-tejedyn **77** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -40,6 (*c* 0,064; CH<sub>3</sub>OH)<sup>85,86</sup>.

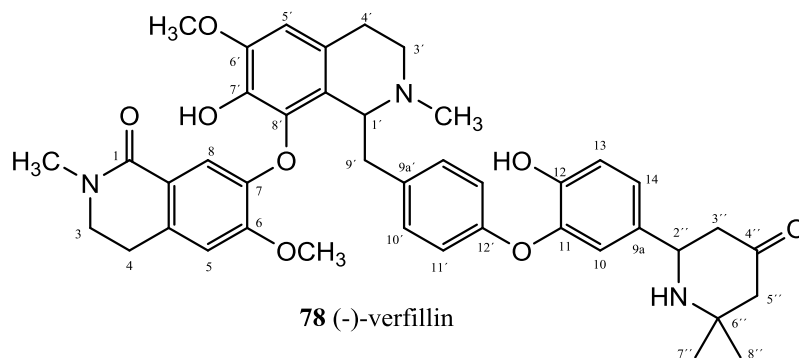


<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.25 (1H, s, H<sub>8</sub>), 7.09 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H<sub>10'</sub>), 7.06-7.00 (1H, m, H<sub>14</sub>), 6.97-6.95 (1H, m, H<sub>13</sub>), 6.95-6.92 (1H, m, H<sub>10</sub>), 6.80 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H<sub>11'</sub>), 6.69 (1H, s, H<sub>5</sub>), 6.52 (1H, s, H<sub>5'</sub>), 4.05 (1H, dd, *J* = 11.2, 3.0 Hz, H<sub>2''</sub>), 3.91 (3H, s, C<sub>6</sub> - OCH<sub>3</sub>), 3.87 (1H, dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, H<sub>1'</sub>), 3.83 (3H, s, C<sub>6'</sub> - OCH<sub>3</sub>), 3.60 (3H, s, C<sub>7'</sub> - OCH<sub>3</sub>), 3.52-3.47 (2H, m, H<sub>3</sub>), 3.42-3.34 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 3.04 (3H, s, N<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>), 3.00-2.83 (6H, m, H<sub>4</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>9'</sub>, H<sub>9'</sub>), 2.54-2.48 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 2.42-2.43 (3H, m, H<sub>3''</sub>, H<sub>3''</sub>, H<sub>5''</sub>), 2.32 (3H, s, N<sub>2'</sub> - CH<sub>3</sub>), 2.41 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H<sub>5''</sub>), 1.26 (3H, s, H<sub>7''</sub>), 1.14 (3H, s, H<sub>8''</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 209.5 (C<sub>4''</sub>), 164.4 (C<sub>1</sub>), 155.1 (C<sub>12'</sub>), 152.2 (C<sub>6'</sub>), 151.6 (C<sub>6</sub>), 147.4 (C<sub>12</sub>), 146.5 (C<sub>7</sub>), 145.7 (C<sub>8'</sub>), 143.7 (C<sub>11</sub>), 139.8 (C<sub>7'</sub>), 135.5 (C<sub>9a'</sub>), 135.1 (C<sub>9a</sub>), 132.9 (C<sub>4a</sub>), 130.6 (2C<sub>10'</sub>), 129.4 (C<sub>4a'</sub>), 122.8 (C<sub>8a'</sub>), 122.6 (C<sub>14</sub>), 122.0 (C<sub>8a</sub>), 117.6 (C<sub>10</sub>), 117.1 (2C<sub>11'</sub>), 116.4 (C<sub>13</sub>), 114.2 (C<sub>8</sub>), 110.2 (C<sub>5</sub>), 109.1 (C<sub>5'</sub>), 60.7 (C<sub>7'</sub> - OCH<sub>3</sub>), 60.2 (C<sub>1'</sub>), 56.1 (C<sub>6</sub> - OCH<sub>3</sub>), 55.9 (C<sub>6'</sub> - OCH<sub>3</sub>), 55.4 (C<sub>2''</sub>), 54.0 (C<sub>5''</sub>), 53.9 (C<sub>6''</sub>), 49.8 (C<sub>3''</sub>), 48.2 (C<sub>3</sub>), 44.0 (C<sub>3'</sub>), 41.9 (N<sub>2'</sub> - CH<sub>3</sub>), 40.1 (C<sub>9'</sub>), 35.0 (N<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>), 32.0 (C<sub>7''</sub>), 27.6 (C<sub>4</sub>), 25.3 (C<sub>8''</sub>), 22.5 (C<sub>4'</sub>).

### 3.1.9. (-)-verfillin (BV10, HCHO4)

Mr = 721, m = 7 mg, C<sub>42</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -31,6 (c 0,127; CHCl<sub>3</sub>)



Nová látka (-)-verfillin **78** se od předchozí látky **76** lišila jen o jednu methylovou skupinu a to jak změřenou molekulovou hmotou, tak i změřenými NMR spektry, kde byla prokazatelná absence methylu na atomu uhlíku  $\delta$  136.5 (C7') ppm. Deuteriem indukovaný posun tuto pozici také potvrdil. Podobně jako u předchozí látky **76** také optická otáčivost [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -31,6 (c 0,127; CHCl<sub>3</sub>) se shodla s již publikovaným (-)-tejedynem **77** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -40,6 (c 0,064; CH<sub>3</sub>OH)<sup>85,86</sup> s absolutní konfigurací (S).

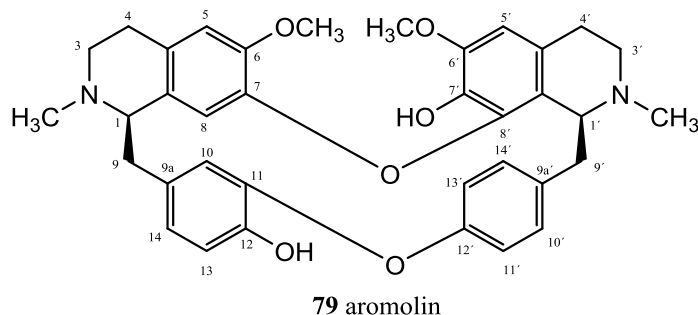
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.26 (1H, s, H8), 7.11 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H10'), 7.07-7.03 (1H, m, H14), 7.01-6.97 (1H, m, H13), 6.96-6.94 (1H, m, H10), 6.82 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H11'), 6.72 (1H, s, H5), 6.51 (1H, s, H5'), 4.06 (1H, dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, H2''), 3.97 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.87 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.80 (1H, dd, *J* = 9.6, 2.5 Hz, H1'), 3.52-3.47 (2H, m, H3), 3.41-3.34 (1H, m, H3'), 3.04 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 2.99-2.83 (6H, m, H4, H4, H3', H4', H9', H9'), 2.49-2.31 (4H, m, H4', H3'', H3'', H5''), 2.29 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.21 (1H, brd, *J* = 13.3 Hz, H5''), 1.26 (3H, s, H7''), 1.13 (3H, s, H8'').

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 209.5 (C4'), 164.4 (C1), 154.8 (C12'), 151.3 (C6), 147.2 (C12), 146.6 (C6'), 145.7 (C7), 143.7 (C11), 138.5 (C8'), 136.5 (C7'), 136.0 (C9a'), 135.3 (C9a), 132.9 (C4a), 130.6 (2C10'), 125.2 (C4a'), 123.5 (C8a'), 122.6 (C14), 122.1 (C8a), 117.4 (C10), 117.2 (2C11'), 116.3 (C13), 113.2 (C8), 110.2 (C5), 108.1 (C5'), 60.2 (C1'), 56.1 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 56.1 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 55.5 (C2''), 54.1 (C5''), 53.9 (C6''), 49.9 (C3''), 48.2 (C3), 44.0 (C3'), 42.0 (N2' - CH<sub>3</sub>), 40.3 (C9'), 35.0 (N2 - CH<sub>3</sub>), 32.0 (C7''), 27.6 (C4), 25.4 (C8''), 22.2 (C4').



### 3.1.10. aromolin (BV8, I32)

Mr = 594, m = 10 mg, C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +258 (c 0,094; CHCl<sub>3</sub>)



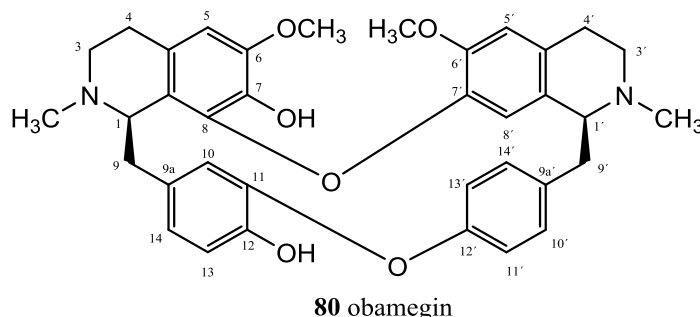
Na základě 2D NMR experimentů a již publikovaných dat<sup>87,88,89</sup> byla určena konstituce bisbenzylisochinolinového skeletu typu VI. Z naměřených NOESY experimentů byla určena i relativní stereochemie, tedy dva možné enantiomery buď 1*R*,1'*S* nebo 1*S*,1'*R*. Na základě změřené optické otáčivosti [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +258 (c 0,094; CHCl<sub>3</sub>) a publikovaných hodnot pro tyto dva enantiomery: aromolin (1*R*,1'*S*, [α]<sup>17</sup> = +327 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 33) a macolidin (1*S*,1'*R*, [α]<sup>20</sup> = -320 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 36), byla látka identifikována jako aromolin **79**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.39 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, H10'), 6.92-6.88 (2H, m, H11', H14'), 6.78 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H13), 6.73 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, H14), 6.66 (1H, s, H8), 6.41 (1H, dd, *J* = 7.1, 1.6 Hz, H13'), 6.35 (1H, s, H5), 6.30 (1H, s, H5'), 5.62 (1H, bs, H10), 4.18 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H1'), 3.80 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.58 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.58-3.55 (1H, m, H1), 3.28 (1H, d, *J* = 12.8 Hz, H9'), 3.25-3.17 (1H, m, H3'), 3.07-3.02 (1H, m, H4'), 3.02-2.96 (1H, m, H9), 2.89 (1H, dd, *J* = 12.5, 7.3 Hz, H3'), 2.82-2.74 (3H, m, H4, H9, H9'), 2.67 (1H, dd, *J* = 16.8, 5.6 Hz, H4'), 2.53 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 2.52 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.46-2.40 (3H, m, H4, H4, H3).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 152.9 (C12'), 148.5 (C6), 146.8 (C11), 146.5 (C6'), 144.0 (C7), 143.6 (C12), 141.7 (C8'), 138.4 (C9a'), 133.6 (C7'), 131.5 (C14'), 130.6 (C9a), 130.5 (C4a), 128.8 (C10'), 128.7 (C8a), 124.5 (C14), 122.9 (C4a'), 122.6 (C8a'), 121.6 (C11'), 120.7 (C13'), 117.4 (C8), 116.9 (C10), 114.5 (C13), 111.3 (C5), 104.7 (C5'), 64.4 (C1), 60.7 (C1'), 56.1 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 55.3 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 50.8 (C3), 45.0 (C3'), 43.5 (N2 - CH<sub>3</sub>), 41.7 (N2' - CH<sub>3</sub>), 39.7 (C9'), 38.4 (C9), 28.2 (C4), 24.4 (C4').

### 3.1.11. obamegin (BV11, I33)

Mr = 594, m = 10 mg, C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +221 (c 0,081; CHCl<sub>3</sub>)



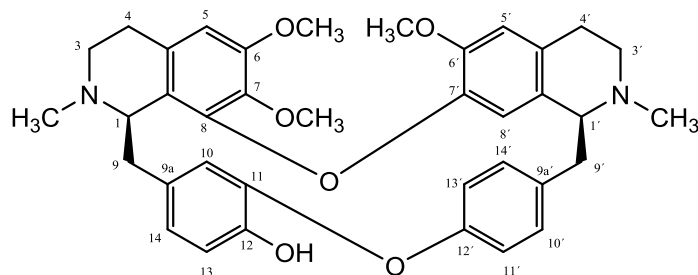
Na základě 2D NMR experimentů a již publikovaných dat<sup>87,88</sup> byla u této látky určena konstituce bisbenzylisochinolinového skeletu typu VIII. Z naměřených NOESY experimentů byla určena i relativní stereochemie, jednalo se o dva možné stereoizomery buď 1*R*,1'*S* nebo 1*S*,1'*R*. Podle publikovaných hodnot optických otáčivostí pro tyto dva enantiomery: *N*-Methyl-7-*O*-demethylpeinamine (1*S*,1'*R*, [α]<sup>20</sup> = -259 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 43) a obamegin (1*R*,1'*S*, [α]<sup>19</sup> = +273 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 44) a změřené optické otáčivosti, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +221 (c 0,081; CHCl<sub>3</sub>) byla neznámá látka určena jako obamegin **80**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.32 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, H10'), 7.07 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, H11'), 6.79 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, H13'), 6.78 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H13), 6.73 (1H, s, H5'), 6.67 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, H14), 6.44 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.2 Hz, H14'), 6.35 (1H, s, H5), 6.22 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H10), 6.05 (1H, s, H8'), 4.05 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H1), 3.89 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.78 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, dd, *J* = 10.5, 4.4 Hz, H1'), 3.48-3.41 (1H, m, H3'), 3.34-3.29 (1H, m, H9'), 3.29-3.24 (1H, m, H3), 2.97-2.92 (3H, m, H9, H4', H4'), 2.88-2.77 (4H, m, H3, H4, H3', H9'), 2.68 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.8 Hz, H9), 2.52 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.46-2.41 (1H, m, H4), 2.31 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 154.3 (C12'), 149.4 (C6'), 148.3 (C11), 147.0 (C6), 143.8 (C8), 143.5 (C7'), 143.4 (C12), 136.1 (C7), 135.3 (C9a'), 132.6 (C9a), 132.1 (C14'), 130.5 (C4a'), 130.3 (C10'), 129.7 (C8a'), 124.2 (C4a), 122.8 (C14), 122.7 (C13'), 122.5 (C11'), 121.8 (C8a), 121.4 (C8'), 115.1 (C13), 114.5 (C10), 112.3 (C5'), 107.3 (C5), 65.0 (C1'), 60.7 (C1), 56.1 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 45.9 (C3'), 44.3 (C3), 42.9 (N2' - CH<sub>3</sub>), 42.5 (N2 - CH<sub>3</sub>), 38.9 (C9), 38.3 (C9'), 25.2 (C4'), 23.0 (C4).

### 3.1.12. berbamin (BV7, I1)

Mr = 608, m = 8 mg, C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +43,6 (c 0,101; CHCl<sub>3</sub>)



11 berbamin

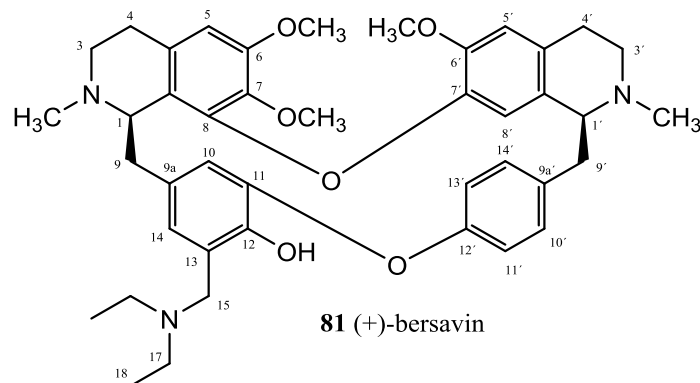
Na základě 2D NMR experimentů a již publikovaných hodnot chemických posunů<sup>9</sup> byla určena konstituce bisbenzylisochinolinového skeletu typu VIII. Pro určení absolutní konfigurace byla jednak naměřena NOESY spektra a také změřena optická otáčivost [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +43,6 (c 0,101; CHCl<sub>3</sub>). Při srovnání s publikovanými látkami o stejné konstituci: berbamin (1*R*,1'*S*, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +109,7)<sup>8</sup> (str. 40), pendulin (1*S*,1'*S*, [α] = +265 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 44) a pycnamin (1*R*,1'*R*, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -283 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 45) a s již izolovanými látkami byla určena absolutní konfigurace jako 1*R*,1'*S* berbamin **11**. Byla také vyzkoušena popisovaná epimerizace, kde po zahřátí v methanolu se objevili signály pendulinu<sup>90</sup> charakteristická právě pro berbamin.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.29 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.2 Hz, H10'), 7.10 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.5 Hz, H11'), 6.82 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H13), 6.76 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, H14), 6.61 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.5 Hz, H13'), 6.51 (1H, s, H5'), 6.44 (1H, brd, *J* = 8.1 Hz, H14'), 6.40 (1H, bs, H10), 6.27 (1H, s, H5), 5.98 (1H, bs, H8'), 3.91-3.83 (2H, m, H1, H1'), 3.75 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.58 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.50-3.39 (1H, m, H3'), 3.30-3.24 (2H, m, H3, H9'), 3.11 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 3.02 (1H, d, *J* = 13.8 Hz, H9), 2.96-2.88 (2H, m, H9', H4'), 2.88-2.76 (4H, m, H3, H4, H3', H4'), 2.63-2.58 (1H, m, H9), 2.58 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.46-2.38 (1H, m, H4), 2.26 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>).

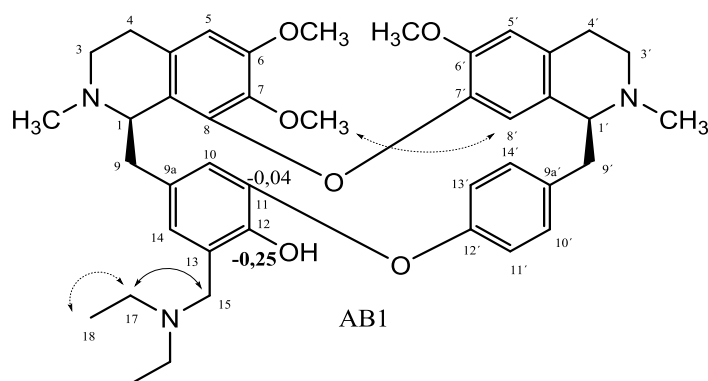
<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 153.6 (C12'), 151.8 (C6), 149.8 (C6'), 148.1 (C8), 147.4 (C11), 143.6 (C12), 143.5 (C7'), 136.9 (C7), 135.7 (C9a'), 134.0 (C9a), 132.2 (C14'), 130.3 (C10'), 129.4 (C4a), 128.8 (C4a'), 127.4 (C8a'), 123.5 (C14), 121.7 (C13'), 121.4 (C11'), 120.6 (C8a), 119.8 (C8'), 115.1 (C10), 114.5 (C13), 111.2 (C5'), 105.4 (C5), 63.7 (C1'), 62.2 (C1), 60.5 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 55.7 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 55.5 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 46.0 (C3'), 45.1 (C3), 42.8 (N2' - CH<sub>3</sub>), 42.8 (N2 - CH<sub>3</sub>), 38.5 (C9), 37.8 (C9'), 25.5 (C4'), 23.8 (C4).

### 3.1.13. (+)-bersavin (BV5, AB1)

Mr = 693, m = 8 mg, C<sub>42</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +101,2 (c 0,134; CHCl<sub>3</sub>)



Neznámá látka **81** ve svých NMR spektrech jevila až pozoruhodnou podobnost s berbaminem **11**. Byl proto předpokládán stejný strukturní typ VIII a stejná substituce. Rozdílná molekulová hmotnost a přítomnost několika signálů navíc (nejprve připisovány zbytkovému rozpouštědлу) zapříčinila další rozbor. Na základě korelací 2D NMR spekter byl překontrolován základní skelet a pozice dvou etherových můstků. Díky NOESY korelaci H8' - C7OCH<sub>3</sub> byl určen první z nich mezi atomy uhlíků C8 a C7' (Obr. 23) a díky deuteriem indukovanému efektu byla určena poloha (C12) volného fenolického hydroxyly a tedy i druhého můstku mezi atomy uhlíků C11 a C12'. Z následné analýzy zbývajících signálů bylo získáno diethylaminomethylové zakončení navázané na aromatický uhlík C13 viz Obr. 23.



Obr. 23

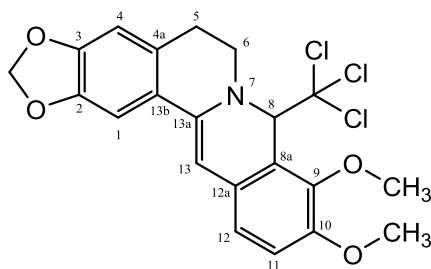
Pro určení absolutní konfigurace byla jednak naměřena NOESY spektra a také změřena optická otáčivost [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +101,2 (c 0,134; CHCl<sub>3</sub>). Při srovnání s publikovanými strukturně nejpodobnějšími látkami: berbamin (1*R*,1'*S*, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup> = +109,7)<sup>8</sup> (str. 40), pendulin (1*S*,1'*S*, [ $\alpha$ ] = +265 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 44) a pycnamin (1*R*,1'*R*, [ $\alpha$ ]<sup>25</sup> = -283 (CHCl<sub>3</sub>))<sup>8</sup> (str. 45) a s již izolovanými látkami byla určena absolutní konfigurace jako 1*R*,1'*S*.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7.35 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, H10'), 7.08 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, H11'), 6.66 (1H, s, H5'), 6.56 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H14), 6.51 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, H13'), 6.40-6.37 (3H, m, H14', H10, H5), 5.98 (1H, bs, H8'), 4.00-3.92 (1H, m, H1'), 3.90 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H1), 3.83 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H15), 3.72 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.56 (3H, s, C6' - OCH<sub>3</sub>), 3.49-3.40 (1H, m, H3'), 3.28-3.22 (2H, m, H3, H9'), 3.09 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 3.01-2.84 (2H, m, H9, H4'), 2.94-2.81 (4H, m, H4, H3', H4', H9'), 2.75-2.70 (1H, m, H3), 2.71 (4H, q, *J* = 7.3 Hz, H17), 2.62-2.56 (1H, m, H9), 2.55 (3H, s, N2' - CH<sub>3</sub>), 2.54-2.45 (1H, m, H4), 2.18 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 1.16 (6H, t, *J* = 7.3 Hz, H18).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CD<sub>3</sub>OD): 156.3 (C12'), 153.5 (C6), 151.3 (C6'), 149.6 (C11), 149.3 (C8), 146.8 (C12), 145.0 (C7'), 138.4 (C7), 136.2 (C9a'), 134.0 (C9a), 133.4 (C14'), 131.4 (C10'), 130.5 (C4a), 129.9 (C4a'), 128.8 (C8a'), 124.5 (C14), 123.2 (C13), 122.5 (C13'), 122.3 (C11'), 121.6 (C8a), 121.1 (C8'), 116.5 (C10), 112.5 (C5'), 107.0 (C5), 64.4 (C1'), 63.4 (C1), 61.0 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 57.2 (C15), 56.3 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 55.9 (C6' - OCH<sub>3</sub>), 47.6 (2C17), 46.1 (C3'), 45.5 (C3), 42.6 (N2' - CH<sub>3</sub>), 43.1 (N2 - CH<sub>3</sub>), 38.8 (C9), 37.3 (C9'), 26.1 (C4'), 24.9 (C4), 11.5 (2C18).

### 3.1.14. 8-trichloromethyl Dihydroberberin (BV14, B11)

Mr = 454, m = 8,5 mg, C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>



**82** 8-trichloromethyl dihydroberberin

Jednou z posledních izolovaných látek byl dlouho očekávaný berberin **1**<sup>91</sup>. Z NMR spekter byl následně určen protoberberinový skelet s atypickou substitucí v poloze č. 8 atomem uhlíku  $\delta$  105.5 ppm. Předpokládaná molekulová hmotnost se také výrazně lišila od změřené molekulové hmotnosti, a navíc hmotnostní spektra vykazovala M+2 štěpení intenzitou a tvarem odpovídajícím třem atomům chlóru. Porovnáním s literaturou<sup>92</sup> byla látka určena jako 8-trichloromethyl dihydroberberin **82**, vzniklý při izolaci a zpracování z berberinu **1**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.17 (1H, s, H1), 6.98 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H11), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H12), 6.62 (1H, s, H4), 6.10 (1H, s, H13), 5.95 (1H, d, *J* = 0.7 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.94 (1H, d, *J* = 0.7 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.64 (1H, s, H8), 3.94 (3H, s, C9 - OCH<sub>3</sub>), 3.88 (3H, s, C10 - OCH<sub>3</sub>), 3.87 (1H, ddd, *J* = 13.4, 5.7, 4.6 Hz, H6), 3.70 (1H, ddd, *J* = 13.4, 9.4, 3.9 Hz, H6), 3.34 (1H, ddd, *J* = 15.4, 9.4, 4.6 Hz, H5), 2.73 (1H, ddd, *J* = 15.4, 5.7, 3.9 Hz, H5).

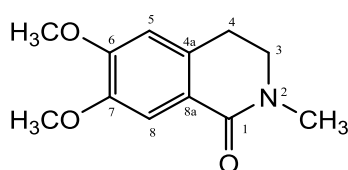
<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): 149.7 (C10), 147.5 (C3), 146.7 (C2), 146.4 (C9), 137.6 (C13a), 129.3 (C12a), 128.7 (C4a), 125.0 (C13b), 118.6 (C12), 114.9 (C8a), 114.6 (C11), 108.1 (C4), 105.5 (CCl<sub>3</sub>), 104.1 (C1), 101.1 (OCH<sub>2</sub>O), 97.5 (C13), 73.5 (C8), 61.0 (C9 - OCH<sub>3</sub>), 56.3 (C10 - OCH<sub>3</sub>), 51.6 (C6), 30.5 (C5).

## 3.2. Látky izolované z rostliny *Fumaria officinalis* L.

Rostlina *Fumaria officinalis* byla v minulosti již mnohokrát studována a již z ní bylo izolováno a popsáno velké množství alkaloidů. V této práci, z dvaceti izolovaných alkaloidů byly určeny dvě nové, dosud nepopsané látky (+)-fumararin **84** a (–)-fumarostrejdin **87**.

### 3.2.1. *N*-methylkorydaldin (FO6, 5/076)

Mr = 221, m = 2,17 mg, C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>



**83** *N*-methylkorydaldin

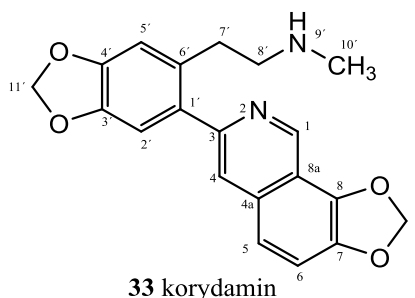
Relativně malá molekulová hmotnost (Mr = 221) poukázala na strukturně jednodušší molekulu. Již z <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter bylo možné určit výslednou strukturu. *N*-methylkorydaldin **83** je dobře znám jako koncový katabolický produkt oxidace spirobenzylisochinolinových a i jiných isochinolinových alkaloidů<sup>93</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.60 (1H, s, H8), 6.62 (1H, s, H5), 3.92 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 3.91 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.54 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H3), 3.13 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 2.93 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.9 (C1), 151.6 (C6), 147.9 (C7), 131.5 (C4a), 122.0 (C8a), 110.5 (C8), 109.2 (C5), 56.1 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 48.4 (C3), 35.1 (N2 - CH<sub>3</sub>), 27.5 (C4).

### 3.2.2. korydamin (FO20, 179-201/5)

Mr = 350, m = 2,7 mg, C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



Z naměřených 1D i 2D NMR spekter vyplynula přítomnost aromatického heterocyklu. Silně odstíněný signál aromatického vodíku  $\delta$  9.36 (H1) ppm, jež náležel atomu uhlíku  $\delta$  144.8 (C1) ppm, společně s korelacemi přes více vazeb na další atomy, poskytly substituovaný isochinolinový skelet. Druhá část tohoto alkaloidu pak byla tvořena aromatickým jádrem s postranní substitucí methylaminoethylem. Jelikož se látka v průběhu analýzy rozložila, byly některé posuny atomů uhlíků odečteny z gHMBC spektra a označeny hvězdičkou\*. Určením struktury a porovnáním posunů s publikovanými hodnotami<sup>94</sup> byla látka identifikována jako korydamin **33**.

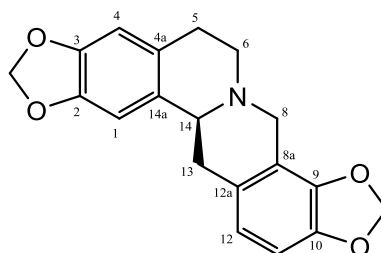
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.36 (1H, s, H1), 7.70 (1H, s, H4), 7.45 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H6), 7.42 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H5), 6.94 (1H, s, H2'), 6.86 (1H, s, H5'), 6.28 (2H, s, 2xH9), 6.04 (2H, s, 2xH11'), 3.18 (2H, t,  $J$  = 6.1 Hz, H8'), 2.86 (2H, t,  $J$  = 6.1 Hz, H7'), 2.04 (3H, s, 3xH10').

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 149\* (C3), 148\* (C4'), 147\* (C3'), 145\* (C7), 144.8 (C1), 142\* (C8), 133.6 (C1'), 132.3 (C4a), 130\* (C6'), 121.1 (C4), 120.4 (C5), 115.9 (C6), 114\* (C8a), 110.6 (C2'), 109.9 (C5'), 102.8 (C9), 101.5 (C11'), 51.5 (C8'), 35\* (C10'), 31.1 (C7'), kde \* jsou odečtené z gHMBC spektra.



### 3.2.3. (-)-stylopin (FO1, MS-1)

Mr = 323, m = 7 mg, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -120,5 (c 0,024; CHCl<sub>3</sub>)



**24** (-)-stylopin  
(-)-tetrahydrocoptisin

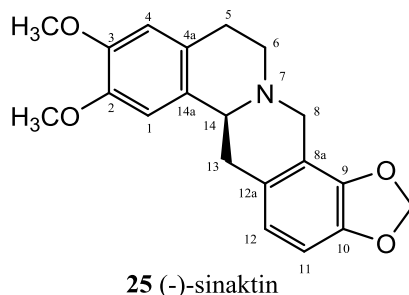
Z naměřených spekter byla určena konstituce tohoto alkaloidu jako stylopin **24**. Publikované posuny vodíku i uhlíku se dobře shodly s odečtenými hodnotami. Změřená optická otáčivost [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -120,5 (c 0,024; CHCl<sub>3</sub>) se rámcově shodla s dobře popsáním stereoizomerem (-)-stylopinu [α]<sub>D</sub> = -315 (c 0,5; CHCl<sub>3</sub>)<sup>95</sup>, [α]<sub>D</sub> = -229,3 (c 0,7; CHCl<sub>3</sub>)<sup>96</sup> a v zásadě se lišila od synteticky získaného (+)-stylopinu [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +283 (c 0,33; CHCl<sub>3</sub>)<sup>97,98</sup>. V literatuře se pro tento (*S*) stereoizomer objevují dva názvy a to (-)-stylopin a (-)-tetrahydrocoptisin **24**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.72 (1H, s, H1), 6.69 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H11), 6.64 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H12), 6.59 (1H, s, H4), 5.96-5.92 (4H, m, 2xOCH<sub>2</sub>O), 4.11 (1H, d, *J* = 15.1 Hz, H8), 3.61-3.56 (2H, m, H8, H14), 3.24 (1H, dd, *J* = 16.5, 3.6 Hz, H13), 3.19-3.09 (2H, m, H5, H6), 2.83 (1H, dd, *J* = 16.5, 11.0 Hz, H13), 2.70-2.62 (2H, m, H5, H6).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 146.2 (C3), 146.1 (C2), 145.0 (C10), 143.3 (C9), 130.3 (C14a), 128.3 (C12a), 127.6 (C4a), 121.0 (C12), 116.4 (C8a), 108.4 (C4), 106.9 (C11), 105.5 (C1), 101.1 (C9OCH<sub>2</sub>OC10), 100.8 (C2OCH<sub>2</sub>OC3), 59.7 (C14), 52.8 (C8), 51.1 (C6), 36.3 (C13), 29.3 (C5).

### 3.2.4. (-)-sinaktin (FO2, 5/067)

Mr = 339, m = 19,1 mg, C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -347,7 (c 0,532; CHCl<sub>3</sub>)



Tento alkaloid byl, podle svých NMR spekter, dosti podobný předchozímu, již určenému (-)-stylopinu **24**. Jediný, naopak výrazný rozdíl, spočíval v přítomnosti dvou methoxyskupin a absenci jedné OCH<sub>2</sub>O skupiny. Pro korelace přes více vazeb zjištěné z gHMBC spekter, byl tento rozdíl přiřazen kruhu A protoberberinového skeletu. Změřené hodnoty chemických posunů se shodly s již publikovanými hodnotami<sup>17</sup>.

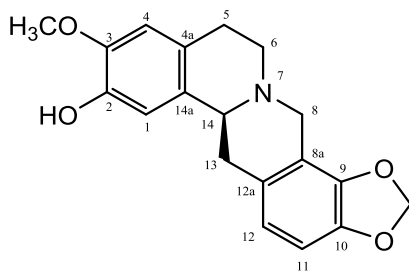
Porovnáním změřené optické otáčivosti [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -347,7 (c 0,532; CHCl<sub>3</sub>) s literárními daty (+)-sinaktin (14R) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +288 (c 0,22; CH<sub>3</sub>OH)<sup>97</sup> byla určena absolutní konfigurace uhlíku C14 jako (S) a látka jako (-)-sinaktin **25**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.73 (1H, s, H1), 6.69 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H11), 6.65 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H12), 6.62 (1H, s, H4), 5.96 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.92 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 4.12 (1H, d, *J* = 14.9 Hz, H8), 3.89 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>), 3.87 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.63 (1H, brd, *J* = 10.2 Hz, H14), 3.57 (1H, d, *J* = 14.9 Hz, H8), 3.28 (1H, dd, *J* = 15.9, 3.7 Hz, H13), 3.22-3.11 (2H, m, H5, H6), 2.84 (1H, dd, *J* = 15.9, 10.9 Hz, H13), 2.73-2.63 (2H, m, H5, H6).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 147.5 (C3), 147.4 (C2), 145.0 (C10), 143.3 (C9), 129.3 (C14a), 128.4 (C12a), 126.6 (C4a), 121.0 (C12), 116.6 (C8a), 111.3 (C4), 108.5 (C1), 106.8 (C11), 101.0 (OCH<sub>2</sub>O), 59.4 (C14), 56.8 (C2 - OCH<sub>3</sub>), 55.8 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 52.9 (C8), 51.3 (C6), 36.2 (C13), 28.9 (C5).

### 3.2.5. (-)-cheilanthifolin (FO16, 190-250/5/1)

Mr = 325, m = 4,5 mg, C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -107,7 (c 0,156; CHCl<sub>3</sub>)



**28** (-)-cheilanthifolin

Spektra této neznámé látky se podobala předcházejícím, s výjimkou substituce prvního aromatického kruhu. V naměřených spektrech byla přítomna pouze jedna methoxyskupina  $\delta$  3.83 ppm vázaná na atom uhlíku  $\delta$  148.3 (C3) ppm. Druhý výrazný rozdíl byl v rozpustnosti, kde řešitelná 2D NMR spektra s dostatečným množstvím korelací bylo možné naměřit v CD<sub>3</sub>OD. Přesto publikované chemické posuny <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C z CDCl<sub>3</sub> se dobře shodly<sup>99</sup> se změřenými (CDCl<sub>3</sub>).

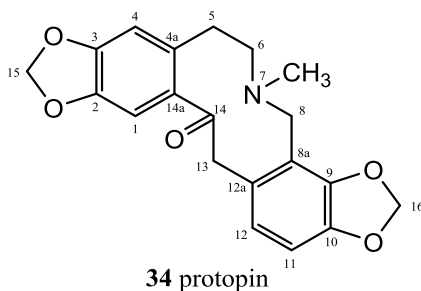
Změřená optická otáčivost [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -107,7 (c 0,156; CHCl<sub>3</sub>) toleruje skupinový efekt a rámcově se shoduje s publikovanými hodnotami [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -262 (c 0,60; CDCl<sub>3</sub>)<sup>100</sup>. Rozdíl může být způsoben zejména rozdílnou koncentrací měřených roztoků. Látka byla určena jako (-)-cheilanthifolin **28**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6.76 (1H, s, H1), 6.71 (2H, s, H11, H12), 6.69 (1H, s, H4), 5.96 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.94 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 4.18 (1H, d, *J* = 15.3 Hz, H8), 3.83 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.80 (1H, dd, *J* = 12.1, 4.0 Hz, H14), 3.70 (1H, d, *J* = 15.3 Hz, H8), 3.42 (1H, dd, *J* = 16.4, 4.0 Hz, H13), 3.34-3.31 (1H, m, H6), 3.10 (1H, ddd, *J* = 16.1, 11.2, 4.8 Hz, H5), 2.85-2.74 (3H, m, H5, H6, H13).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 148.3 (C3), 146.9 (C10), 146.4 (C2), 144.8 (C9), 129.4 (C14a), 128.6 (C12a), 125.6 (C4a), 122.4 (C12), 115.9 (C8a), 112.5 (C4), 113.1 (C1), 108.4 (C11), 102.7 (OCH<sub>2</sub>O), 61.0 (C14), 56.4 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 53.3 (C8), 52.5 (C6), 36.1 (C13), 28.7 (C5).

### 3.2.6. protopin (FO7, 2/002)

Mr = 353, m = 30 mg, C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>



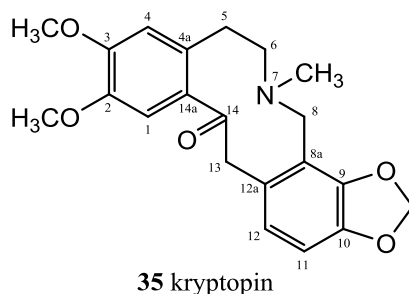
Konstituce látky byla určena na základě 2D NMR spekter. Naměřené hodnoty chemických posunů vodíků i uhlíků se shodly s již publikovanými hodnotami<sup>17,101</sup>. Látka byla identifikována jako dobře známý protopin **34**. Pro absenci centra chiralidy nebyla měřena optická otáčivost.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.90 (1H, s, H1), 6.68 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H11), 6.65 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H12), 6.63 (1H, s, H4), 5.94 (2H, s, H15), 5.91 (2H, s, H16), 3.96-3.69 (2H, m, H13), 3.69-3.45 (2H, m, H8), 3.23-2.84 (1H, m, H5), 2.76-2.40 (3H, m, H5, H6, H6), 1.95 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 192.4 (C14), 148.0 (C3), 146.2 (C9), 146.0 (C10), 145.9 (C2), 135.8 (C14a), 132.5 (C4a), 128.8 (C12a), 124.9 (C12), 117.6 (C8a), 110.4 (C4), 108.0 (C1), 106.7 (C11), 101.2 (C15), 100.8 (C16), 57.7 (C6), 50.9 (C8), 46.2 (C13), 41.5 (N - CH<sub>3</sub>), 31.5 (C5).

### 3.2.7. kryptopin (FO8, 5/070)

Mr = 369, m = 15 mg, C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>



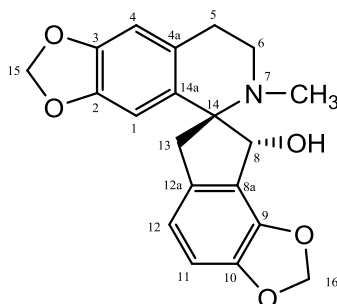
Naměřená NMR spektra vykazovala podobnost se spektry předchozího protopinu **34**. Zásadní rozdíl spočíval v přítomnosti dvou methoxyskupin a absenci jednoho dioxolanového kruhu. Pozice methoxyskupin, stejně tak i celková konstituce, byla určena pomocí experimentu gHMBC a látka byla určena jako kryptopin **35**. Chemické posuny vodíků i uhlíků se shodly s již publikovanými hodnotami<sup>17</sup>. Pro absenci centra chiralit y nebyla měřena optická otáčivost.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.00 (1H, s, H1), 6.70 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H11), 6.67 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H12), 6.66 (1H, s, H4), 5.92 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.81-3.47 (4H, m, H13, H8), 2.95-2.80 (2H, m, H5), 2.80-2.65 (2H, m, H6), 1.97 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 194.0 (C14), 149.4 (C3), 147.2 (C2), 146.1 (C9), 146.0 (C10), 135.9 (C14a), 130.4 (C4a), 128.9 (C12a), 124.7 (C12), 116.7 (C8a), 113.2 (C4), 112.0 (C1), 106.9 (C11), 100.9 (OCH<sub>2</sub>O), 57.3 (C6), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 50.7 (C8), 45.5 (C13), 41.6 (N - CH<sub>3</sub>), 31.6 (C5).

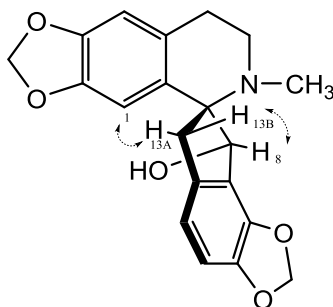
### 3.2.8. (+)-dihydrofumarilin (FO10, 22-29/4/1)

Mr = 353, m = 2,0 mg, C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +159,2 (c 0,103; CHCl<sub>3</sub>)



17 (+)-dihydrofumarilin

Na základě NMR spekter byl u této látky identifikovaný spirobenzylisochinolinový skelet se substitucí dvěma dioxolanovými kruhy. V dostupné literatuře byly nalezeny posuny vodíků<sup>102</sup>, které se shodly se změřenými hodnotami. Pro velmi malé množství (2 mg), nebylo možné připravit Mosherovy estery, pro stanovení absolutní konfigurace. Relativní stereochemie byla určena na základě NOESY korelací vodíku δ 6.36 (H1) ppm s 3.27 (H13A) ppm a vodíku δ 3.22 (H13B) ppm s 5.39 (H8) ppm (Obr. 24), tedy se jedná o jeden ze dvou možných enantiomerů 14*S*, 8*R* případně 14*R*, 8*S*.



Obr. 24

Změřené CD spektrum této látky vykazovalo polohy charakteristických maxim a minim typických pro skupinu těchto látek. Následně tedy byla určena absolutní konfigurace 14*S*, 8*R* pro látku (+)-dihydrofumarilin 17.

CD (MeOH, [Δε]<sub>λ</sub>) 0<sub>309</sub>, +10,428<sub>298</sub>, 0<sub>288</sub>, -4,722<sub>281</sub>, -1,635<sub>267</sub>, 0<sub>254</sub>, +5,056<sub>242</sub>, 0<sub>231</sub>, -3,806<sub>223</sub>, 0<sub>216</sub>.

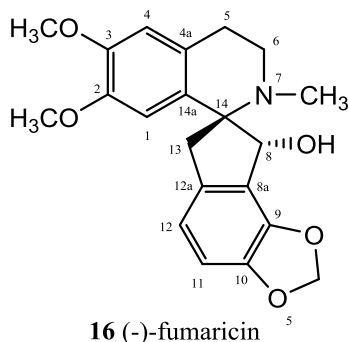
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6.77 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H11), 6.72 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H12), 6.56 (1H, s, H4), 6.36 (1H, s, H1), 5.93 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H16), 5.90 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H16), 5.81 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H15), 5.78 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H15), 5.39 (1H, s,

H8), 3.73-3.65 (1H, m, H6), 3.27 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H13A), 3.22 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H13B), 3.05-2.96 (2H, m, H5, H6), 2.63-2.57 (1H, m, H5), 2.36 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 149.0 (C10), 148.0 (C3), 147.3 (C2), 145.6 (C9), 135.6 (C12a), 129.7 (C4a), 129.1 (C14a), 125.9 (C8a), 116.8 (C12), 109.6 (C11), 109.0 (C4), 108.4 (C1), 102.6 (C16), 101.9 (C15), 82.3 (C8), 75.7 (C14), 48.1 (C6), 45.0 (C13), 38.0 (N7 - CH<sub>3</sub>), 24.4 (C5).

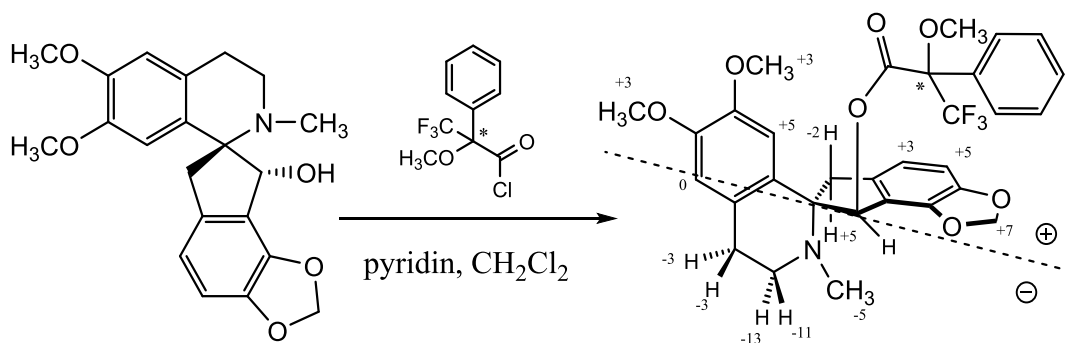
### 3.2.9. (-)-fumaricin (FO5, DK-1)

Mr = 369, m = 15 mg, C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -21 (c 0,146; CHCl<sub>3</sub>)



16 (-)-fumaricin

Z naměřených spekter, která se shodovala s publikovanými údaji<sup>103</sup>, byla konstituce určena jako fumaricin **16**. Pro minimum publikovaných údajů o stereochemii byly připraveny a změřeny dva estery s Mosherovou kyselinou<sup>63</sup>. Po odpaření rozpouštědla a vysušením byly naměřeny NMR spektra, porovnány posuny a spočtený rozdíl  $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$  viz Obr. 25. Z rozdílů chemických posunů byla určena absolutní konfigurace na chirálním uhlíku  $\delta$  74.5 (C8) ppm jako (*R*). Dále pak s využitím NOESY korelací vodíku H8 byla určena konfigurace na všech chirálních centrech.



Obr. 25

Stejná chemická konstituce byla již publikována jako (-)-fumaricin **16**, bez určené stereochemie s optickou otáčivostí [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -31 (CHCl<sub>3</sub>)<sup>103</sup>, která se shodovala s naměřenou hodnotou [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -21 (c 0,146; CHCl<sub>3</sub>).

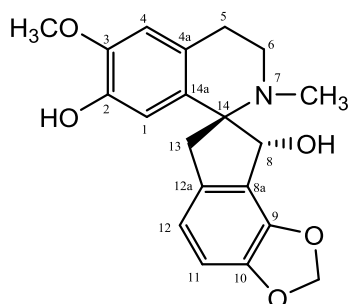
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.76 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H11), 6.71 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H12), 6.60 (1H, s, H4), 6.40 (1H, s, H1), 5.96 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.93 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.47 (1H, d, *J* = 10.3 Hz, H8), 3.83 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.81-3.72 (1H, m, H6), 3.50 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>), 3.35 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H13), 3.27 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H13), 3.05-2.97 (2H, m, H6, H5), 2.57 (1H, dd, *J* = 15.9, 5.9 Hz, H5), 2.41 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>), 1.54 (1H, d, *J* = 10.3 Hz, OH).



$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 148.2 (C3), 147.3 (C10), 147.2 (C2), 144.1 (C9), 134.9 (C12a), 128.5 (C4a), 125.8 (C14a), 124.9 (C8a), 115.5 (C12), 111.4 (C4), 110.0 (C1), 108.5 (C11), 101.3 (OCH<sub>2</sub>O), 82.0 (C8), 74.5 (C14), 55.7 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 55.5 (C2 - OCH<sub>3</sub>), 47.5 (C6), 43.5 (C13), 38.1 (N7 - CH<sub>3</sub>), 23.0 (C5).

### 3.2.10. (-)-fumaritin (FO17)

Mr = 355, m = 10 mg, C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -112,6 (c 0,089; CHCl<sub>3</sub>)



**15** (-)-fumaritin

Konstituce této látky, odpovídající publikovanému fumaritinu **15**, byla určena pomocí NMR spekter a porovnáním s publikovanými daty<sup>104</sup>. V dostupné literatuře však nebyl nalezen žádný důkaz o stereochemii ani optická otáčivost<sup>16</sup>. Z naměřených NOESY experimentů vyplynula relativní stereochemie, analogicky k předchozím látkám, a to korelací vodíku δ 6.46 (H1) ppm s 3.25 (H13A) ppm a vodíku δ 3.37 (H13B) ppm s 5.52 (H8) ppm případně s 2.43 (N-CH<sub>3</sub>) ppm. Pro malé množství vzorku nebylo možné ani připravit Mosherovy estery, proto byla zvolena nedestruktivní metoda cirkulárního dichroismu pro volbu ze dvou možných enantiomerů. Porovnáním průběhu změřené CD křivky s publikovanými hodnotami pro (-)-fumaritin<sup>56</sup> i celou skupinu alkaloidů spirobenzylisochinolinového typu, byla určena absolutní konfigurace této látky **15**.

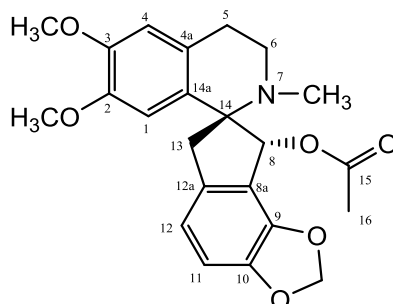
CD (MeOH, [Δε]<sub>λ</sub>) 0<sub>307</sub>, +10,805<sub>295</sub>, 0<sub>286</sub>, -4,951<sub>278</sub>, -1,248<sub>262</sub>, 0<sub>252</sub>, +3,247<sub>240</sub>, 0<sub>232</sub>, -2,965<sub>226</sub>, 0<sub>218</sub>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.75 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H11), 6.68 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H12), 6.60 (1H, s, H4), 6.46 (1H, s, H1), 5.95 (1H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.93 (1H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.52 (1H, s, H8), 3.84 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.82-3.72 (1H, m, H6), 3.37 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H13B), 3.25 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H13A), 3.07-3.00 (2H, m, H5, H6), 2.66-2.59 (1H, m, H5), 2.43 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 147.4 (C10), 146.1 (C3), 144.1 (C9), 143.9 (C2), 134.2 (C12a), 127.3 (C4a), 126.5 (C14a), 124.3 (C8a), 116.0 (C12), 112.8 (C1), 110.9 (C4), 108.8 (C11), 101.4 (OCH<sub>2</sub>O), 81.8 (C8), 74.5 (C14), 55.8 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 47.2 (C6), 43.4 (C13), 37.8 (N7 - CH<sub>3</sub>), 22.9 (C5).

### 3.2.11. (-)-*O*-methylfumarofycin (FO3, 5/085)

Mr = 411, m = 5,19 mg, C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -53,6 (c 0,224; CHCl<sub>3</sub>)



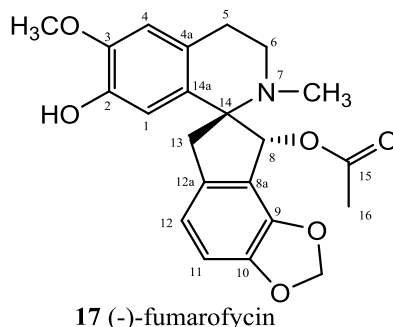
**20** (-)-*O*-methylfumarofycin

Z naměřených NMR spekter byla určena spirobenzylisochinolinová konstituce se substitucí dvěma methoxyskupinami, jedním dioxolanovým kruhem a jednou acetoxy skupinou. Relativní stereochemie byla určena na základě NOESY korelací vodíku  $\delta$  6.55 (H1) ppm s 3.58 (H13A) ppm a vodíku  $\delta$  3.46-3.37 (H13B) ppm s 6.60 (H8) ppm (analogicky viz Obr. 24 příp. Obr. 26). Ze dvou možných enantiomerů byl publikovaný pouze jeden (14*S*, 8*R*) pojmenovaný jako (-)-*O*-methylfumarofycin **20** s optickou otáčivostí [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -51 (c 27%; CHCl<sub>3</sub>)<sup>16</sup>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -30 (c 0,158; CH<sub>3</sub>OH)<sup>56</sup> odpovídající změřené hodnotě [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -53,6 (c 0,224; CHCl<sub>3</sub>). Chemické posuny se také shodly s publikovanými hodnotami<sup>17,56</sup>.

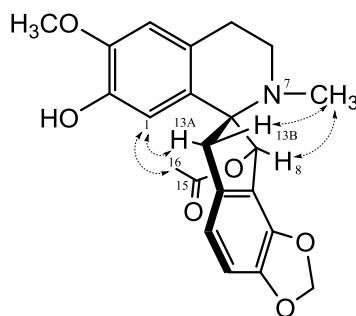
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6.87 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H11), 6.81 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H12), 6.68 (1H, s, H4), 6.60 (1H, s, H8), 6.55 (1H, s, H1), 5.96 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.93 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 3.80 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.60 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>), 3.58 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H13A), 3.46-3.37 (2H, m, H6, H13B), 3.12-3.03 (2H, m, H5, H6), 2.68 (1H, dd, *J* = 15.7, 6.0 Hz, H5), 2.43 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>), 1.72 (3H, s, H16).  
<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 171.2 (C15), 150.0 (C3), 149.1 (C10), 148.2 (C2), 145.0 (C9), 136.9 (C12a), 128.2 (C4a), 127.6 (C14a), 121.9 (C8a), 117.3 (C12), 113.1 (C1), 112.5 (C4), 110.8 (C11), 103.1 (OCH<sub>2</sub>O), 78.6 (C8), 74.7 (C14), 56.5 (C2 - OCH<sub>3</sub>), 56.3 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 48.8 (C6), 45.7 (C13), 38.4 (N7 - CH<sub>3</sub>), 25.8 (C5), 20.6 (C16).

### 3.2.12. (-)-fumarofycin (FO13, Fo397)

Mr = 397, m = 17 mg, C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -31 (c 0,129; CH<sub>3</sub>OH)



Neznámá látka se od předchozí, (-)-*O*-methylfumarofycinu **20**, lišila o jednu methylovou skupinu na fenolickém hydroxyly. Ve spektrech této látky byla pouze jedna methoxyskupina  $\delta$  3.85 ppm, pro tuto skupinu alkaloidů svým typickým chemickým posunem ležící v poloze č. 3, kdežto methoxyskupina, která by byla vázaná v poloze č. 2, by měla chemický posun v rozmezí  $\delta$  3.50 - 3.65 ppm. Poloha methoxyskupiny i celý skelet molekuly byly prověřeny i na základě korelací přes více vazeb a porovnáním publikovaných posunů<sup>17</sup>. Změřená optická otáčivost odpovídala otáčivosti pro jediný publikovaný stereoizomer [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -67,5 (c 1%; CH<sub>3</sub>OH)<sup>16</sup>, jemuž odpovídaly i změřené NOESY korelace vodíku  $\delta$  6.68 (H1) ppm na  $\delta$  3.51 (H13A) a na 1.75 (H16) ppm, a dále pak vodíků  $\delta$  2.33 (N - CH<sub>3</sub>) ppm na  $\delta$  3.36 (H13B) a na 6.49 (H8) ppm viz Obr. 26. Korelace vodíku H13B na vodík H8 byla překrytá jinou korelací.



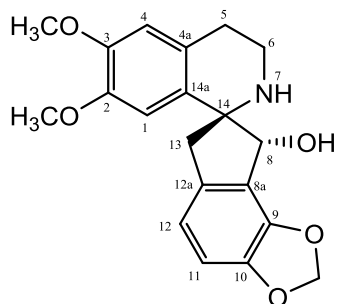
Obr. 26

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.80 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H11), 6.71 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H12), 6.68 (1H, s, H1), 6.51 (1H, s, H4), 6.49 (1H, s, H8), 5.97 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.93 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 3.85 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.51 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H13A), 3.36 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H13B), 3.37-3.31 (1H, m, H6), 3.06-2.98 (1H, m, H5), 2.92 (1H, ddd, *J* = 6.4, 2.6, 1.7 Hz, H6), 2.54 (1H, ddd, *J* = 16.6, 4.8, 1.7 Hz, H5), 2.33 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>), 1.75 (3H, s, H16).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 169.7 (C15), 147.2 (C10), 145.4 (C3), 143.6 (C9), 142.8 (C2), 136.9 (C12a), 128.5 (C14a), 126.8 (C4a), 121.1 (C8a), 116.1 (C12), 114.5 (C1), 110.1 (C4), 109.4 (C11), 101.5 (OCH<sub>2</sub>O), 77.0 (C8), 72.5 (C14), 55.7 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 47.9 (C6), 45.0 (C13), 38.2 (N7 - CH<sub>3</sub>), 25.9 (C5), 20.8 (C16).

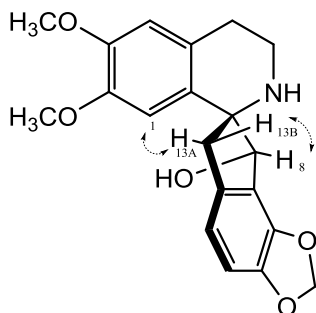
### 3.2.13. (+)-fumararin (FO14, 176-189/3/1)

Mr = 355, m = 4,8 mg, C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +36,6 (c 0,082; CHCl<sub>3</sub>)



**84** (+)-fumararin

Neznámá látka již podle 1D NMR spekter vykazovala velkou podobnost s látkou (–)-fumaricin **16**. Jediným markantním rozdílem byla absence methylové skupiny δ 2.41 (N7 - CH<sub>3</sub>) ppm. Následným řešením 2D NMR spekter byla konstituce spirobenzylisochinolinu potvrzena. Relativní stereochemie byla určena na základě NOESY korelací vodíku δ 6.70 (H1) ppm s 3.53 (H13A) ppm a vodíku δ 3.07 (H13B) ppm s 5.27 (H8) ppm viz Obr. 27.



**Obr. 27**

Pro malé množství izolované látky nebyly připravovány Mosherovy estery, ale byly změřeny CD spektra, která se shodovala se spektry ostatních látek tohoto typu. Nová látka byla pojmenována (+)-fumararin **84**.

CD (MeOH, [Δε]<sub>λ</sub>) 0<sub>306</sub>, +1,665<sub>294</sub>, 0<sub>286</sub>, -1,189<sub>278</sub>, -0,266<sub>258</sub>, 0<sub>251</sub>, +0,143<sub>248</sub>, 0<sub>245</sub>, -1,188<sub>232</sub>, -5,497<sub>210</sub>, 0<sub>205</sub>.

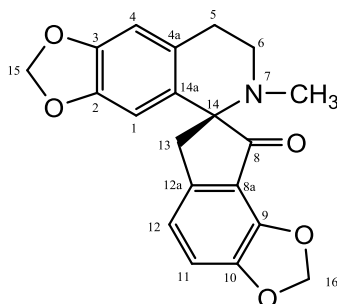
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.78 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H11), 6.71 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H12), 6.70 (1H, s, H1), 6.63 (1H, s, H4), 6.02 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.97 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.27 (1H, s, H8), 3.86 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.67 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>),

3.53 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H13A), 3.32 (1H, ddd,  $J = 13.0, 9.9, 4.7$  Hz, H6), 3.18 (1H, ddd,  $J = 13.0, 5.7, 3.6$  Hz, H6), 3.07 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H13B), 2.91 (1H, ddd,  $J = 16.3, 9.9, 5.7$  Hz, H5), 2.76 (1H, ddd,  $J = 16.3, 4.7, 3.6$  Hz, H5).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 148.3 (C3), 147.4 (C10), 147.0 (C2), 144.3 (C9), 135.8 (C12a), 128.4 (C4a), 127.4 (C14a), 123.6 (C8a), 116.9 (C12), 111.8 (C4), 110.0 (C1), 108.9 (C11), 101.4 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 80.4 (C8), 68.6 (C14), 55.8 (C2 -  $\text{OCH}_3$ ), 55.8 (C3 -  $\text{OCH}_3$ ), 47.0 (C13), 40.0 (C6), 29.1 (C5).

### 3.2.14. (+)-fumarilin (FO4, MS-3)

Mr = 351, m = 9,6 mg, C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +77 (c 0,09; CHCl<sub>3</sub>)



**23** (+)-fumarilin

Konstituce fumarilinu **23** byla určena na základě NMR spekter měřených v chloroformu a methanolu, zejména korelacemi gHMBC spektra. Následovalo porovnání s ostatními izolovanými látkami z této skupiny a sporými publikovanými <sup>1</sup>H NMR posuny<sup>105</sup>. Podle změřené [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +77 (c 0,09; CHCl<sub>3</sub>) a publikované [α]<sub>D</sub> = +96 (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>)<sup>16,106</sup> optické otáčivosti, byla následně i určena absolutní konfigurace (S)-C14 a látka identifikována jako (+)-fumarilin **23**.

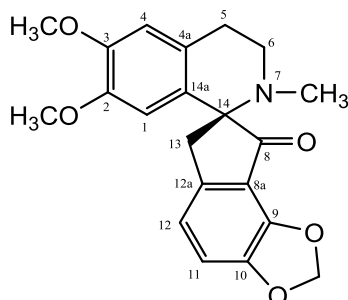
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7.22 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H11), 7.00 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H12), 6.62 (1H, s, H4), 6.17 (2H, s, 2xH16), 6.09 (1H, s, H1), 5.84 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H15), 5.83 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H15), 3.63 (1H, d, *J* = 18.5 Hz, H13), 3.54-3.47 (1H, m, H6), 3.29 (1H, d, *J* = 18.5 Hz, H13), 2.98-2.94 (1H, m, H6), 2.94-2.90 (2H, m, 2xH5), 2.39 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 204.9 (C8), 149.8 (C10), 148.5 (C3), 148.2 (C2), 145.9 (C9), 145.1 (C12a), 131.0 (C14a), 128.5 (C4a), 120.4 (C8a), 119.7 (C12), 116.9 (C11), 109.4 (C4), 105.3 (C1), 104.9 (C16), 102.5 (C15), 72.8 (C14), 49.4 (C6), 40.9 (C13), 39.3 (N - CH<sub>3</sub>), 29.1 (C5).



### 3.2.15. (+)-parfumidin (FO9, 5/075)

Mr = 367, m = 10,2 mg, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +28,4 (c 0,0987; CHCl<sub>3</sub>)



**22** (+)-parfumidin

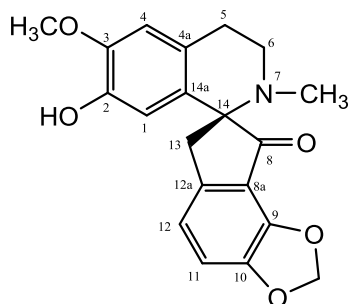
NMR spektra (+)-parfumidinu **22** se podobaly předešlé látce (+)-fumarilinu **23**, s rozdílem přítomností dvou methoxyskupin na místo jednoho dioxolanového kruhu. Poloha dvou methoxyskupin byla přiřazena na základě korelací přes více vazeb atomům uhlíku C2 a C3. Popis <sup>1</sup>H NMR spekter<sup>107</sup> byl v souladu se získanými hodnotami. Absolutní konfigurace na centru chiralitě (C14) byla následně určena porovnáním změřené optické otáčivosti [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +28,4 (c 0,0987; CHCl<sub>3</sub>) s publikovanou [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +33,3 (c 0,5; CHCl<sub>3</sub>)<sup>16,107</sup> jako (*S*).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.11 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H11), 6.91 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H12), 6.59 (1H, s, H4), 6.17 (1H, s, H1), 6.16 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 6.14 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 3.83 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.58 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>), 3.56 (1H, d, *J* = 17.9 Hz, H13), 3.53-3.47 (1H, m, H6), 3.37 (1H, d, *J* = 17.9 Hz, H13), 2.98-2.91 (1H, m, H5), 2.91-2.81 (2H, m, H5, H6), 2.36 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 207.2 (C8), 148.1 (C3), 147.9 (C10), 147.7 (C2), 144.2 (C12a), 143.8 (C9), 129.5 (C14a), 127.2 (C4a), 119.8 (C8a), 118.0 (C12), 115.1 (C11), 111.4 (C4), 108.3 (C1), 103.1 (OCH<sub>2</sub>O), 70.9 (C14), 56.1 (C2 - OCH<sub>3</sub>), 55.7 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 48.3 (C6), 41.2 (C13), 39.3 (N7 - CH<sub>3</sub>), 28.5 (C5).

### 3.2.16. (+)-parfumin (FO19, S2)

Mr = 353, m = 21,8 mg, C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +23,6 (c 1,10; CHCl<sub>3</sub>)



**21** (+)-parfumin

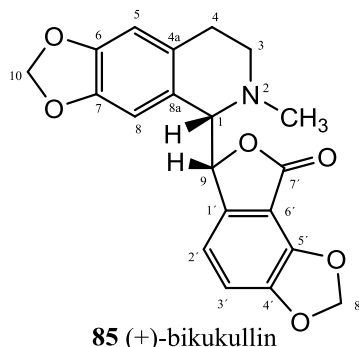
NMR spektra této látky se do jisté míry podobaly předchozí látce (+)-parfumidinu **22** s rozdílem jedné methoxyskupiny. Jak bylo popsáno u struktury **17** (–)-fumarofycinu, methoxyskupiny těchto látek mají charakteristické chemické posuny. Chybějící skupina s chemickým posunem v rozmezí  $\delta$  3.50 - 3.65 ppm by byla vázaná v poloze č. 2. Korelacemi přes více vazeb bylo toto tvrzení opět potvrzeno, v součinnosti s NOESY korelací methoxyskupiny  $\delta$  3.81 (C3 - OCH<sub>3</sub>) ppm s aromatickým vodíkem  $\delta$  6.56 (H4) ppm. Konstituce parfuminu **21** byla určena na základě 2D NMR spekter, tak i porovnáním s ostatními látkami z této skupiny a publikovanými daty<sup>17</sup>. Podle změřené optické otáčivosti [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +23,6 (c 1,10; CHCl<sub>3</sub>) a publikované optické otáčivosti [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +27,5 (CHCl<sub>3</sub>)<sup>108</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +18 (c 1,1; CHCl<sub>3</sub>)<sup>16</sup> byla následně i určena absolutní konfigurace jednoho chirálního centra (*S*)-C14 a látka jako (+)-parfumin **21**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.07 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H11), 6.87 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H12), 6.56 (1H, s, H4), 6.28 (1H, s, H1), 6.14 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 6.13 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.59 (1H, bs, OH), 3.81 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.56-3.50 (1H, m, H6), 3.51 (1H, d, *J* = 18.3 Hz, H13), 3.33 (1H, d, *J* = 18.3 Hz, H13), 2.98-2.91 (1H, m, H5), 2.87-2.77 (2H, m, H5, H6), 2.36 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 205.2 (C8), 147.8 (C10), 145.5 (C3), 144.3 (C12a), 144.0 (C2), 143.8 (C9), 130.5 (C14a), 126.2 (C4a), 119.9 (C8a), 118.1 (C12), 114.9 (C11), 110.7 (C4), 110.6 (C1), 103.0 (OCH<sub>2</sub>O), 70.7 (C14), 55.7 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 48.3 (C6), 41.2 (C13), 39.2 (N7 - CH<sub>3</sub>), 28.7 (C5).

### 3.2.17. (+)-bikukullin (FO11, 5/072)

Mr = 367, m = 8,4 mg, C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +89 (c 0,034; CHCl<sub>3</sub>)



Konstituce neznámé látky **85** získaná interpretací NMR spekter odpovídala ftalidisochinolinovému typu alkaloidů. Látky tohoto typu obsahují ve své molekule dva chirální atomy uhlíku. Čtyři možné stereoizomery této látky byly publikovány<sup>20</sup> s optickými otáčivostmi, hodnotami cirkulárního dichroizmu a chemickými posuny:

(-)-bikukullin (1*R*, 9*S*), [α]<sub>D</sub><sup>33</sup> = -128 (c 0,27; CHCl<sub>3</sub>)

(+)-bikukullin (1*S*, 9*R*), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +132,7 (c 0,049; CHCl<sub>3</sub>)

(-)-capnoidin (1*R*, 9*R*), [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -113,2 (c 0,8; CHCl<sub>3</sub>)

(+)-adlumidin (1*S*, 9*S*), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +116,2 (c 2; CHCl<sub>3</sub>)

Podle změřené optické otáčivosti [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +89 (c 0,034; CHCl<sub>3</sub>) nebylo možné jednoznačně rozhodnout mezi (+)-bikukullinem a (+)-adlumidinem. Jelikož se jedná o dva diastereomery zákonitě se liší ve svých chemických posunech<sup>20,109</sup>. Z interakční konstanty <sup>3</sup>J<sub>(H1, H9)</sub> a z chemických posunů zejména různě stíněných atomů vodíků H2' a H8 jednoznačně vyplynulo, že se jedná o (+)-bikukullin **85** viz Tabulka 1.

**Tabulka 1: porovnání (+)-bikukullinu, (+)-adlumidinu a neznámé látky FO11**

	(+)-bikukullin <sup>a</sup>	(+)-adlumidin <sup>a</sup>	FO11 (neznámá látka) <sup>b</sup>
<sup>3</sup> J <sub>(H1, H9)</sub>	3.8 Hz	3.3 Hz	4.1 Hz
H2'	6.19 ppm	7.13 ppm	6.18 ppm
H8	6.48 ppm	6.67 ppm	6.48 ppm

<sup>a</sup> 200MHz, CDCl<sub>3</sub>, lit.<sup>20</sup>; <sup>b</sup> 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>

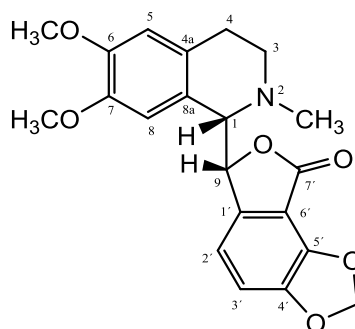
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.91 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H3'), 6.58 (1H, s, H5), 6.48 (1H, s, H8), 6.18 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H2'), 6.17 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H8'), 6.16 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H8'), 5.93 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H10), 5.92 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H10), 5.55 (1H, d, *J* =

4.1 Hz, H9), 4.03 (1H, d,  $J = 4.1$  Hz, H1), 2.88-2.81 (1H, m, H3), 2.60-2.50 (2H, m, H3, H4), 2.55 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 2.27-2.19 (1H, m, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 167.3 (C7'), 149.0 (C4'), 146.8 (C6), 145.9 (C7), 144.4 (C5'), 140.4 (C1'), 130.6 (C4a), 124.7 (C8a), 115.5 (C2'), 113.0 (C3'), 110.3 (C6'), 108.5 (C5), 107.7 (C8), 103.2 (C8'), 100.9 (C10), 85.0 (C9), 66.0 (C1), 49.4 (C3), 45.2 (N2 - CH<sub>3</sub>), 27.0 (C4).

### 3.2.18. (+)-korkolumin (FO15, 190-250/3)

Mr = 383, m = 4,7 mg, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +35,2 (c 0,193; CHCl<sub>3</sub>)



37 (+)-korkolumin

Konstituce neznámé látky, získaná z NMR spekter, se shodovala s předchozím (+)-bikukullinem **85**. Rozdíl spočíval v přítomnosti dvou methoxyskupin, navázaných v polohách č. 7 a 8. Pro dva chirální atomy uhlíku byla řešena stereochemie v souvislosti se změřenou optickou otáčivostí [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +35,2 (c 0,193; CHCl<sub>3</sub>). Dva stereoizomery s kladnou optickou otáčivostí byly publikovány<sup>20</sup> s hodnotami cirkulárního dichroizmu a chemickými posuny:

(+)-korkolumin (1*S*, 9*R*), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +77 (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>)

(+)-adlumin (1*S*, 9*S*), [α]<sub>D</sub> = +42 (CHCl<sub>3</sub>)

Podle změřené optické otáčivosti však nebylo možné jednoznačně rozhodnout mezi (+)-korkoluminem a (+)-adluminem. Jelikož se jednalo o dva diastereomery, lišily se drobně ve svých NMR spektrech<sup>20,109</sup>. Z interakční konstanty <sup>3</sup>J<sub>(H1, H9)</sub> a z chemických posunů zejména různě stíněných atomů vodíků H2' a H8 jednoznačně vyplynulo, že se jedná o (+)-korkolumin **37** viz Tabulka 2. Stejnému závěru odpovídaly i NOESY korelace zmiňovaných atomů vodíků.

Tabulka 2: porovnání (+)-korkoluminu, (+)-adluminu a neznámé látky FO15

	(+)-korkolumin <sup>a</sup>	(+)-adlumin <sup>a</sup>	FO15 (neznámá látka) <sup>b</sup>
<sup>3</sup> J <sub>(H1, H9)</sub>	3.4 Hz	3.0 Hz	3.9 Hz
H2'	6.35 ppm	7.15 ppm	6.32 ppm
H8	6.26 ppm	6.68 ppm	6.34 ppm

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, lit.<sup>17,20</sup>; <sup>b</sup> 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>

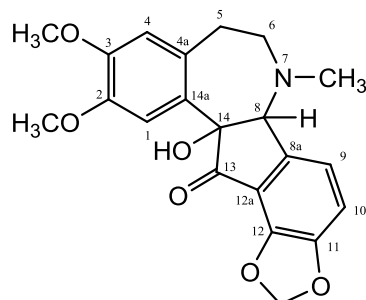
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7.12 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H3'), 6.69 (1H, s, H5), 6.58 (1H, dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, H2'), 6.17 (1H, s, H8), 6.14 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.87 (1H, dd, *J* = 2.5, 0.8 Hz, H9), 4.18 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H1), 3.78 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.52 (3H, s, C7 -

OCH<sub>3</sub>), 3.04 (1H, ddd,  $J = 11.7, 7.7, 4.9$  Hz, H3), 2.73 (1H, ddd,  $J = 15.8, 7.7, 5.3$  Hz, H4), 2.65 (1H, ddd,  $J = 11.7, 5.4, 5.3$  Hz, H3), 2.61 (3H, s, N2 - CH<sub>3</sub>), 2.47 (1H, ddd,  $J = 15.8, 5.4, 4.9$  Hz, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 169.1 (C7'), 150.7 (C4'), 149.8 (C6), 148.2 (C7), 146.1 (C5'), 142.4 (C1'), 130.6 (C4a), 123.8 (C8a), 116.8 (C2'), 114.7 (C3'), 112.8 (C5), 112.3 (C8), 110.8 (C6'), 104.9 (OCH<sub>2</sub>O), 85.4 (C9), 67.1 (C1), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 49.9 (C3), 44.5 (N2 - CH<sub>3</sub>), 27.1 (C4).

### 3.2.19. ( $\pm$ )-*O*-methylfumarofin (FO18, 138-178/4)

Mr = 383, m = 10 mg, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = 0 (*c* 0,066; CHCl<sub>3</sub>)



**86** ( $\pm$ )-*O*-methylfumarofin

<sup>1</sup>H NMR spektrum této látky bylo tvořeno analogickými skupinami jako ostatní látky spirobenzylisochinolinových alkaloidů, přesto zde byly patrné rozdíly zejména v chemických posunech. Oba signály methoxy skupin byly v rozmezí  $\delta$  3.80 - 3.95 ppm, přičemž obvykle jeden z nich se vyskytuje při nižších hodnotách  $\delta$  3.50 - 3.65 ppm. Naopak methyl vázaný na atomu dusíku byl tentokrát více odstíněn (místo hodnoty  $\delta$  2.25 - 2.40 ppm až na hodnotu  $\delta$  2.54 ppm). Obdobně atom vodíku  $\delta$  7.29 (H1) ppm byl výrazně odstíněn z obvyklého rozmezí  $\delta$  6.00 - 6.50 ppm.

Další naměřená data vedla k určení struktury *O*-methylfumarofinu, což odpovídalo i publikovaným<sup>21</sup> hodnotám chemických posunů <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C. Ve snaze určit absolutní konfiguraci byly připraveny estery Mosherových kyselin. Ze získaných spekter však nebylo možné určit absolutní konfiguraci. Zvláštností však bylo časté štěpení signálů, které se však následně vysvětlilo. Změřená optická otáčivost [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = 0 (*c* 0,066; CHCl<sub>3</sub>) poukazovala na racemickou směs. Tento závěr byl také potvrzen přidáním chirálního lanthanidového posunového činidla a naměřením dvou sad signálů, jak ve vodíkovém, tak i v uhlíkovém spektru. Látka byla určena jako ( $\pm$ )-*O*-methylfumarofin **86** s příznačnou podobou s dříve izolovaným a popsáným<sup>15,16</sup> (+)-fumarofinem **42**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.29 (1H, s, H1), 7.21 (1H, bs, H9), 7.15 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H10), 6.62 (1H, s, H4), 6.18 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.49 (1H, s, H8), 3.92 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.18 (1H, bs, OH), 2.80 (1H, bs, H6), 2.66 (1H, bs, H6), 2.54 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>), 2.50 (1H, bs, H5), 2.39-2.34 (1H, m, H5).

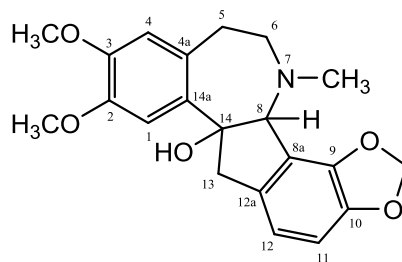
<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 200.9 (C13), 148.9 (C11), 148.6 (C3), 147.7 (C2), 144.7 (C12), 141.6 (C8a), 130.3 (C14a), 128.1 (C4a), 120.2 (C9), 118.7 (C12a), 115.2 (C10),

113.0 (C4), 109.8 (C1), 103.3 (OCH<sub>2</sub>O), 83.9 (C14), 71.5 (C8), 56.0 (2xOCH<sub>3</sub>), 50.0 (C6), 45.3 (N7 - CH<sub>3</sub>), 32.5 (C5).



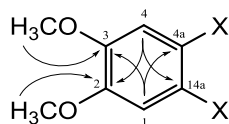
### 3.2.20. (-)-fumarostrejdin (FO12, 94-101/2/2/2)

Mr = 369, m = 2 mg, C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -35,4 (c 0,32; CHCl<sub>3</sub>)



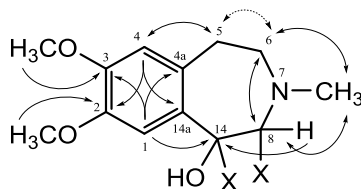
87 (-)-fumarostrejdin

Vodíkové spektrum této neznámé látky bylo tvořeno signály čtyř aromatických vodíků, dioxolanovým uskupením, dvěma methoxy skupinami, methylovou skupinou odstíněnou atomem dusíku a dalšími šesti alifatickými atomy vodíků. Dva aromatické singlety  $\delta$  7.15 (H1) a 6.66 (H4) ppm, jež byly přiřazeny po řadě na atomy uhlíků  $\delta$  110.6 a 113.1 ppm, poskytly korelace na aromatické uhlíky prvního aromatického jádra, viz Obr. 28, které neslo zmiňované dvě methoxyskupiny.



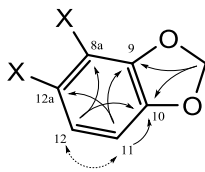
Obr. 28

Další korelace dvou aromatických singletů pak směřovaly do alifatické oblasti na kvarterní uhlík  $\delta$  87.5 (C14) ppm odstíněný atomem kyslíku a alifatickou methylovou skupinu  $\delta$  32.8 (C5) ppm, která sousedila s methylenovou skupinou  $\delta$  54.3 (C6) ppm (Obr. 29). Atomy vodíků  $\delta$  2.89-2.84 (H6) ppm pak měly korelace na odstíněný methyl (N - CH<sub>3</sub>) a na atom uhlíku  $\delta$  74.8 (C8) ppm, jehož atom vodíku  $\delta$  4.49 (H8) ppm slabou korelací přes dvě vazby na kvarterní atom uhlíku C14 uzavřel sedmičlenný kruh (Obr. 29).



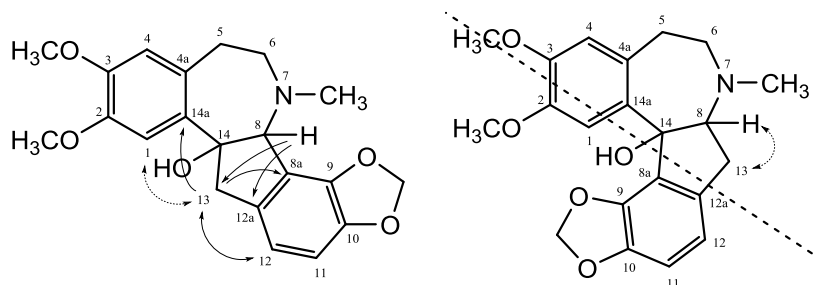
Obr. 29

Dva aromatické dublety  $^3J = 7.9$  Hz, tedy sousední atomy vodíků, byly nutně součástí druhého aromatického jádra. Korelace přes tři vazby a slabší přes dvě vazby (Obr. 30) vedly k přiřazení jednotlivých atomů uhlíků a následně i k určení polohy dioxolanového kruhu.



Obr. 30

Další postup spočíval v napojení již získaných fragmentů (Obr. 29, Obr. 30). Navázání alifatického methylenů  $\delta$  47.6 (C13) ppm na uhlík C12a prokázaly intenzivní korelace na aromatické uhlíky C12 a C8a. Celkem zásadní pro správnou orientaci těchto dvou fragmentů je absence interakce vodíků H8 (singlet) a H13 (dva dublety  $J = 16.7$  Hz) a zároveň přítomnost silné NOESY korelace vodíků H13 na aromatický vodík H1 (Obr. 31 nepřeskrtnutý konstituční izomer - vyznačeno čárkovaně). Vše dokládají i další gHMBC korelace znázorněné na Obr. 31.



Obr. 31

Strukturní analýzou byla získána nová látka (-)-fumarostrejdin **87** indenobenzazepinového typu, s optickou otáčivostí  $[\alpha]_D^{25} = -35,4$  ( $c$  0,32;  $\text{CHCl}_3$ ). Od (+)-fumaritrinu **43** se tato látka lišila jen o methoxyskupinu, ale otáčivost naznačila zcela jinou konfiguraci chirálních center. Pro nemožnost využít Mosherových esterů (nebyla zde sekundární hydroxylová skupina), a velmi malé množství látky, se nepodařilo dořešit absolutní konfiguraci.

CD (MeOH,  $[\Delta\epsilon]_\lambda$ )  $-0,220_{306}$ ,  $-2,524_{285}$ ,  $-0,538_{256}$ ,  $-5,933_{237}$ ,  $-0,607_{223}$ ,  $-20,324_{208}$ ,  $0_{203}$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.15 (1H, s, H1), 6.80 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H11), 6.75 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H12), 6.66 (1H, s, H4), 6.03 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.94 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.49 (1H, s, H8), 3.92 (3H, s, C2 -  $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (3H, s, C3 -  $\text{OCH}_3$ ),

3.54 (1H, d,  $J = 16.7$  Hz, H13), 3.32 (1H, d,  $J = 16.7$  Hz, H13), 6.00 (1H, dt,  $J = 14.6, 7.6$  Hz, H5), 2.89-2.84 (2H, m, H6), 2.60 (1H, dt,  $J = 14.6, 5.7$  Hz, H5), 2.39 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>).

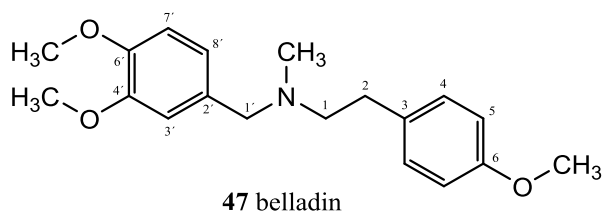
<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 148.1 (C3), 147.6 (C2), 146.5 (C10), 144.9 (C9), 136.3 (C12a), 135.7 (C14a), 128.8 (C4a), 122.0 (C8a), 117.3 (C12), 113.1 (C4), 110.6 (C1), 108.7 (C11), 100.9 (OCH<sub>2</sub>O), 87.5 (C14), 74.8 (C8), 56.1 (C2 - OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 54.3 (C6), 47.6 (C13), 42.9 (N7 - CH<sub>3</sub>), 32.8 (C5).

### 3.3. Látky izolované z rostliny *Nerine bowdenii* W. Watson

Z rostliny *Nerine bowdenii* bylo izolováno jedenáct alkaloidů. Z 2D NMR spekter byla nejprve určena konstituce a následně byla u chirálních látek řešena stereochemie.

#### 3.3.1. belladin (NB-1)

Mr = 315, m = 5 mg, C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>



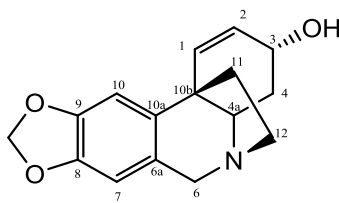
První izolovaná látka **47** byl v rostlině nejvíce zastoupený belladin. Publikované<sup>54</sup> chemické posuny byly v dobré shodě s naměřenými hodnotami.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.10 (2H, AA'BB', H4), 6.85 (1H, bs, H3'), 6.82 (2H, AA'BB', H5), 6.81-6.77 (2H, m, H6', H7'), 3.87 (3H, s, C5' - OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, C4' - OCH<sub>3</sub>), 3.78 (3H, s, C6 - OCH<sub>3</sub>), 3.49 (2H, s, H1'), 2.77 (2H, t, J = 7.1 Hz, H2), 2.60 (2H, t, J = 7.1 Hz, H1), 2.28 (3H, s, N - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 157.9 (C6), 148.9 (C4'), 148.2 (C5'), 132.5 (C3), 131.6 (C2'), 129.6 (2xC4), 121.2 (C7'), 113.7 (2xC5), 112.0 (C6'), 110.6 (C3'), 61.8 (C1'), 58.9 (C1), 55.9 (C5' - OCH<sub>3</sub>), 55.9 (C4' - OCH<sub>3</sub>), 55.2 (C6 - OCH<sub>3</sub>), 41.9 (N - CH<sub>3</sub>), 32.6 (C2).

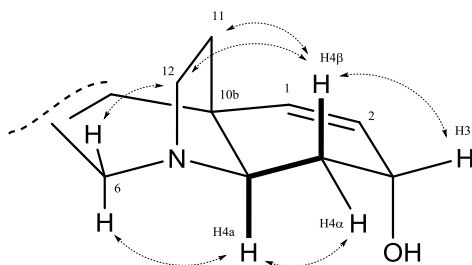
### 3.3.2. krinin (NB-10)

Mr = 271, m = 10,4 mg, C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -70,2 (c 0,057; CHCl<sub>3</sub>)



52 krinin

Naměřená NMR spektra vedla k určení konstituce alkaloidu krininového typu. Relativní stereochemie byla určena zejména pomocí NOESY korelací, tak i díky interakčním konstantám. Signál  $\delta$  1.74 ppm přiřazený vodíku H4 $\beta$  ležel v axiální poloze pro interakční konstantu s axiálním H4a  $^3J_{(H4a,H4\beta)} = 13.6$  Hz (Obr. 32 tučně). NOESY korelací vodíku H4 $\beta$  byla dále určena relativní poloha ethylenového můstku a díky interakční konstantě  $^3J_{(H4\beta,H3)} = 6.0$  Hz mezi axiálním vodíkem  $\delta$  1.74 (H4 $\beta$ ) ppm a ekvatoriálním  $\delta$  4.34 (H3) ppm i poloha hydroxyly. Získané chemické posuny byly v dobré shodě s publikovanými hodnotami<sup>110</sup>, změřená optická otáčivost [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -70,2 (c 0,057; CHCl<sub>3</sub>) se však lišila od publikované [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -9 (c 0,6) pravděpodobně vlivem velmi nízké koncentrace měřeného roztoku. Látka byla určena včetně stereochemie jako krinin 52.



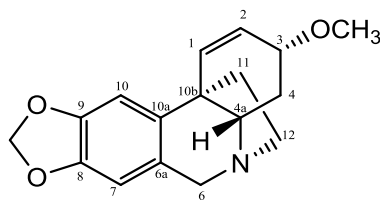
Obr. 32

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.84 (1H, s, H10), 6.55 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H1), 6.45 (1H, s, H7), 5.96 (1H, dd,  $J = 10.2, 5.2$  Hz, H2), 5.89 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.88 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 4.38 (1H, d,  $J = 16.6$  Hz, H6), 4.34 (1H, ddd,  $J = 6.0, 5.2, 1.7$  Hz, H3), 3.76 (1H, d,  $J = 16.6$  Hz, H6), 3.43-3.36 (2H, m, H4a, H12), 2.90 (1H, ddd,  $J = 13.0, 9.0, 6.0$  Hz, H12), 2.18 (1H, ddd,  $J = 12.2, 9.0, 4.3$ , H11), 2.05 (1H, ddd,  $J = 13.9, 4.3, 1.8$  Hz, H4 $\alpha$ ), 1.93 (1H, ddd,  $J = 12.2, 10.7, 6.0$  Hz, H11), 1.74 (1H, ddd,  $J = 13.9, 13.6, 6.0$  Hz, H4 $\beta$ ).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 146.3 (C9), 145.8 (C8), 138.0 (C10a), 131.7 (C1), 127.7 (C2), 125.6 (C6a), 106.9 (C7), 102.9 (C10), 100.8 (OCH<sub>2</sub>O), 63.8 (C3), 62.9 (C4a), 62.0 (C6), 53.4 (C12), 44.3 (C10b), 43.9 (C11), 32.5 (C4).

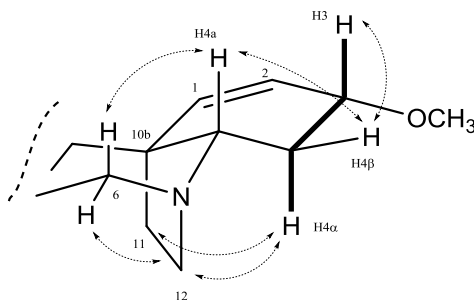
### 3.3.3. epibuphanisin (5/084)

Mr = 285, m = 10 mg, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +86,37 (c 0,039; CHCl<sub>3</sub>)



**88** epibuphanisin

Na základě NMR spekter byla nejprve určena konstituce neznámé látky lišící se o methylovou skupinu na alifatickém hydroxyly (C3) od předchozího krininu **52**. Stereochemickým řešením byly následně určeny i dva možné enantiomery, odpovídající struktuře epibuphanisinu, kde klíčové byly NOESY korelace vodíku δ 2.32-2.72 (H4β) ppm na axiální H3, H4a (Obr. 33 šipky čárkovaně). Podle interakční konstanty  $^3J_{(H3,H4\alpha)} \approx 11$  Hz byla určena pozice methoxyskupiny v ekvatoriální poloze (Obr. 33 tučně). V poslední řadě korelace vodíku δ 1.57 (H4α) ppm na vodíky ethylenového můstku vedly k určení haemanthaminového typu. Toto přesné určení tohoto jednoho stereoizomeru bylo až v součinnosti se změřenou optickou otáčivostí [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +86,37 (c 0,039; CHCl<sub>3</sub>) a porovnáním s publikovanou hodnotou [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +129 (c 0,224; EtOH)<sup>111</sup> pro strukturu epibuphanisinu **88**.



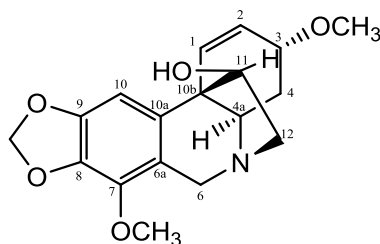
**Obr. 33**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.81 (1H, s, H10), 6.49 (1H, s, H7), 6.41 (1H, dd, *J* = 10.4, 2.2 Hz, H1), 5.91 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.87 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.82 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.5 Hz, H2), 4.45 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H6), 4.01-3.96 (1H, m, H3), 3.82 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H6), 3.53-3.46 (1H, m, H12), 3.41 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>) 3.26 (1H, dd, *J* = 13.6, 3.4 Hz, H4a), 2.95 (1H, ddd, *J* = 13.2, 9.1, 6.0 Hz, H12), 2.72-2.32 (1H, m, H4β), 2.22-2.16 (1H, m, H11), 2.14-2.07 (1H, m, H11), 1.57 (1H, ddd, *J* = 13.6, 12.1, 10.5 Hz, H4α).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 146.3 (C9), 145.9 (C8), 138.2 (C10a), 129.0 (C2), 128.8 (C1), 125.2 (C6a), 106.9 (C7), 102.8 (C10), 100.8 (OCH<sub>2</sub>O), 76.1 (C3), 66.7 (C4a), 61.9 (C6), 56.0 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 53.2 (C12), 44.7 (C10b), 44.6 (C11), 30.7 (C4).

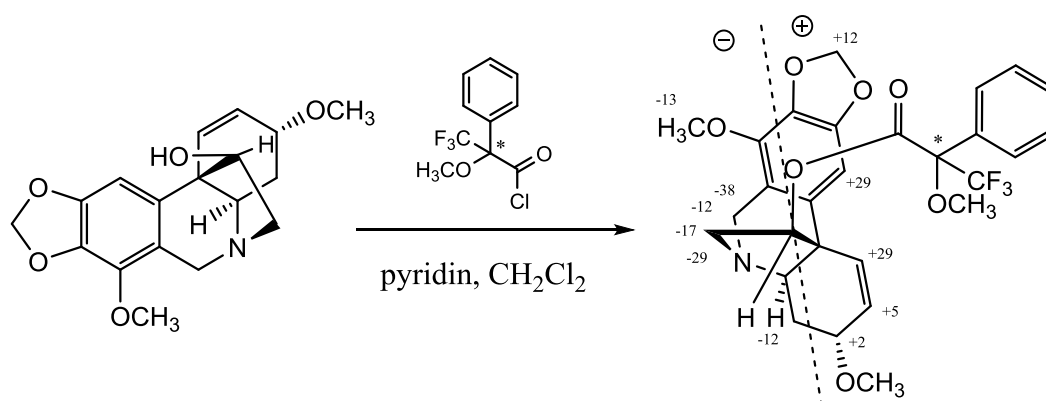
### 3.3.4. ambellin (1/003)

Mr = 331, m = 15 mg, C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +53,3 (c 1,014; CHCl<sub>3</sub>)



56 ambellin

Konstituce ambellinu byla určena na základě řešení 2D NMR spekter. Od předešlých se lišila přítomností další methoxyskupiny na aromatickém jádře a hydroxyly v poloze č. 11. K určení absolutní konfigurace, pro přítomnost sekundárního hydroxyly, byly připraveny estery Mosherových kyselin<sup>63</sup> Následně byla naměřena NMR spektra a porovnány posuny viz Obr. 34. Na základě rozdílů  $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$  byla určena absolutní konfigurace chirálního uhlíku C11 jako (*R*). Dále pak s využitím NOESY korelací vodíku H11 byla určena konfigurace na všech chirálních centrech a látka určena jako ambellin 56.



Obr. 34

Druhou metodou zvolenou pro kontrolu správnosti byl zvolen cirkulární dichroismus. Naměřené hodnoty maxim a minim odpovídají uspořádání B/C trans-1 což souhlasí i s publikovanými daty<sup>31,51,112</sup>.

CD (MeOH, [Δε]<sub>λ</sub>) 0<sub>296</sub>, -0,264<sub>286</sub>, 0<sub>269</sub>, +0,695<sub>252</sub>, 0<sub>246</sub>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.60 (1H, s, H10), 6.51 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H1), 6.05 (1H, dd, *J* = 10.1, 5.3 Hz, H2), 5.91 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.90 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 4.40 (1H, bs, H11), 4.36 (1H, d, *J* = 17.3 Hz, H6), 4.00 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>),

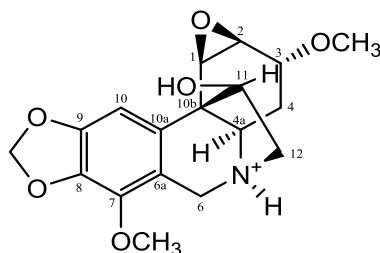
3.93 (1H, d,  $J = 17.3$  Hz, H6), 3.87-3.80 (2H, m, H3, H12), 3.50 (1H, dd,  $J = 13.6, 3.9$  Hz, H4a), 3.35 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>) 2.56 (1H, dd,  $J = 13.6, 3.9$  Hz, H12), 2.29 (1H, brd,  $J = 12.2$  Hz, H4), 1.69 (1H, td,  $J = 13.7, 4.0$  Hz, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 148.6 (C9), 141.0 (C7), 134.5 (C8), 131.3 (C10a), 130.8 (C1), 126.5 (C2), 116.0 (C6a), 100.9 (OCH<sub>2</sub>O), 100.3 (C10), 85.1 (C11), 71.9 (C3), 63.1 (C4a), 61.8 (C12), 59.2 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 58.7 (C6), 56.7 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 48.2 (C10b), 28.0 (C4).



### 3.3.5. 1,2 $\beta$ -epoxyambellin (Fr.109-112/8)

Mr = 347, m = 4,28 mg, C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -236 (c 0,022; CHCl<sub>3</sub>)



**89** 1,2 $\beta$ -epoxyambellin

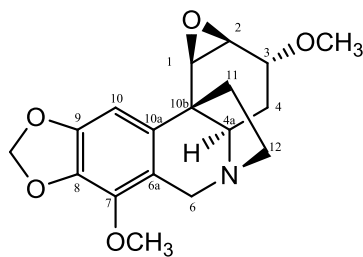
Konstituce neznámé látky byla určena na základě 2D NMR spekter. Ve spektrech podobných ambellinu **56** však chyběly signály dvojně vazby, ale objevily se charakteristické posuny atomů vodíku a uhlíku pro epoxid v polohách č. 1 a 2. Chemické posuny byly ve shodě s publikovanými daty<sup>113</sup> pro 1,2 $\beta$ -epoxyambellin **89**. Výrazněji se chemické posuny lišily pouze v blízkosti atomu dusíku a to v důsledku přítomnosti amoniové soli. Optická otáčivost [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -236 (c 0,022; CHCl<sub>3</sub>) se výrazně lišila od publikované hodnoty [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -14,6 (c 1,15; CH<sub>3</sub>OH)<sup>113</sup> pravděpodobně vlivem přítomné soli. Pro malé množství látky se bohužel nepodařilo připravit čistou látku ani změřit relevantní NOESY spektra. Chiralita je převzata z publikovaných dat pro 1,2 $\beta$ -epoxyambellin **89**<sup>113</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.71 (1H, s, H10), 5.97-5.95 (2H, m, OCH<sub>2</sub>O), 5.03 (1H, bs, H11), 4.55 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, H6), 4.11 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, H6), 4.04 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 4.02-4.00 (2H, m, H3, H12), 3.69 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H1), 3.57-3.49 (1H, m, H4a), 3.43 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.37-3.34 (1H, m, H2), 2.78-2.70 (1H, m, H12), 2.58-2.41 (1H, m, H4), 1.55 (1H, ddd, *J* = 13.8, 11.5, 2.4 Hz, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 149.4 (C9), 141.0 (C7), 134.7 (C8), 129.8 (C10a), 113.0 (C6a), 101.4 (OCH<sub>2</sub>O), 100.0 (C10), 77.2 (C11), 73.5 (C3), 62.1 (C4a), 59.4 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 58.4 (C12), 58.1 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 57.7 (C6), 54.1 (C2), 51.8 (C1), 46.1 (C10b), 22.9 (C4).

### 3.3.6. undulatin (Fr. 37 5/074)

Mr = 331, m = 5,7 mg, C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -111,11 (c 0,09; CHCl<sub>3</sub>)



49 undulatin

Z naměřených NMR spekter byla určena konstituce, která se od předchozí látky lišila o hydroxylovou skupinu v poloze č. 11. Podle NOESY spekter a interakčních konstant byla vyřešena i relativní konfigurace na jednotlivých chirálních centrech. Získané chemické posuny byly ve shodě s publikovanými daty<sup>110</sup>. Pouze optická otáčivost [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -46,0 (c 0,5; CHCl<sub>3</sub>)<sup>110</sup> se více lišila od změřené [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -111,11 (c 0,09; CHCl<sub>3</sub>), což mohlo být zkresleno velmi nízkou koncentrací měřeného roztoku. Byly proto změřeny CD spektra a určeno napojení kruhů B/C trans-1. Všechny získané výsledky odpovídají publikovaným údajům pro undulatin 49.

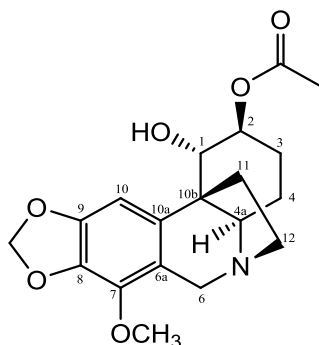
CD (MeOH, [Δε]<sub>λ</sub>) 0<sub>315</sub>, -0,341<sub>288</sub>, 0<sub>262</sub>, +1,714<sub>249</sub>, 0<sub>220</sub>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.62 (1H, s, H10), 5.89 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.88 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 4.27 (1H, d, *J* = 17.6 Hz, H6), 4.00-3.97 (1H, m, H3), 3.98 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 3.79 (1H, d, *J* = 17.6 Hz, H6), 3.75 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H1), 3.43 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.33 (1H, dd, *J* = 3.4, 2.4 Hz, H2), 3.28 (1H, ddd, *J* = 12.8, 10.9, 4.7 Hz, H12), 3.14 (1H, dd, *J* = 13.6, 3.3 Hz, H4a), 2.85 (1H, ddd, *J* = 12.8, 9.1, 5.8 Hz, H12), 2.43 (1H, ddd, *J* = 12.5, 10.9, 5.8 Hz, H11), 2.04 (1H, ddd, *J* = 12.5, 9.1, 4.7 Hz, H11), 1.91 (1H, brd, *J* = 13.8 Hz, H4), 1.42 (1H, ddd, *J* = 13.8, 13.6, 3.0 Hz, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 148.4 (C9), 141.0 (C7), 138.2 (C10a), 133.5 (C8), 116.9 (C6a), 100.7 (OCH<sub>2</sub>O), 96.4 (C10), 74.6 (C3), 61.4 (C4a), 59.1 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 58.3 (C6), 57.7 (C3 - OCH<sub>3</sub>), 55.0 (C2), 53.5 (C1), 52.4 (C12), 41.7 (C10b), 38.7 (C11), 24.7 (C4).

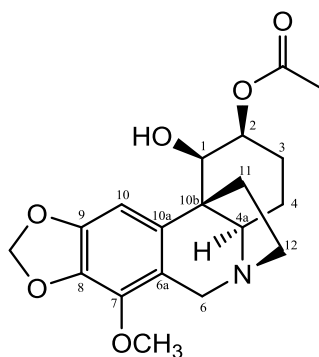
### 3.3.7. 1-*O*-deacetylbowdensin (NB-5)

Mr = 361, m = 13,3 mg, C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -234 (c 0,033; CHCl<sub>3</sub>)



**90** 1-*O*-deacetylbowdensin

Pro neznámou látku **90** byla nejprve naměřena 2D NMR spektra a následně byla určena konstituce, která odpovídala publikované látce 2-*O*-acetylbulbisinu (synonymem 1-epideacetylbowdensinu) **91**<sup>55</sup>, kde se však výrazněji lišily interakční konstanty v sekvenci H1-H2-H3. Změřená optická otáčivost [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -234 (c 0,033; CHCl<sub>3</sub>) se také zásadně lišila od publikované pro látku **91**<sup>55</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +11,1 (c 0,36; CH<sub>3</sub>OH), což vedlo k přehodnocení stereochemie substituentů v polohách č. 1, 2 se závěrem, že se jedná o jiný stereoizomer, než publikovaná látka **91**.



**91** 2-*O*-acetylbulbisin

Pro přítomnost sekundární hydroxylové skupiny byla snaha připravit Mosherovy estery. Bylo vyzkoušeno množství podmínek a různých bází (viz experimentální část), přesto se nepodařilo připravit estery v čistém stavu, převážně se jednalo o směsi produktů a jejich solí, tedy nebylo možné odečíst přesné chemické posuny.

Pro štěpení signálů vodíku  $\delta$  5.13 (q,  $J$  = 2.8 Hz, H2) ppm bylo určeno, že tento vodík musí ležet v ekvatoriální poloze (absence velké interakční konstanty na H3 axiální vodík). Intenzivní NOESY korelace vodíku  $\delta$  4.51 (H1) ppm na vodíky methylenu H11 pak poukázaly na postavení stejným směrem jako ethylenový můstek, tedy ekvatoriální

polohu. Tomu také odpovídala interakční konstanta  ${}^3J_{(H1,H2)} = 2.8$  Hz. Tyto dvě skutečnosti byly ve shodě s ostatními NOESY korelacemi.

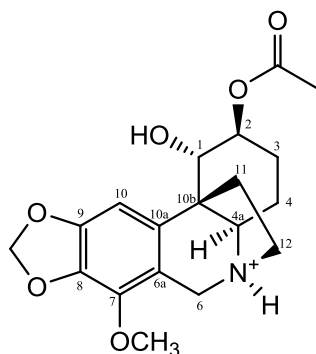
Absolutní konfigurace zůstala prozatím nedořešena, může se jednat o jeden ze dvou možných enantiomerů, kde jeden z nich odpovídá struktuře **90**. Možné řešení spočívá například ve změření CD spekter a v určení postavení kruhů trans-1 případně trans-2, nebo rentgenkrystalové struktury.

${}^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.45 (1H, s, H10), 5.87 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.13 (1H, q,  $J = 2.8$  Hz, H2), 4.51 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H1), 4.17 (1H, d,  $J = 17.2$  Hz, H6), 3.97 (3H, s, C7 -  $\text{OCH}_3$ ), 3.81 (1H, d,  $J = 17.2$  Hz, H6), 3.46-3.39 (1H, m, H12), 3.27 (1H, dd,  $J = 12.2, 5.1$  Hz, H4a), 2.77 (1H, ddd,  $J = 12.8, 8.8, 6.4$  Hz, H12), 2.65 (1H, ddd,  $J = 11.8, 10.7, 6.4$  Hz, H11), 2.08 (3H, s, CO -  $\text{CH}_3$ ), 2.07-1.99 (1H, m, H3), 1.84-1.75 (3H, m, H3, H4, H11), 1.64-1.54 (1H, m, H4).

${}^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 169.9 (CO), 149.0 (C9), 141.0 (C7), 137.6 (C10a), 133.6 (C8), 117.1 (C6a), 100.8 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 97.1 (C10), 71.9 (C2), 66.7 (C1), 63.4 (C4a), 59.2 (C7 -  $\text{OCH}_3$ ), 57.3 (C6), 51.1 (C12), 48.6 (C10b), 36.5 (C11), 23.3 (C3), 21.6 (C4), 21.4 (CO -  $\text{CH}_3$ ).

### 3.3.8. 1-*O*-deacetylbowdensin·HCl (Fr.85-92/2)

Mr = 361, m = 2,04 mg, C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -212 (c 0,028; CHCl<sub>3</sub>)



**90a** 1-*O*-deacetylbowdensin.HCl

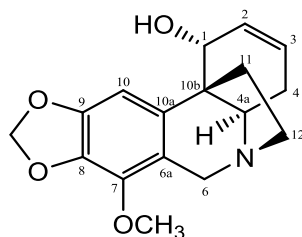
Spektra této látky byla nápadně podobná předchozímu určenému 1-*O*-deacetylbowdensinu **90**. Rozdíly v chemických posunech v okolí atomu dusíku signalizovaly přítomnost soli **90a**. Změřené hodnoty interakčních konstant v sekvenci H1-H2-H3 a NOESY korelace také odpovídaly tomuto stereoizomeru. Optická otáčivost [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -212 (c 0,028; CHCl<sub>3</sub>) se mírně lišila od předchozí změřené pro látku **90** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -234 (c 0,033; CHCl<sub>3</sub>), což bylo přičteno přítomné soli.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.48 (1H, s, H10), 5.94 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.15 (1H, q, *J* = 2.6 Hz, H2), 4.51 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H6), 4.48 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H1), 4.17 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H6), 4.03 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 4.02-4.00 (1H, m, H12), 3.77-3.71 (1H, m, H4a), 3.12-3.03 (1H, m, H12), 3.00-2.92 (1H, m, H11), 2.58-2.48 (1H, m, H4), 2.10 (3H, s, CO - CH<sub>3</sub>), 2.06-1.95 (2H, m, H3, H11), 1.95-1.86 (1H, m, H3), 1.84-1.72 (1H, m, H4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.5 (CO), 150.6 (C9), 140.9 (C7), 134.7 (C10a), 134.2 (C8), 110.7 (C6a), 101.5 (OCH<sub>2</sub>O), 97.1 (C10), 70.8 (C2), 66.0 (C1), 64.8 (C4a), 59.4 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 55.7 (C6), 50.9 (C12), 49.5 (C10b), 34.1 (C11), 22.1 (C3), 21.3 (CO - CH<sub>3</sub>), 19.5 (C4).

### 3.3.9. buphanamin (NB-6 5/094)

Mr = 301, m = 21,6 mg, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -326 (*c* 0,049; CHCl<sub>3</sub>)



**92** buphanamin

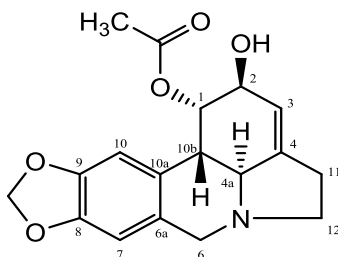
Naměřená NMR data vedla k určení konstituce. Interakční konstanty v sekvenci vodíků H1-H2-H3-H4 a NOESY korelace vodíku  $\delta$  4.72 (H1) ppm na atomy vodíků  $\delta$  2.00-1.91 a 1.87-1.81 (H11) ppm vedly k určení polohy hydroxylové skupiny vůči ethylenovému můstku. Rozlišení mezi dvěma enantiomery bylo provedeno na základě porovnání změřené [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -326 (*c* 0,049; CHCl<sub>3</sub>) a publikované optické otáčivosti pro buphanamin [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> = -195 (*c* 0,97)<sup>114</sup> a enantiomer phaedranamin [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +172 (*c* 0,82; MeOH)<sup>115</sup>, u kterého publikovaná CD spektra jednoznačně identifikovala trans-2 uskupení. Struktura byla určena jako buphanamin **92**.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.58 (1H, s, H10), 6.01-5.96 (1H, m, H2), 5.88 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.87 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.84 (1H, ddd, *J* = 10.5, 4.4, 2.9 Hz, H3), 4.72 (1H, d, *J* = 5.4, H1), 4.16 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H6), 3.97 (3H, s, C7 - OCH<sub>3</sub>), 3.81 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H6), 3.44 (1H, t, *J* = 8.2 Hz, H4a), 3.39 (1H, ddd, *J* = 12.6, 10.2, 2.6 Hz, H12), 2.75 (1H, ddd, *J* = 12.6, 8.3, 7.6 Hz, H12), 2.58 (1H, dddd, *J* = 19.7, 8.0, 4.5, 1.7 Hz, H4), 2.00-1.91 (2H, m, H4, H11), 1.87-1.81 (1H, m, H11).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 148.6 (C9), 140.7 (C7), 137.0 (C10a), 133.6 (C8), 128.6 (C3), 125.6 (C2), 117.6 (C6a), 100.7 (OCH<sub>2</sub>O), 98.2 (C10), 64.4 (C1), 59.3 (C4a), 59.1 (C7 - OCH<sub>3</sub>), 56.9 (C6), 51.5 (C12), 48.3 (C10b), 38.6 (C11), 28.2 (C4).

### 3.3.10. 1-acetylykorin (NB-9)

Mr = 329, m = 8,0 mg, C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -82 (c 0,574; CHCl<sub>3</sub>)



**63** 1-acetylykorin

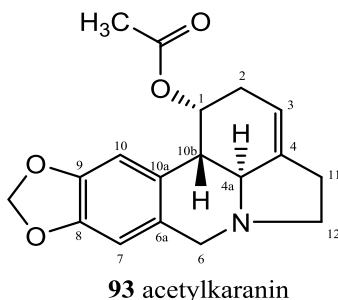
Z naměřených NMR spekter byla určena konstituce 1-acetylykorinu **63**, kde poloha acetylu jednoznačně vyplývá z korelace přes tři vazby atomu vodíku δ 5.59 (H1) ppm na atom uhlíku δ 170.8 (CO) ppm. Získané chemické posuny a interakční konstanty byly ve shodě s publikovanými daty<sup>116,117</sup>, včetně optické otáčivosti [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -64,8 (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>)<sup>116</sup>, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -118,9 (c 0,09; MeOH)<sup>117</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.64 (1H, s, H10), 6.56 (1H, s, H7), 5.91 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.59 (1H, s, H1), 5.55-5.52 (1H, m, H3), 4.18-4.16 (1H, m, H2), 4.14 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H6), 3.52 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H6), 3.35 (1H, ddd, *J* = 9.3, 4.9, 4.5 Hz, H12), 2.86 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H10b), 2.77 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H4a), 2.65-2.60 (2H, m, H11), 2.40 (1H, ddd, *J* = 9.3, 8.3, 7.9 Hz, H12), 1.93 (3H, s, CO - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.8 (CO), 146.5 (C9), 146.2 (C8), 143.8 (C4), 129.2 (C6a), 127.0 (C10a), 117.3 (C3), 107.3 (C7), 104.8 (C10), 100.9 (OCH<sub>2</sub>O), 72.6 (C1), 69.5 (C2), 61.5 (C4a), 56.7 (C6), 53.7 (C12), 39.2 (C10b), 28.6 (C11), 21.0 (CO - CH<sub>3</sub>).

### 3.3.11. acetylkaranin (NB-8)

Mr = 313, m = 8,0 mg, C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -82 (c 0,574; CHCl<sub>3</sub>)



Změřená spektra vedla k určení struktury acetylkaraninu **93**, u kterého v literatuře<sup>118,119</sup> byla stereochemie řešena pouze analogií se strukturně podobnými alkaloidy. Literární zdroje uvádějí jak polosyntetický produkt, tak i přírodní izolovanou látku.

Interakční konstanta  $^3J_{(H_{4a},H_{10b})} = 11.3$  Hz odpovídá trans diaxiálnímu uspořádání atomů vodíků δ 3.39 (H<sub>4a</sub>), 2.89 (H<sub>10b</sub>) ppm. Konfigurace na atomu uhlíku δ 67.3 (C<sub>1</sub>) ppm byla odvozena opět z interakční konstanty  $^3J_{(H_1,H_{10b})} < 1$  Hz, tentokrát mezi atomy vodíků δ 5.95-5.94 (H<sub>1</sub>), 2.89 (H<sub>10b</sub>) ppm, jež odpovídá axiální poloze hydroxylové skupiny a ekvatoriální poloze atomu vodíku. Struktura acetylkaraninu **93** se od předchozího 1-acetyllykorinu **63** liší o hydroxylovou skupinu v poloze č. 2.

Změřená optická otáčivost [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -82 (c 0,574; CHCl<sub>3</sub>) byla v dobré shodě s publikovanou hodnotou [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -80,5 (CHCl<sub>3</sub>)<sup>118</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6.75 (1H, s, H<sub>10</sub>), 6.73 (1H, s, H<sub>7</sub>), 5.95-5.94 (1H, m, H<sub>1</sub>), 5.94 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.93 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.59 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H<sub>3</sub>), 4.20 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H<sub>6</sub>), 3.99 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H<sub>6</sub>), 3.43 (1H, ddd, *J* = 10.2, 7.3, 4.9 Hz, H<sub>12</sub>), 3.39 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H<sub>4a</sub>), 3.06-3.00 (1H, m, H<sub>12</sub>), 2.89 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H<sub>10b</sub>), 2.78-2.71 (2H, m, 2xH<sub>11</sub>), 2.70 (1H, bd, *J* = 19.9 Hz, H<sub>2</sub>), 2.41 (1H, bd, *J* = 19.9 Hz, H<sub>2</sub>), 1.92 (3H, s, CO - CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 172.1 (CO), 149.0 (C<sub>9</sub>), 148.3 (C<sub>8</sub>), 136.9 (C<sub>4</sub>), 129.0 (C<sub>10a</sub>), 127.9 (C<sub>6a</sub>), 118.3 (C<sub>3</sub>), 108.5 (C<sub>7</sub>), 105.9 (C<sub>10</sub>), 102.7 (OCH<sub>2</sub>O), 67.3 (C<sub>1</sub>), 62.7 (C<sub>4a</sub>), 56.0 (C<sub>6</sub>), 54.9 (C<sub>12</sub>), 42.7 (C<sub>10b</sub>), 33.9 (C<sub>2</sub>), 29.6 (C<sub>11</sub>), 20.9 (CO - CH<sub>3</sub>).



## 4. ZÁVĚR

Z rostliny *Berberis vulgaris* L. bylo strukturně analyzováno 14 alkaloidů. Ve většině případů se jedná o minoritní látky, pravděpodobně atypické metabolity, se zajímavou biologickou aktivitou<sup>120</sup>. Mezi získanými látkami byly dvě z *B. vulgaris* již izolované (8-oxoberberin **6** a berbamin **11**), pět látek popsanych, ale dosud z této rostliny neizolovaných (berbidin **67**, (+)-chenabinol **71**, aromolin **79**, obamegin **80** a racemická směs označená BV2, C33 **69**) a jeden izolační artefakt **82** berberinu. Dále šest zcela nových látek (berbanin **68**, (+)-berbostrejdin **70**, (-)-muraricin **72**, (-)-berkristin **76**, (-)-verfillin **78** a (+)-bersavin **81**). Při určování konstituce těchto látek byla použita metoda izotopického indukovaného posunu u pěti z nich. Metoda byla vyzkoušena a optimalizována pro tento typ látek. Izolované látky byly určeny včetně absolutní konfigurace, často za pomoci již publikovaných struktur, s výjimkou látek **69** kde se jednalo o racemickou směs a nové látky **70** pro častý překryv signálů a žádnou dosud publikovanou podobnou předlohou strukturu.

Rostlina *Fumaria officinalis* L. poskytla velké množství alkaloidů, z nichž většina, pro množství již publikovaných prací, byla dříve popsána. Strukturní analýzou dvaceti látek bylo určeno patnáct již dříve z *Fumaria off.* izolovaných alkaloidů. Přesto u některých z nich chyběla kvalitní data, zejména o stereochemii. Tři alkaloidy *N*-methylkorydaldin **83**, (+)-bikukulin **85** a (±)-*O*-methylfumarofin **86** byly z této rostliny izolovány poprvé. Nejzajímavější jsou však dvě nové látky (-)-fumarostrejdin **87** a (+)-fumarandin **84**. U všech struktur obsahujících chirální centrum byla pomocí NOESY řešena relativní stereochemie. Mosherovy estery byly připraveny u látky (-)-fumaricin **16**, kde došlo také k určení absolutní konfigurace. U vhodných látek pro tuto metodu (+)-dihydrofumarilinu **17**, (-)-fumaritinu **15** a (+)-fumarandin **84** nebylo možné, pro malé množství látek, estery připravit. Pomocí posunového činidla Eu(HFC)<sub>3</sub> byla potvrzena dvojice enantiomerů látky (±)-*O*-methylfumarofinu **86**.

Izolací alkaloidů z rostliny *Nerine bowdenii* W. Watson bylo získáno pro strukturní analýzu jedenáct alkaloidů, z nich byly čtyři (epibuphanisin **88**, 1,2 $\beta$ -epoxyambellin **89**, buphanamin **92** a acetylkaranin **93**) z této rostliny izolovány poprvé. Dále byl izolován dosud nepopsaný alkaloid 1-*O*-deacetylbowdensin **90**, C1 epimer známého 2-*O*-acetylbulbisinu **91**. Určení absolutní konfigurace pomocí Mosherových esterů se podařilo u ambellinu **56**, přes mnohé snahy, pravděpodobně ze sterických důvodů, se nepovedly připravit estery u 1-*O*-deacetylbowdensinu **90** a buphanaminu **92**. U látek s nevyjasněnou strukturou byly změřeny CD spektra pro určení absolutní konfigurace uhlíků napojení kruhů a dále byla určena konfigurace ostatních chirálních center pomocí NOESY spekter případně užitím Karplusovy rovnice.

„Pokud A znamená úspěch, potom platí rovnice, že  $A = X + Y + Z$ ,  
kde X znamená práci, Y hru a Z držet jazyk za zuby.“  
Albert Einstein

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Přístrojové vybavení

NMR spektra byla měřena v roztocích chloroformu- $d_1$ , methanolu- $d_4$  a DMSO- $d_6$  při teplotě 25°C na spektrometru VNMR S500, od firmy Varian, pracujícím při 499,87 MHz pro jádra  $^1\text{H}$  a 125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . K ozařování a detekci signálu byla použita sonda OneNMR, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu byly použity pro  $\text{CDCl}_3$  u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 7.26$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77.0$  ppm, pro  $\text{CD}_3\text{OD}$  u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 3.30$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49.0$  ppm, a pro DMSO- $d_6$  u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 2.49$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 39.7$  ppm. Měřeními získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita  $^1\text{H}$  NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, b: široký signál), interakční konstanta (Hz) a přiřazení.

Parametry jednotlivých experimentů byly nastavovány zejména podle množství vzorku, čistoty, molekulové hmotnosti a potřebných informací takto:  **$^1\text{H}$  NMR spektra:** šířka spektra 4 - 6 kHz, velikost 16 k datových bodů, 16 průchodů, doba akvizice 2 s, doba před skeny (d1) 1 s,  $\pi/4$  puls 4,55  $\mu\text{s}$ .  **$^{13}\text{C}$  NMR spektra:** šířka spektra 30 kHz, velikost 64 k datových bodů, doba akvizice 1 s, doba před skeny (d1) 3 s,  $\pi/4$  puls 5,65  $\mu\text{s}$ ,  $^1\text{H}$  dekaplink sekvencí waltz-16. **gCOSY spektra:** sekvence gCOSY s dobou akvizice 150 ms, doba před skeny (d1) 1 s, 8 nebo 16 skenů v inkrementu, 256 nebo 512 inkrementů. **gHSQC spektra:** sekvence gHSQC s dobou akvizice 250 - 350 ms, doba před skeny (d1) 1 s, směřovací čas optimalizován na  $^1J_{\text{CH}} = 146$  Hz, 16 nebo 32 skenů v inkrementu, 256 nebo 512 inkrementů. **gHMBC spektra:** sekvence gHMBC s dobou akvizice 250 - 300 ms, doba před skeny (d1) 1 s, směřovací čas optimalizován na  $^3J_{\text{CH}} = 8$  nebo 5 Hz, 32 nebo 64 skenů v inkrementu, 256 nebo 512 inkrementů. **NOESY spektra:** sekvence NOESY s dobou akvizice 150 ms, doba před skeny (d1) 1 s, NOE směřovací čas 400 - 600 ms, 32 nebo 64 skenů v inkrementu, 256 nebo 512 inkrementů.

Hmotnostní spektra látek byla měřena na hmotnostním spektrometru ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Inc., New York, USA) a na spektrometru s vysokým rozlišením ESI-HRMS, Waters Synapt G2Si s hybridním analyzátozem quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) připojený na Waters Acquity I-Class UHPLC System. U vybraných látek byl také použit spektrometr EI-MS Agilent 7890A GC 5975 inert MSD pracující v EI módu při 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a EI-HRMS Waters GCT Premier, Agilent 7890A GC System.

Optická otáčivost byla měřena na automatickém rychloběžném polarimetru P3000 od firmy A. Krüss Optronic, pracujícím při vlnové délce sodíkové světla  $D = 589 \text{ nm}$  s monitorováním teploty měřeného vzorku.

CD spektra byla změřena při pokojové teplotě na přístroji Jasco J-810.

## 5.2. Obecné experimentální postupy

### 5.2.1. Izotopický indukovaný efekt

Pro šetrné zacházení se vzorky a minimum manipulace (přenášení, odpařování, sušení,...) byla tato metoda<sup>40-47</sup> upravena pro jednoduché měření přímo v NMR kyvetách. Látky byly rozpuštěny v 600  $\mu\text{l}$   $\text{CDCl}_3$  a deuteriový posun byl pozorován jako rozdíl dvou měření  $^{13}\text{C}$  NMR spekter. Pro první měření bylo přidáno malé množství  $\text{H}_2\text{O}$  a pro druhé měření další podíl  $\text{D}_2\text{O}$ . Metoda byla optimalizovaná, viz Tabulka 3, kde u prvního případu se celková přidaná voda postupně oddělila a vytvořila druhou fázi, u druhého postupu byl problém obdobný, navíc větší rozdíl mezi přídávky (2 a 6  $\mu\text{l}$ ) znamenal drobné výkyvy v chemických posunech nezávisle na přítomnosti vyměnitelných protonů. Třetí způsob pak přinesl stabilní výsledky a slušnou stálost vzorků. Přes problémy u prvních dvou metod se také podařilo jednoznačně určit polohu volné fenolické skupiny.

Tabulka 3: optimalizace množství  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{D}_2\text{O}$  u deuteriem indukovaného efektu

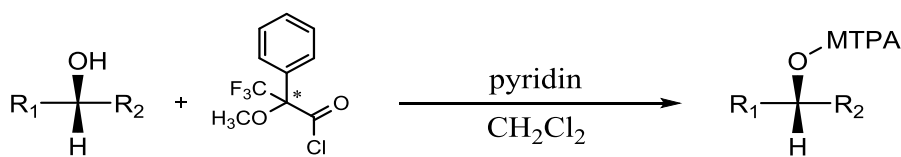
látka	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{D}_2\text{O}$	celkem
(+)-berbostrejdin <b>70</b>	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
(+)-chenabinol <b>71</b>	2 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
ostatní látky	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$

### 5.2.2. Chirální posunové činidlo

Metoda<sup>69-72</sup> byla zavedena na látce ( $\pm$ )-*O*-methylfumarofin **86** a následně u ostatních látek provedena analogicky. K 3,2 mg *O*-methylfumarofinu ( $M_r=383$ ) v 600  $\mu\text{l}$   $\text{CDCl}_3$  byl přidán jeden ekvivalent tj. 10 mg  $\text{Eu}(\text{HFC})_3$  ( $M_r=1194$ ). Změřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum na 64 průchodů a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum na 16 000 průchodů s výše uvedenými parametry.

### 5.2.3. Derivatizační reakce

Pro přípravu esterů Mosherových kyselin je dokumentováno mnoho postupů, většinou založených na použití příslušných chloridů kyselin, bází a dichlormethanu jako rozpouštědla<sup>61,62,63,64,65</sup>. Některé postupy jsou navrženy i na přípravu v pyridinu- $d_5$  případně v NMR kyvetách<sup>66,67,68</sup>.



Obr. 35 Reakční schéma přípravy Mosherových esterů

Zvolený obecný postup spočíval v reakci (viz Obr. 35) výchozí látky (Tabulka 4) rozpuštěné v 0,5 ml DCM za přítomnosti 1  $\mu$ l pyridinu a přidáním nadbytku chloridu Mosherovy kyseliny. Reakce byly prováděny za přísně bezvodých podmínek (přes noc vyžíhané baňky, čerstvě predestilovaný suchý dichlormethan, pod atmosférou argonu, ...) a monitorovány pomocí TLC. Reakční doba byla stanovena podle průběhu reakce, viz Tabulka 4.

Tabulka 4: navážky reaktantů připravených Mosher esterů

Výchozí látka	MTPA-Cl	reakční doba
<b>16</b> 2 mg	( <i>R</i> ) 7 $\mu$ l	50 h
<b>16</b> 2 mg	( <i>S</i> ) 7 $\mu$ l	10 h
<b>56</b> 3 mg	( <i>S</i> ) 17 $\mu$ l	50 h
<b>56</b> 3 mg	( <i>R</i> ) 17 $\mu$ l	10 h
<b>86</b> 3 mg	( <i>R</i> ) 10 $\mu$ l	10 h
<b>86</b> 9 mg	( <i>S</i> ) 25 $\mu$ l	10 h

MTPA-Cl chlorid Mosherovy kyseliny

Pro derivatizaci látek, u kterých se nepodařilo estery připravit (**90** a **92**), byly zkoušeny různé podmínky reakce. Jako báze byly voleny pyridin, triethylamin, diethylamin a 4-dimethylaminopyridin (1 - 3 ekvivalenty). Bezvodé rozpouštědlo bylo voleno buď dichlormethan 0,5 ml nebo pyridin-*d*<sub>5</sub> 0,5 ml a nadbytek Mosherova chloridu 5 - 10 ekvivalentů. Neúspěšnost těchto reakcí je připisována stericky obtížně přístupné hydroxylové skupině.

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. DCM byl destilován z CaH<sub>2</sub> v čas potřeby. Průběh reakce a čistota výsledných produktů byly kontrolovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silika gel 60 F254 (Merck) s detekcí pod UV lampou nebo s pomocí detekčního činidla Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2g), H<sub>3</sub>[P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>] (4g), konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 ml), H<sub>2</sub>O (200 ml) a následného zahřátí.

### 5.3. Izolace jednotlivých alkaloidů

Chemikálie a rozpouštědla použité pro izolaci: amoniak vodný roztok 25 – 29% p. a. (Penta, Ing. Švec, CZ), diethylamin p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), hydroxid sodný č. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), kyselina sírová 96% p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), síran sodný bezvodý p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), triethylamin p. a. (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), uhličitan sodný bezvodý č. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), aceton p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice, CZ), benzín lékařský RN vyhovující ČL 2009 a ČSN 65 6544 (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), cyklohexan č. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), diethylether p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim, CZ), ethylester kyseliny octové (ethyl-acetát) čistý (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), chloroform č. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), methanol p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), methanol HPLC gradient (J. T. Baker, Deventer, Netherlands), toluen p. a. (Penta, Ing. Švec, Praha, CZ), voda superčistá (Millipore, Milford, Massachusetts, USA).

Adsorbenty pro chromatografii: oxid hlinitý, pro chromatografii, neutrální, Brockmann I, 50–200 µm; Across–366680010 (Lach-Ner, Neratovice, CZ) (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), analytické TLC desky Silica gel 60 GF<sub>254</sub> for TLC (Merck Millipore, Praha, CZ), silikagel pro přípravu litých vrstev pro TLC: Silica gel 60 GF<sub>254</sub>, 1.07730.5000 (Merck Millipore, Praha, CZ).

Knihovna spekter NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA).

#### 5.3.1. Izolace alkaloidů z rostliny *Berberis vulgaris* L.

Na prášek nadrcená usušená kůra kořenů rostliny *B. vulgaris* (10 kg) byla extrahována perkolací za pokojové teploty roztokem 95% ethanolu (1:9). Po odpaření rozpouštědla byl získán viskózní hnědý odparek (2 kg), který byl následně zpracován 2% HCl (6 l, pH ~ 2) a zfiltrován. Filtrát byl následně naředěn na dvojnásobný objem a zneutralizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH ~ 9) a vytřepán do chloroformu (4 x 4,5 l). Odpařením organické vrstvy byl získán odparek (128 g), který byl pro následné čištění rozpuštěn v chloroformu (2,5 l) a chromatografován na koloně s Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2 kg); tak byly získány čtyři frakce A1-A4. Frakce A1 (49 g) byla následně separována sloupcovou chromatografií za použití gradientní eluce směsí lékařského benzínu s chloroformem a následně

ethanolem. Frakce byly jímány po 500 ml a monitorovány na TLC deskách a na GC/MS. Bylo získáno jedenáct hlavních frakcí (A-J)

Z frakce C (1,591 g) byla opakovanými krystalizacemi ze směsi ethanol-chloroform získána látka BV1 (415 mg). Z matečného louhu této frakce (1,080 g) byla pomocí preparativní TLC (toluen:chloroform:diethylamin 45:45:10) získána látka BV2 (9,7 mg).

Frakce E (0,208 g) byla chromatografována preparativní TLC (toluen:diethylamin 90:10), čímž byly získány dvě zóny. Z první zóny byla opakovanou preparativní TLC (toluen:diethylamin 95:5) získána látka BV3 (4 mg) a z druhé zóny byla preparativní TLC (toluen:aceton:ethanol:vodný amoniak 40:40:6:2) získána látka BV4 (12 mg).

Frakce H (25,7 g) byla podrobena další sloupcové chromatografii ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), stupňovitou elucí řadou směsí benzínu s chloroformem a dále chloroformu s ethanolem. Frakce byly jímány po 250 ml a monitorovány pomocí TLC a MS (ESI). Získány byly tři podfrakce (H1-3). Podfrakce H1 (1,028 g) byla podrobena opakované preparativní TLC (toluen:chloroform:diethylamin 45:45:10), čímž byly získány 2 zóny, opakovaná preparativní TLC první zóny vedla k izolaci BV5 a druhé zóny k BV6. Obě látky byly převedeny na chloridy bází (BV5 470 mg; BV6 24 mg). Z podfrakce H2 (12,6 g) bylo zpracováno pouze množství 1 g a to preparativní TLC (cyklohexan:ethylacetat:diethylamin 50:40:10), odkud byla izolována látka BV7 z hlavní zóny. Tato látka byla opakovaně rekrystalizována ze směsi ethanol-chloroform (230 mg). Podfrakce H3 (6,8 g) obsahovala převážně již izolovaný alkaloid BV7. Minoritní alkaloid BV8, který byl separován chromatografií 3 g podfrakce H3 použitím preparativní TLC (cyklohexan:ethylacetat:diethylamin 50:40:10). Alkaloid BV8 byl dále opakovaně krystalizován ze směsi ethanol-chloroform (139 mg).

Frakce CH (11,3 g) byla pro získání minoritně zastoupených alkaloidů podrobena další sloupcové chromatografii ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) stupňovitou elucí řadou směsí benzínu s chloroformem a dále chloroformu s ethanolem. Frakce byly jímány po 100 ml a monitorovány pomocí TLC a MS (ESI). Získány byly tři podfrakce (CH1-3). Podfrakce CH3 (1,3 g) byla podrobena preparativní TLC (cyklohexan:aceton:vodný amoniak 30:60:2) a ze třetí zóny byla získána látka BV9 (27 mg) a ze čtvrté zóny BV10 (53 mg).

Z frakce I (1,0 g) byla pomocí preparativní TLC (cyklohexan:ethylacetat:diethylamin 50:40:10) ze třetí zóny separována látka BV11, která byla opakovaně krystalizována z ethanolu (25 mg).



Frakce J (8,5 g) byla zahřáta a bylo přidáno 50 ml 2% HCl (pH ~ 1,5), suspenze filtrována. Roztok byl doplněn vodou na objem 300 ml, alkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH ~ 9,5) a suspenze vytřepána celkem 12 x 100 ml diethyletherem. Diethyletherový výtřeppek byl vysušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařen. Minoritní alkaloidy (přečištěná frakce J (4,5 g)) byly separovány preparativní TLC (cyklohexan:aceton:vodný amoniak 30:60:2 a toluen:chloroform:diethylamin 45:45:10), přičemž byla separována čtvrtá zóna, ze které byl izolován alkaloid BV12 (8 mg). Z páté zóny byl izolován alkaloid BV13 (13 mg).

Trichloroberberin (BV14) byl izolován z frakce A-2 (7,78 g). 1 g této frakce byl dělen preparativní TLC na litých deskách pomocí vyvíjecí směsi toluen:chloroform:kyselina octová 45:45:10, 1x. První zóna (0,402 g) byla následně dělena preparativní TLC na litých deskách soustavou cyklohexan:diethylamin 95:5, 2x. Alkaloidní koncentrát byl opakovaně krystalizován ze směsi chloroform-ethanol a byly získány žluté drobné krystaly BV14 (15 mg).

### **5.3.2. Izolace alkaloidů z rostliny *Fumaria officinalis* L.**

Rostlinný materiál pro extrakci byl získán od firmy Megafyt z Vrané nad Vltavou, verifikaci provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

25,15 kg suché nati *F. officinalis* bylo perkolováno ethanolem v poměru 1:8,15. Ethanolový extrakt byl zahuštěn na cca 7 l objemu, po zahřátí na 70 °C byly k extraktu přidány 3 l vody a 2 l 2% HCl (pH ~ 1,5). Po přidání 5 l vody a zchladnutí na cca 30 °C byl extrakt zfiltrován přes vlizelín. Zbytek po filtraci byl promyt 3 l 0,1% HCl a poté 2 l vody. Objem filtrátu byl doplněn vodou na 20 l. Následně byl filtrát upraven alkalizací 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (cca 3 l, pH ~ 9). Získaná suspenze byla postupně vytřepána do diethyletheru 5 x 5 l. Diethyletherové výtřepky byly zbaveny vody a odpařeny, celkově bylo získáno 99 g viskózního, tmavě hnědého odparku. Výtřeppek byl přečištěn rozpuštěním v 800 ml 2% HCl, doplněn vodou na 2 l, zfiltrován přes křemelinu a filtrát alkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH ~ 9-10 a vytřepán postupně 6 x 400 ml do chloroformu. Celkově bylo získáno 87,5 g alkaloidního sumárního extraktu, který byl separován na neutrálním Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (m = 2625 g, fa ACROSS, zrnitost 40-200 μm, deaktivovaný přísádkem 6 % vody – stupeň deaktivace Brockmann III, kolona 34 x 9,5 cm, průtok 1500 ml/hod.) sloupcovou chromatografií stupňovitou elucí benzín:chloroform (9:1, 17:3, 4:1, 7:3 3:2, 1:1, 2:3, 1:4), pokračovala chloroform a chloroform:ethanol (3:1, 1:1). Eluáty byly jímány po 500 ml, celkem bylo získáno 201 frakcí, které byly kontrolními TLC spojeny do 9 spojených frakcí A1-A9.

Frakce A1 (12,2 g; spojené frakce č. 50-67) byla podrobena sloupcové chromatografii na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (m = 1130 g, 40-200 μm, deaktivace přídávkem 6 % vody – stupeň deaktivace Brockmann III, kolona: 26 x 7,4 cm, průtok 1000 ml/hod.) stupňovitou gradientovou elucí (benzín:chloroform:diethylamin 18:2:1, 17:3:1, 16:4:1, 14:6:1, 12:8:1 a 8:12:1), frakce byly jímány po 100 ml, celkově bylo získáno 6 spojených frakcí. A2/1 až A2/6. Krystalizací frakce A1/1 (258 mg, spojená frakce č. 7-12) ze směsi ethanol-chloroform byla izolována látka FO1 (66 mg, nažloutlé práškovité krystaly). Krystalizací podfrakce A2/2 (905 mg; spojená frakce č. 13-32) z ethanol-chloroform byla získána látka FO2 (424 mg, nažloutlé krystaly). Frakce A2/3 (147 mg; spojená frakce č. 33-35) nebyla zpracovávána, obsahovala látky FO1 a FO2. Z podfrakce A2/4 (4,0 g, spojené frakce č. 36-49) byla získána opakovanou krystalizací z ethanol-chloroform látka FO3 (148 mg, bílé krystaly). A2/5 (2,8 g, spojené frakce č. 50-56) obsahovala látky FO4 a FO5, podfrakce A2/6 (1,16 g) obsahovala jen látku FO5(-)-fumaricin.

Frakce A3 (6,3 g; spojená frakce č. 68-76) byla rozdělena prep. TLC na 122 litých deskách 12x15 cm (SiO<sub>2</sub> 60 GF254 Merck, délka dráhy 10 cm, cyklohexan:diethylamin 9:1, počet vyvíjení 2x) do tří podfrakcí A3/1 (Rf 0,62; 83 mg), A3/2 (Rf 0,5; 0,653 g) a A3/3 (Rf 0,4; 2,98 g). Z podfrakce A3/1 byla získána krystalizací ze směsi chloroform-ethanol látka FO6 (12 mg, našedlá práškovitá látka), podfrakce A3/2 byla přečištěna sloupcovou chromatografií (SiO<sub>2</sub> 0,04-0,08 mm) elucí chloroform:toluen (9:1) a bylo získáno 145 mg látky FO4 (žlutá amorfni látka). Krystalizací A3/3 ze směsi ethanol-chloroform byla izolována látka FO7 (2,0 g; bílá krystalická látka).

Frakce A4 (9,6 g, spojená frakce č 77-87) byla podrobena opakované krystalizaci ze směsi ethanol-chloroform. Následně byla získána látka FO7 (5, 7 g). Zbývající část frakce (4 g) byla rozdělena prep. TLC na 90 litých deskách (SiO<sub>2</sub> GF254 Merck, 15x15 cm, dráha 13 cm, počet vyvíjení 4x, cyklohexan:toluen:diethylamin 65:30:5) do 4 podfrakcí A4/1 - A4/4. Frakce A4/1 (Rf 0,76; 1,7 g) obsahovala opět FO7 a nebyla dále zpracovávána. Frakce A4/2 (Rf 0,66; 425 mg;) byla prep. TLC na 28 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub> F254 Merck, cyklohexan:toluen:diethylamin 8:1:1, počet vyvíjení 3x, dráha 8,5 cm) rozdělena do 3 frakcí A4/2/1 (Rf 0,65, 180 mg) a A4/2/2 (Rf 0,5; 120 mg) a A4/2/3 (Rf 0,38; 103 mg). A4/2/1 nebyla dále zpracovávána, obsahovala látku FO7, stejně tak A4/2/2, která obsahovala látku FO4. Krystalizací A4/2/3 ze směsi ethanol-chloroform byla izolována látka FO8 (62,5 mg, našedlé krystaly). Podfrakce A4/3 (Rf 0,5; 1,01 g) byla podrobena krystalizací ze směsi ethanol-chloroform a bylo získáno 670 mg FO7, zbývající část této frakce (340 mg) byla separována prep. TLC na 10 litých

deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> GF254, cyklohexan:toluen:diethylamin 9:10:1, počet vyvíjení 2x, dráha 12 cm) do dvou podfrakcí A4/3/1 (Rf 0,7; 94 mg), která obsahovala látku FO7 a nebyla dále zpracovávána, a A4/3/2 (Rf 0,46, 183 mg). Opakovanou krystalizací frakce A4/3/2 ze směsi ethanol-chloroform byl získán FO9 (76,5 mg, bílé krystaly). Frakce A4/4 (Rf 0,15; 311 mg) obsahovala látku FO5 a nebyla izolačně zpracovávána.

Přečištěná frakce A5 (9,66 g, spojené frakce č. 88-93) přes vrstvu Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (40-200 µm ACROSS, deaktivovaného 6 % H<sub>2</sub>O, eluce směsí chloroform:benzín 1:1) byla separována sloupcovou chromatografií na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (m = 600 g, kolona 50x3,8 cm, průtok 600 ml/hod.) stupňovitou elucí chloroform:benzín (3:7; 2:3; 1:1; 3:4 a 100% chloroform), frakce byly jímány po 100 ml, celkem bylo získáno 75 frakcí, které byly podle TLC spojeny do 6 frakcí A5/1 až A5/6. Opakovanou krystalizací A5/1 (1,05 g, spojená frakce č. 12-21) ze směsi ethanol-chloroform byla izolována látka FO8 (242 mg, našedlé krystaly). Frakce A5/2 (1,53 g; spojené frakce č. 22-29) byla podrobena krystalizací ze směsi ethanol-chloroform, byla získána látka FO5 (0,95 g). Zbýlých 530 mg této frakce bylo prep. TLC na 12 litých deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub>, cyklohexan:toluen:diethylamin 6:3:1, počet vyvíjení 1x, dráha 12,5 cm) rozděleno do 3 podfrakcí A5/2/1 (Rf 0,78; 33 mg obsahující FO7), A5/2/2 (Rf 0,44; 96 mg FO5) a A5/2/3 (Rf 0,48; 150 mg). A5/2/3 byla prep. TLC na 10 komerčních deskách 20 x 10 cm (SiO<sub>2</sub> 60 F254 Merck, dráha 8,5 cm, toluen:cyklohexan:diethylamin 10:9:1) rozdělena do dvou frakcí A5/2/3/1 (88 mg) a A5/2/3/2 (42 mg, obsahuje FO5). Podfrakce A5b2/3/1 byla přečištěna prep. TLC na 10 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub>, F254 Merck, dráha 8,5 cm, cyklohexan:diethylamin 9:1, počet vyvíjení 5x) a bylo získáno 15,2 mg látky FO10 (žloutlá amorfni l.). Frakce A5/3 (1,91 g; spojená frakce č. 30-59) poskytla krystalizací ze směsi ethanol-chloroform látku FO5 (1,36 g, narůžovělé krystaly). Frakce A5/4 (1,12 g, spojené frakce č. 60-74) byla separována dohromady na 24 litých TLC deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> GF 254, dráha 12,5 cm, toluen:cyklohexan:diethylamin 45:45:10, počet vyvíjení 2x.). Tato spojená frakce byla rozdělena do 4 podfrakcí A5/4/1-4. Z podfrakce A5/4/2 (Rf 0,6; 93 mg) byla získána látka FO11 (37,6 mg; žlutá krystal. l.). Ostatní podfrakce (A5/4/1, A5/4/3, A5/4/4) obsahovaly již dříve izolované alkaloidy z frakce A5.

Frakce A6 (3,2 g, spojené frakce č. 94-101) byla prep. TLC na 64 litých deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> GF 254, cyklohexan:toluen:diethylamin 8:1:1, počet vyvíjení 5x, dráha 12,5 cm) separována do 2 frakcí A6/1 (Rf 0,5; 102 mg) a A6/2 (Rf 0,4; 1,18 g). Frakce A6/1 byla prep. TLC na 10 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub> 60 F254 Merck, dráha 8,5 cm, toluen:diethylamin 39:1, počet vyvíjení: 5x) na deskách rozdělena do 2 podfrakcí

A6/1/1 (Rf 0,7; 32 mg, obsahuje FO11, dále nezpracováváno) a A6/1/2 (Rf 0,45; 51 mg), která byla podrobena prep. TLC na 5 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub> 60 F254 Merck, dráha 8,5 cm, počet vyvíjení 3x, cyklohexan:toluen:diethylamin 8:1:1) a byla získána látka FO12 (10 mg). Prep. TLC z frakce A6/2 na 24 litých deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> GF 254, toluen:diethylamin 39:1, dráha 12,5 cm, počet vyvíjení 5x) byly získány 2 podfrakce A6/2/1 (Rf 0,6; 490 mg) a A6/2/2 (Rf 0,4; 355 mg). Opakovanou prep. TLC frakce A6/2/1 na 10 litých deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> GF 254, toluen:diethylamin 39:1, dráha 12,5 cm, počet vyvíjení 5x) byl získán FO13 (180 mg, narůžovělá amorfni l.). A6/2/2 nebyla zpracovávána, obsahuje FO5).

Frakce A7 (2,46 g; spojené frakce č. 102-120) byla získána sloupcovou stupňovitou chromatografií na neutrálním Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (m = 450 g, 40-200 µm ACROSS, deaktivace přísadkou 6 % vody, kolona 22x5,5 cm, benzín:chloroform:diethylamin 85:15:3; 80:20:3; 75:25:3; 70:30:3; 60:40:3, chloroform:diethylamin 100:3, chloroform:ethanol 1:1; 75:25, průtok 150 ml/h). Frakce byly jímány po 100 ml. Celkově bylo získáno 63 frakcí, které byly spojeny do 5 podfrakcí A7/1 (164 mg, spojené frakce č. 1-15), A7/2 (93 mg, spojené frakce č. 16- 32), A7/3 (241 mg, spojené frakce 33-44), A7/4 (164 mg, spojené frakce č. 45-47) A7/5 (1,29 g, spojené frakce č.48-63). Frakce A7/1 nebyla dále zpracovávána (obsahuje majoritně FO7, minoritně FO4). Frakce A7/2 a A7/3 obsahovaly majoritně FO5, další alkaloid ve stopovém množství, který se nepodařilo izolovat v dostatečném množství čisté formě. Frakce A7/4 (164 mg) byla separována prep. TLC na 10 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub> 60 F254 Merck, dráha 8,5 cm, benzín:chloroform:diethylamin 75:25:3, počet vyvíjení 8x) do 2 frakcí A7/4/1 (Rf 0,6; 28 mg, obsahoval FO11, dále nezpracovávána) a A7/4/2 (Rf 0,2; 74 mg). Prep. TLC na 5 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub> 60 F254 Merck, dráha 8,5 cm, toluen:diethylamin 9:1, počet vyvíjení 1x) byl získán FO14 (7,1 mg). Prep. TLC A7/5 na 20 litých vrstvách 15x15 (SiO<sub>2</sub> GF254, dráha 12,5 cm, benzín:chloroform:diethylamin 75:25:3, počet vyvíjení 5x) byla rozdělena do 8 frakcí A7/5/1 (Rf 0,84; 39 mg), A7/5/2 (0,74; 146 mg), A7/5/3 (Rf 0,62; 104 mg), A7/5/4 (Rf 0,55; 39 mg), A7/5/5 (Rf 0,44; 105 mg), A7/5/6 (Rf 0,33; 85 mg), A7/5/7 (Rf 0,22; 86 mg) a A7/5/8 (Rf 0,1; 1,2 g). Krystalizací A7/5/2 ze směsi chloroform-ethanol byla izolována látka FO11 (50,2 mg, žluté krystaly). Opakovanou prep. TLC A7/5/3 na 10 komerčních deskách (SiO<sub>2</sub> 60 F254, dráha 8,5 cm, cyklohexan:toluen:diethylamin 10:9:1, počet vyvíjení 2x) byl získán FO15 (6 mg). Opak. prep. TLC A7/5/5 na 6 komerčních deskách 20x10 cm (SiO<sub>2</sub>, dráha 8,5 cm, toluen:diethylamin 92,5:7,5, počet vyvíjení 1x) byl izolován FO16 (5,6 mg). Frakce

A7/5/1, A7/5/4, A7/5/6 a A7/5/8 obsahovaly minoritní množství alkaloidů, které se nepodařilo izolovat pro strukturní analýzu v dostatečném množství a v čistém stavu. Frakce A7/5/7 obsahovala minoritní množství látky FO17 a dále nebyla zpracovávána.

Frakce A8 (5,2 g; spojené frakce č. 121-178) byly prep. TLC na 104 litých deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> GF254, dráha 12,5 cm, toluen:diethylamin 19:1, počet vyvíjení 2x) rozdělena do 2 podfrakcí A9/1 (Rf 0,8; 410 mg), A9/2 (Rf 0,3; 1,69 g). Krystalizací A9/1 ze směsi chloroform-ethanol byla získána látka FO18 (240 mg, nažloutlé krystaly). Krystalizací A9/2 ze směsi chloroform-ethanol byla izolována látka FO19 (822 mg, bílé krystaly). Matečný louh A9/2 (860 mg) byl separován na 18 litých deskách 15x15 cm prep. TLC (SiO<sub>2</sub>, GF254, cyklohexan:toluen:diethylamin 6:3:1, počet vyvíjení 6x, dráha 12,5 cm) do 2 frakcí A9/2/1 (Rf 0,41; 157 mg) a A9/2/2 (Rf 0,35; 390 mg; obsahující FO19, dále nezpracovávána). Krystalizací A9/2/1 z bezvodého Et<sub>2</sub>O byl izolován FO17 (75 mg, bílé krystaly).

Frakce A9 (10,9 g; spojené frakce č. 179-201) byla přečištěna rozpuštěním v 250 ml 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrováním přes křemelinu (CELITE) a vytřepáním 5x 200 ml diethyletherem, po odpaření výtřepků bylo získáno 5,5 g frakce A9. Frakce A9 (5,5 g) byla separována sloupcovou stupňovitou chromatografií na neutrálním Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (m = 300 g, 40-250 μm, kolona 30x3,5 cm, benzín:chloroform:diethylamin 5:5:1, chloroform:diethylamin 9:1, chloroform:ethanol:diethylamin 5:5:1 a ethanol, jímání frakcí po 100 ml) do 43 frakcí, které poskytly celkově 6 spojených frakcí A9/1 až A9/6. Frakce A9/1 (116 mg; spojené frakce č. 2-4, obsahovala FO7, nezpracováváno). Opakovanou prep. TLC na 10 komerčních deskách 20x10 cm frakce (SiO<sub>2</sub> 60 F254, dráha 8,5 cm, toluen:diethylamin 9:1, počet vyvíjení 3x) A9/2 (51 mg, frakce č. 5) byl izolován FO20 (5,3 mg, naředlá amorfnní látka). Frakce A9/3 (24 mg; frakce č. 6) a A9/4 (19 mg; frakce č. 7-10) obsahovaly směs zcela minoritně kvantitativně zastoupených alkaloidů a nebyly nezpracovávány. Frakce A9/5 (1,1 g, spojené frakce č.11-34) byla prep. TLC na 22 litých deskách 15x15 cm (SiO<sub>2</sub> 60 GF254, dráha 12,5 cm, cyklohexan:toluen:diethylamin 5:4:1, počet vyvíjení 4x) separována do dvou podfrakcí A9/5/1 (Rf 0,47; 461 mg, z které byl izolován FO17 (73 mg) a A9/5/2 (Rf 0,32; 17 mg, obsahující FO19, nezpracovávána). Frakce A9/6 (242 mg; spojené frakce č. 35-43) obsahovaly jen zcela minoritní kvantitativní zastoupení alkaloidů. Tato frakce byla dále zpracovávána.

### 5.3.3. Izolace alkaloidů z rostliny *Nerine bowdenii* W. Watson

Čerstvé cibule rostliny *Nerine bowdenii* byly zakoupeny v množství 10 kg od firmy Lukon Glads (Sadská, ČR). Verifikace drogy byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc., a dokladový vzorek byl uložen v herbáři Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Příprava ethanolickeho alkaloidního extraktu proběhla pomocí acidobazických vlastností jednotlivých obsahových látek. Čerstvé cibule byly pomlety a extrahovány povařením v ethanolu (3 x 35 l). Rozpouštědlo bylo poté odpařeno za sníženého tlaku a odparek (cca 400g) rozpuštěn asi v 2,5 l 2 % HCl a zfiltrován. Vytřepáváním s diethyletherem byly odstraněny neutrální sloučeniny (3 x 3,5 l), extrakt byl zalkalizován 25 % roztokem amoniaku (na pH ~ 10). Alkaloidy byly extrahovány pomocí ethylacetátu (3 x 3,5 l). Poté co bylo organické rozpouštědlo odpařeno, bylo získáno 50 g alkaloidního extraktu, který byl podroben sloupcové chromatografii na deaktivovaném (6 % destilované vody) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (použito 2,5 kg), výchozí dělicí směsí byl benzín:chloroform 80:20. Stupňovitým zvyšováním polaritě zvyšováním podílu chloroformu (70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90), až k promývání kolony směsí chloroform:ethanol 99:1 až 1:1, bylo získáno 157 frakcí, které byly díky TLC spojeny do 35 podfrakcí (Tabulka 5), z nichž každá byla podrobena GC/MS analýze.

Jednotlivé podfrakce byly děleny pomocí analytické (na komerčních deskách) nebo preparativní (na nalívaných deskách) TLC.

Frakce 8-12 byla chromatografována preparativní TLC (To:Et<sub>2</sub>NH 9:1; vyvíjeno 2x) a byl z ní izolován belladin. Frakce 33-34 byla podrobena preparativní TLC (cHx:Et<sub>2</sub>NH 95:5; vyvíjeno 3x) separovány 3 zóny a z první zóny izolován homolykorin a z třetí zóny acetylkarantin. Frakce 37 byla podrobena preparativní TLC (cHx:To:Et<sub>2</sub>NH 5:5:1; vyvíjeno 2x). Separovány byly 4 zóny. Z druhé zóny byl izolován undulatin. Ze třetí zóny byl izolován opět acetylkarantin. Frakce 42 byla podrobena opakovaně preparativní TLC (cHx:Et<sub>2</sub>NH 9:1; vyvíjeno 3x). Ze druhé zóny byl izolován bufanisin a opakovanou TLC (To:Et<sub>2</sub>NH 9:1; vyvíjeno 2x) přečištěn. Frakce 85-92 chromatografována preparativní TLC (cHx:To:EtOH:Et<sub>2</sub>NH 50:40:5:5; vyvíjeno 3x), ze druhé zóny izolován acetylbulbisin a ze třetí zóny izolován bufanamin. Frakce 93-96 byla krystalizována v EtOH a získán ambellin 207 mg. Frakce 109-112 byla chromatografována preparativní TLC (cHx:To:Et<sub>2</sub>NH 45:45:10; vyvíjeno 3x),

separováno 9 zón a z osmé zóny izolován epoxyambellin. Frakce 145-147 byla chromatografována preparativní TLC (To:EtOAc:Et<sub>2</sub>NH 55:40:5; vyvíjeno 2x) a separováno 5 zón. Ze třetí zóny byl izolován vittatin, ze čtvrté nerbowdin a z páté zóny *O*-acetylylkorin. Frakce 148-150 byla krystalizována v EtOH a získán krinin.

**Tabulka 5: přehled získaných podfrakcí**

spojené frakce	složení eluční směsi	hmotnost (g)
<b>1-7</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	-
<b>8-12</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	0,125
<b>13-25</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	-
<b>26-28</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	1,7967
<b>29-32</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (70:30)	0,9382
<b>33-34</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (70:30)	1,3368
<b>35</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (70:30)	0,6105
<b>36</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (65:35)	0,476
<b>37</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (65:35)	1,3309
<b>38</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (65:35)	0,4694
<b>39-41</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (65:35)	5,207
<b>42</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (65:35)	0,0988
<b>43-52</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (60:40)	0,0043
<b>53-56</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (60:40)	-
<b>57-58</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (55:45)	0,0097
<b>59-65</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (55:45)	-
<b>66</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (50:50)	0,0654
<b>67-71</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (50:50)	0,0968
<b>72-76</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (50:50)	0,446
<b>77-80</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (45:55)	0,446
<b>81-84</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (45:55)	3,1118
<b>85-92</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (35:65)	0,7163
<b>93-96</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (30:70)	0,4979
<b>97-100</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (30:70)	0,188
<b>101-104</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (25:75)	0,1028
<b>105-108</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (25:75)	0,1223
<b>109-112</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (25:75)	0,1665
<b>113-116</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (20:80)	0,5083
<b>117-120</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (15:85)	0,655
<b>121-124</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (15:85)	0,8013
<b>125-128</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (15:85)	1,3403
<b>129-132</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (10:90)	1,054
<b>133-136</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (10:90)	1,0928
<b>137-140</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (10:90)	1,2146
<b>141-144</b>	benzin:CHCl <sub>3</sub> (10:90)	1,1563
<b>145-147</b>	CHCl <sub>3</sub> :EtOH (99:1)	1,1146
<b>148-150</b>	CHCl <sub>3</sub> :EtOH (99:1)	6,2905
<b>151</b>	CHCl <sub>3</sub> :EtOH (99:1)	6,3797
<b>152</b>	CHCl <sub>3</sub> :EtOH (50:50)	7,7306
<b>153</b>	CHCl <sub>3</sub> :EtOH (50:50)	1,4782
<b>154-157</b>	CHCl <sub>3</sub> :EtOH (50:50)	

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CD	církulární dichroizmus
d1	doha před skeny
DCM	dichlormethan
DMSO	dimethylsulfoxid
Hz	Hertz
IR	infračervená spektroskopie
MS	hmotnostní spektrometrie
MTPA	$\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)fenyloctová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOE	nukleární Overhauserův efekt
ORD	optická rotační disperze
str.	strana
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
UV	ultrafialová spektroskopie



„Na světě je dnes už tolik knih, že při příští potopě Bůh pravděpodobně nepoužije vodu, ale papír.“  
Erich Maria Remarque

„Bojte se člověka, který přečetl jen jednu knihu.“  
Denis Diderot

## 7. LITERATURA

1. Arayne, M. S.; Sultana, N.; Bahadur, S. S. The Berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2007**, *20*, 83-92.
2. Korbelař, J.; Endris, Z. *Naše rostliny v lékařství*. 4. vyd. Praha: Avicenum **1973**, 493 s. ISBN 08-006-74.
3. Baloun, J.; Jahodář, L.; Leifertová, I.; Štípek, S. *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Praha: Avicenum. **1989**, 267 s. ISBN 08-083-89.
4. Hecker, U. *Stromy a keře: klíč ke spolehlivému určování - 3 znaky*. 2. vyd. Čestlice: Rebo. **2009**, 238 s. ISBN 978-80-255-0291-4.
5. Khamidov, I.; Telezhenetskaya, M. V.; Karimov, A.; Shakirov, R. Alkaloids of *Berberis vulgaris*. XII. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. **1990**, *1*, 128-129.
6. Petcu, P.; Goina, T. Extraction of alkaloids from *Berberis vulgaris*. *Planta Medica*. **1970**, *18*, 372-375.
7. Yusupov, M. M.; Karimov, A.; Lutfullin, K. L. XXXIII. Alkaloids of *Berberis vulgaris*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. **1995**, *3*, 503-504.
8. Guha, K. P.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids - a review. *Journal of Natural Products*. **1979**, *42*, 1-84.
9. Schiff, P. L. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *Journal of Natural Products*. **1983**, *46*, 1-43.
10. Schiff, P. L. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *Journal of Natural Products*. **1987**, *50*, 529-599.
11. Schiff, P. L. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *Journal of Natural Products*. **1991**, *54*, 645-749.
12. Schiff, P. L. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *Journal of Natural Products*. **1997**, *60*, 934-953.
13. Domagalina, E.; Smajkiewicz, A. Isolation of magnoflorine and columbamine from *Berberis vulgaris*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. **1971**, *28*, 81-87.
14. Doepke, W. New alkaloids from *Berberis vulgaris*. *Naturwissenschaften*. **1963**, *50*, 595.

15. Mardirossian, Z. H.; Kiryakov, H. G.; Ruder, J. P.; MacLean, D. B. Alkaloids of *Fumaria officinalis*. *Phytochemistry*. **1983**, *22*, 759-761.
16. Preisner, R. M.; Shamma, M. The spirobenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*. **1980**, *43*, 305-317.
17. Seger, CH.; Sturm, S.; Strasser, E. M.; Ellmerer, E.; Stuppner, H. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignment of benzylisoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2004**, *42*, 882-886.
18. Manske, R. H. F. Alkaloids of fumariaceous plants. XXVII. A new alkaloid, cheilanthifoline, and its constitution. *Canadian Journal of Research, Section B: Chemical Sciences*. **1940**, *18*, 100-102.
19. Soušek, J.; Guédon, D.; Adam, T.; Bochořáková, H.; Táborská, E.; Válka, I.; Šimánek, V. Alkaloids and Organic Acids Content of Eight *Fumaria* Species. *Phytochemical analysis*. **1999**, *10*, 6-11.
20. Blaskó, G.; Gula, D. J.; Shamma, M. The Phthalidenisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*. **1982**, *45*, 105-122.
21. Blasko, G.; Murugesan, N.; Hussain, S. F.; Minard, R. D.; Shamma, M. Revised structure for fumarofine, an indenobenzazepine type alkaloid. *Tetrahedron Letters*. **1981**, *22*, 3135 – 3138.
22. Yakimov, G.; Mouov, N.; Leet, J. E.; Guinaudeau, H.; Freyer, A. J.; Shamma, M. Bulgaramine, a new indenobenzazepine alkaloid. *Journal of Natural Products*. **1984**, *47*, 1048-1049.
23. Sengul, M.; Yildiz, H.; Gungor, N.; Cetin, B.; Eser, Z.; Ercisli, S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2009**, *22*, 102-106.
24. Torck, M.; Pinkas, M.; Bezanger-Beauquesne, L. The flavone heterosides of the fumitory. *Fumaria officinalis* L., Fumariaceae. *Annales pharmaceutiques francaises*. **1971**, *29*, 591-596.
25. Peeters, A. J.; Dijkmans, B. A.; Schroeff, J. G. Fumaric acid therapy for psoriatic arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *British journal of rheumatology*. **1992**, *31*, 502-504.
26. Soušek, J.; Valešová, M. Obsahové látky rostlin rodu *Fumaria*. *Chemické listy*. **1995**, *89*, 489-500.
27. Rijn, R. M.; Rhee, I. K.; Verpoorte, R. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Research*. **2010**, *24*, 222-225.

28. Cahlíková, L.; Zavadil, S.; Macáková, K.; Valterová, I.; Kulhánková, A.; Hošťálková, A.; Kuneš, J.; Opletal, L. Isolation and Cholinesterase Activity of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Communications*. **2011**, *6*, 1827-1830.
29. Will, G. *Encyclopedia of exotic plants for temperate climates*. Portland: Timber Press. **2007**, 440 s. ISBN 978-0-88192-785-6.
30. Lyle, R. E.; Kielar, E. A.; Crowder, J. R.; Wildman, W. C. The Alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Wats. and *Crinum moorei* J. D. Hook. *Journal of the American Chemical Society*. **1960**, *82*, 2620-2625.
31. Naegeli, P.; Warnhoff, E. W.; Fales, H. M.; Lyle, R. E.; Wildman, W. C. Ambelline. *Journal of Organic Chemistry*. **1963**, *28*, 206-10.
32. Slabaugh, M. R.; Wildman, W. C. 6-hydroxybuphanidrine and 6-hydroxypowelline. *Journal of Organic Chemistry*. **1971**, *36*, 3202-3207.
33. Rhee, I. K.; Appels, N.; Hofte, B.; Karabatak, B.; Erkelens, C.; Stark, L. M.; Flippin, L. A.; Verpoorte, R. Isolation of the Acetylcholinesterase Inhibitor Ungeremine from *Nerine bowdenii* by Preparative HPLC Coupled On-Line to a Flow Assay System. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27*, 1804-1809.
34. Potapov, V. M. *Stereochemie*. 1. vydání, Praha: Nakladatelství technické literatury. **1986**, 692 s. ISBN 04-617-86.
35. McMurry, J. *Organická chemie*. 1. vyd. V Brně: VUTIUM. **2007**, 1176 s. ISBN 978-80-214-3291-8.
36. Clerc, J. T.; Pretsch, E.; Seibl, J. *Structural Analysis of Organic Compounds*. Budapest: Akadémiai Kiadó. **1981**, 288 s. ISBN 963-05-2297-7.
37. Lindel, T.; Junker, J.; Köck, M. COCON: From NMR Correlation Data to Molecular Constitutions. *Journal of Molecular Modeling*. **1997**, *3*, 364-368.
38. Lindel, T.; Junker, J.; Köck, M. 2D-NMR-Guided Constitutional Analysis of Organic Compounds Employing the Computer Program COCON. *European Journal of Organic Chemistry*. **1999**, 573-577.
39. Eisenreich, W.; Bacher, A. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry*. **2007**, *68*, 2799-2815.
40. De Dios, A. C. Ab initio calculations of the NMR chemical shift. *Journal of Progress in Nuclear Magnetic Spectroscopy*. **1996**, *29*, 229-278.

41. Jameson, C. J. The dynamic and electronic factors in isotope effects on NMR parametrs. *Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences*. **1991**, 2, 1-49.
42. Ullah, S.; Zhang, W.; Hansen, P. E. Deuterium isotope effects on <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shifts of intramolecularly hydrogen-bonded enamincarbonyl derivatives of Meldrum's and Tetronic acid. *Journal of Molecular Structure*. **2010**, 976, 377-391.
43. Sugimori, K.; Kawabe, H. Theoretical Study of NMR Chemical Shift Induced by H/D Isotope Effect. *International Journal of Quantum Chemistry*. **2010**, 110, 2989-2995.
44. Lambert, J. B.; Greifenstein, L. G. Stereochemical dependence of the chemical-shift isotope effect. *Journal of the American Chemical Society*. **1973**, 95, 6150-6152.
45. Perrin, Ch. L.; Karri, P. Position-Specific Secondary Deuterium Isotope Effects on Basicity of Pyridine. *Journal of the American Chemical Society*. **2010**, 132, 12145-12149.
46. Perrin, Ch. L.; Ohta, B. K.; Kuperman, J.; Liberman, J.; Erdélyi, M. Stereochemistry of  $\beta$ -Deuterium Isotope Effects on Amine Basicity. *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, 127, 9641-9647.
47. Buděšínský, M.; Pelnář, J.; Kohout, L.; Hniličková, J.; Slavíková, B. *Fyzikálně - chemické metody část 3*. 1. vyd. Praha: ÚOCHB AV ČR. **2000**, 248 s. ISBN 80-86241-07-06.
48. Parker, D. NMR Determination of Enantiomeric Purity. *Chemical Reviews*. **1991**, 91, 1441-1457.
49. Maloň, P.; Podlaha, J.; Buděšínský, M.; Kohout, L. *Fyzikálně - chemické metody část 1*. 1. vyd. Praha: ÚOCHB AV ČR. **1999**, 151 s. ISBN 80-902130-9-X.
50. DeAngelis, G. G.; Wildman, W. C. Circular dichroism studies-I a quadrant rule for the optically active aromatic chromophore in rigid polycyclic systems. *Tetrahedron*. **1969**, 25, 5099-5112.
51. Wagner, J.; Pham, H. L.; Döpke, W. Alkaloids from *Hippeastrum Equestre* Herb. -5. Circular Dichroism Studies. *Tetrahedron*. **1996**, 52, 6591-6600.
52. Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy - Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*. Oxford University Press, **1983**.

53. Pigni, N. B.; Ríos-Ruiz, S.; Martínez-Francés, V.; Nair, J. J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *Journal of Natural Products*. **2012**, *75*, 1643-1647.
54. Nair, J. J.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry*. **2005**, *66*, 373-382.
55. Chen, Ch. K.; Lin, F. H.; Tseng, L. H.; Jiang, Ch. L.; Lee, S. S. Comprehensive Study of Alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum* Assisted by HPLC-DAD-SPE-NMR. *Journal of Natural Products*. **2011**, *74*, 411-419.
56. Gözler, B.; Shamma, M.; Kiryakov, H. G.; Yakimov, G.; Mollov, N. *O*-Methylfumarophycine. *Journal of Natural Products*. **1983**, *46*, 433-435.
57. Noggle, J. H.; Schirmer, R. E. *The Nuclear Overhauser Effect*. New York: Academic press. **1971**, 259 s. ISBN 0-12-520650-X.
58. Hu, H.; Krishnamurthy, K. Revisiting the initial rate approximation in kinetic NOE measurements. *Journal of Magnetic Resonance*. **2006**, *182*, 173-177.
59. Moreno, A.; Diaz-Ortiz, A.; Diez-Barra, E.; De la Hoz, A.; Langa F.; Prieto, P.; Claridge, T. D. W. Determination of the Stereochemistry of Four Spirodiastereoisomers by One- and Two-Dimensional NOE Studies. *Magnetic resonance in chemistry*. **1996**, *34*, 52-58.
60. Stott, K.; Keeler, J.; Van, Q. N.; Shaka, A. J. One-Dimensional NOE Experiments Using Pulsed Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance*. **1997**, *125*, 302-324.
61. Dale, J. A.; Mosher, H. S. Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, *O*-Methylmandelate, and  $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters. *Journal of the American Chemical Society*. **1973**, *95*, 512-519.
62. Omata, K.; Fujiwara, T.; Kabuto, K. Use of a diamagnetic lanthanide complex for extending the scope of NMR determination of absolute configuration by the modified Mosher's method. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2002**, *13*, 1655-1662.
63. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. High-Field FT NMR Application of Mosher's Method The Absolute Configurations of marine Terpenoids. *Journal of the American Chemical Society*. **1991**, *113*, 4092-4096.

64. Latypov, S. K.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. MTPA vs MPA in the Determination of the Absolute Configuration of Chiral Alcohols by  $^1\text{H}$  NMR. *Journal of Organic Chemistry*. **1996**, *61*, 8569-8577.
65. Zhang, P.; Bao, B.; Dang, H. T.; Hong, J.; Lee, H. J.; Yoo, E. S.; Bae, K. S.; Jung, J. H. Anti-inflammatory Sesquiterpenoids from a Sponge-Derived Fungus *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*. **2009**, *72*, 270-275.
66. Yang, H.; Cho, H. J.; Sim, S. H.; Chung, Y. K.; Kim, D. D.; Sung, S. H.; Kim, J.; Kim, Y. Ch. Cytotoxic terpenoids from *Juglans sinensis* leaves and twigs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2012**, *22*, 2079-2083.
67. Pan, L.; Yong, Y.; Deng, Y.; Lantvit, D. D.; Ninh, T. N.; Chai, H.; Carcache de Blanco, E. J.; Soejarto, D. D.; Swanson, S. M.; Kinghorn, A. D. Isolation, Structure Elucidation, and Biological Evaluation of 16,23-Epoxycurbitacin Constituents from *Eleaocarpus chinensis*. *Journal of Natural Products*. **2012**, *75*, 444-452.
68. Ge, H. M.; Zhang, W. Y.; Ding, G.; Saparpakorn, P.; Song, Y. Ch.; Hannongbuac, S.; Tan, R. X. Chaetoglobins A and B, two unusual alkaloids from endophytic *Chaetomium globosum* culture. *Chemical Communication*. **2008**, 5978-5980.
69. McCreary, M. D.; Lewis, D. W.; Wenick, D. L.; Whitesides, G. M. The Determination of Enantiomeric Purity Using Chiral Lanthanide Shift Reagents. *Journal of the American Chemical Society*. **1974**, *96*, 1038-1054.
70. Duddeck, H.; Díaz Gómez, E. Chiral Recognition of Ethers by NMR Spectroscopy. *Chirality*. **2009**, *21*, 51-68.
71. Ghosh, I.; Zeng, H.; Kishi, Y. Application of Chiral Lanthanide Shift Reagents for Assignment of Absolute Configuration of Alcohols. *Organic letters*. **2004**, *6*, 4715-4718.
72. Sweeting, L. M.; Crans, D. C.; Whitesides, G. M. Determination of Enantiomeric Purity of Polar Substrates with Chiral Lanthanide NMR Shift Reagents in Polar Solvents. *Journal of Organic Chemistry*. **1987**, *52*, 2273-2276.
73. Karplus, M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society*. **1963**, *85*, 2870-2871.
74. Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R. Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods. *Chemical Reviews*. **2007**, *107*, 3744-3779.

75. Contreras, R. H.; Peralta, J. E. Angular dependence of spin–spin coupling constants. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **2000**, *37*, 321-425.
76. <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-05-3j.htm> [cit. 23. 5. 2014]
77. Cheng, Z.; Wu, F.; Sheng, L.; Gu, M.; Li, Y. Y.; Zhang, L. N.; Li, J. Y.; Li, J.; Chen, A. F.; Zhang, H. K.; Hu, L. H. 8,8-Dimethyldihydroberberine with improved bioavailability and oral efficacy on obese and diabetic mouse models. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2010**, *18*, 5915 - 5924.
78. Cava, M. P.; Wakisaka, K.; Noguchi, I.; Edie, D. L. Phlebicine, a New Bisphenylbisbenzylisoquinoline Alkaloid from *Crematosperma polyphlebium*. *Journal of The Organic Chemistry*. **1974**, *39*, 3588-3591.
79. Hussain, S. F.; Siddiqui, M. T.; Shamma, M. Berbidine: a simple isoquinoline-isoquinolone dimer. *Journal of Natural Products*. **1989**, *52*, 317-319.
80. Hošťálková, A.; Novák, Z.; Pour, M.; Jirošová, A.; Opletal, L.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Berbanine: a New Isoquinoline-isoquinolone Alkaloid from *Berberis vulgaris* (Berberidaceae). *Natural Product Communications*. **2013**, *4*, 441-442.
81. Blank, N.; Opatz, T.: Enantioselective Synthesis of Tetrahydroprotoberberines and Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from a Deprotonated  $\alpha$ -Aminonitrile. *The Journal of Organic Chemistry*. **2011**, *76*, 9777-9784.
82. By Leet, J.E.; Elango, V.; Hussain, S.F.; Shamma, M. Chenabine and jhelumine: secobisbenzylisoquinolines or simple isoquinoline-benzylisoquinoline dimers? *Heterocycles*. **1983**, *20*, 425-429.
83. Kawabata, Y.; Naito, Y.; Saitoh, T.; Kawa, K.; Fuchigami, T.; Nishiyama, S. Synthesis of (+)-O-Methylthalibrine by Employing a Stereocontrolled Bischler–Napieralski Reaction and an Electrochemically Generated Diaryl Ether. *European Journal of Organic Chemistry*. **2014**, 99-104.
84. Pfeifer, S.; Kuehn, L. Papaver alkaloids. XXVI. Papaver caucasicum, P. persicum, P. triniaefolium, P. fugax, and P. polychaetum. 2. Phenolic bases *Pharmazie*. **1968**, *23*, 267-281.
85. Wang, Y.Ch.; Georghiou, P.E. First enantioselective total synthesis of (-)-Tejedine. *Organic letters*. **2002**, *4*, 2675-2678.

86. Suau, R.; Rico, R.; Lopez-Romero, J.M.; Nájera, F.; Cuevas, A. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* subsp. *australis*. *Phytochemistry*. **1998**, *49*, 2545-2549.
87. Thevand, A.; Stanculesu, I.; Mandravel, C.; Woisel, P.; Surpateanu, G. Total assignment and structure in solution of tetrandrine by NMR spectroscopy and molecular modelling. *Spectrochimica acta part A*. **2004**, *60*, 1825-1830.
88. Košťálová, D.; Uhrín, D.; Hrochová, V.; Tomko, J. A new bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Collection Czechoslovak Chemical Communication*. **1987**, *52*, 242-246.
89. Koike, L.; Marsaioli, A.J.; Reis, F.A.M. Carbon-13 nuclear magnetic Resonance Spectroscopy and conformational analysis of the Daphnoline-Repandine class of bis(benzylisoquinoline) alkaloids. *Journal of Organic Chemistry*. **1982**, *47*, 4351-4353.
90. Kashiwaba, N.; Morooka, S.; Kimura, M. et al. A Chemistry of bisbenzylisoquinoline alkaloid: isomeration of berbamine to penduline in methanol by radical reaction. *Heterocycles*. **1995**, *41*, 2043
91. Dostál, J.; Man, S.; Sečkářová, P.; Hulová, D.; Nečas, M.; Potáček, M.; Toušek, J.; Dommissé, R.; Dongen, W. V.; Marek, R. Berberine and coptisine free bases. *Journal of Molecular Structure*. **2004**, *687*, 135-142.
92. Marek, R.; Sečkářová, P.; Hulová, D.; Marek, J.; Dostál, J.; Sklenář, V. Palmatine and Berberine Isolation Artifacts. *Journal of Natural Products*. **2003**, *66*, 481-486.
93. Blaskó, G.; Hussain, S. F.; Shamma, M. Why do all spirobenzylisoquinoline alkaloids incorporate a methylenedioxy substituent on ring D. *Journal of the American Chemical Society*. **1982**, *104*, 1599-1602.
94. Zhang, G. L.; Ruecker, G.; Breitmaier, E.; Mayer, R. Alkaloids from *Hypecoum leptocarpum*. *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 1813-1816.
95. Bozhadze, A.; Mshvildadze, V.; Vachnadze, V.; Tsitsishvili, V.; Bakuridze, A. ANALYTICAL STUDIES OF (+)-CHELIDONINE, PROTOPINE, AND *l*-STYLOPINE IN *Chelidonium majus* GROWING IN GEORGIA USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Chemistry of Natural Compounds*. **2011**, *47*, 477-480.
96. Miyazawa, M.; Yoshio, K.; Ishikawa, Y.; Kameoka, H. Insecticidal Alkaloids from *Corydalis bulbosa* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, *46*, 1914-1919.



97. Slavík, J.; Slavíková, L. Alkaloids from *Corydalis nobilis* (L.) PERS. and *C. intermedia* (L.) MERAT. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **1989**, *54*, 2009-2020.
98. Dai-Ho, G.; Mariano, P. S. Exploratory, Mechanistic, and Synthetic Aspects of Silylarene-Iminium Salt SET Photochemistry. Studies of Diradical Cyclization Processes and Applications to Protoberberine Alkaloid Synthesis. *Journal of Organic Chemistry*. **1988**, *53*, 5113-5127.
99. Niu, X. F.; Xu, H. B.; Liu, X.; Fan, T.; Qi, L. Isoquinoline alkaloids from *Corydalis impatiens*. *Chemistry of Natural Compounds*. **2013**, *49*, 187-189.
100. Wangchuk, P.; Bremner, J. B.; Samten; Rattanajak, R.; Kamchonwongpaisan, S. Antiplasmodial Agents from the Bhutanese Medicinal Plant *Corydalis calliantha*. *Phytotherapy research*. **2010**, *24*, 481-485.
101. Wang, X.; Dong, H.; Shu, X.; Zheng, Z.; Yang, B.; Huang, L. Large-Scale Separation of Alkaloids from *Corydalis bungeana* Turcz. by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography. *Molecules*. **2012**, *17*, 14968-14974.
102. MacLean, D. B.; Bell, R. A.; Saunders, J. K.; Chen, C. Y. Structures of three minor alkaloids of *Fumaria officinalis* L. *Canadian Journal of Chemistry*. **1969**, *47*, 3593-3599.
103. Taborska, E.; Bochorakova, H.; Sousek, J.; Sedmera, P.; Vavreckova, C.; Simanek, V. *Fumaria densiflora* DC. ALKALOIDS. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **1996**, *61*, 1064-1072.
104. Kiryakov, H. G.; Hughes, D. W.; Nalliah, B. C.; MacLean, D. B. Fumaritine *N*-oxide, an alkaloid of *Fumaria kralikii* Jord. *Canadian Journal of Chemistry*. **1979**, *57*, 53-55.
105. Kishimoto, T.; Uyeo, S. The Synthesis of the Alkaloids ( $\pm$ )-Fumaritine and Fumariline. *Journal of the Chemical Society C*. **1971**, 1644-1647.
106. Pandey, V. B.; Ray, A. B.; Dasgupta, B. Minor alkaloids of *Fumaria indica* seeds. *Phytochemistry*. **1979**, *18*, 695-696
107. Israilov, I. A.; Yunusov, M. S.; Yunusov, S. Yu. Structure of parfumidine. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. **1970**, *6*, 518.
108. Rahman, A.; Bhatti, M. K.; Akhtar, F.; Choudhary, M. I. Alkaloids of *Fumaria indica*. *Phytochemistry*. **1992**, *31*, 2869-2872

109. Rozwadowska, M. D.; Matecka, D. Synthetic and Stereochemical Studies on Phthalideisoquinoline Hemiacetals. *Liebigs Annalen der Chemie*. **1991**, *3*, 287-289.
110. Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Mathee, S.; Campbell, W. E. Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry*. **1995**, *40*, 961-965.
111. Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C.; Campbell, W. E.; Mathee, S. Alkaloids from *Boophane flava*. *Phytochemistry*. **1995**, *40*, 307-311.
112. Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C.; Campbell, W. E.; Mathee, S. Alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry*. **1994**, *35*, 809-812.
113. Machocho, A.; Chhabra, S. C.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. Alkaloids from *Ammochris tinneana*. *Phytochemistry*. **1999**, *51*, 1185-1194.
114. Fales, H. M.; Wildman, W. C. Structure and Stereochemistry of Buphanamine. *Journal of Organic Chemistry*. **1961**, *26*, 881 - 886.
115. Osorio, E. J.; Berkov, S.; Brun, R.; Codina, C.; Viladomat, F.; Cabezas, F.; Bastida, J. In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters*. **2010**, *3*, 161-163.
116. Lamoral-Theys, D.; Andolfi, A.; Goietsenoven, G. Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid,... *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, *52*, 6244-6256.
117. Cedrón, J. C.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Ravelo, Á. G.; Estévez-Braun, A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2010**, *18*, 4694-4701.
118. Miyakado, M.; Kato, T.; Ohno, N.; Koshimizu, K. Alkaloids of *Urginea altissima* and their antimicrobial activity against *Phytophthora capsici*. *Phytochemistry*. **1975**, *14*, 2717.
119. Crain, W. O.; Wildman, W. C.; Roberts, J. D. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Carbon-13 Spectra of Nicotine, Quinine, and Some *Amaryllidaceae* Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*. **1971**, *93*, 990-994.
120. Hošťálková, A. Dizertační práce. v tisku.

## 8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

1. Novák, Z.; Chlebek, J.; Opletal, L.; Jiroš, P.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Corylucinine, a new Alkaloid from *Corydalis cava* (Fumariaceae), and its Cholinesterase Activity. *Natural Product Communications*. **2012**, 7, 859-860. (IF 0,956)
2. Hošťálková, A.; Novák, Z.; Pour, M.; Jirošová, A.; Opletal, L.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Berbanine: a New Isoquinoline-isoquinolone Alkaloid from *Berberis vulgaris* (Berberidaceae). *Natural Product Communications*. **2013**, 8, 441-442. (IF 0,956)
3. Cahlíková, L.; Ločárek, M.; Benešová, N.; Kučera, R.; Chlebek, J.; Novák, Z.; Opletal, L. Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Narcissus* Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. *Natural Product Communications*. **2013**, 8, 781-785. (IF 0,956)
4. Špulák, M.; Novák, Z.; Palát, K.; Kuneš, J.; Pourová, J.; Pour, M. The unambiguous synthesis and NMR assignment of 4-alkoxy and 3-alkylquinazolines. *Tetrahedron*. **2013**, 69, 1705-1711. (IF 3,025)
5. Karabanovich, G.; Roh, J.; Padělková, Z.; Novák, Z.; Vávrová, K.; Hrabálek, A. One-pot synthesis of 1-substituted-5-alkylselanyl-1*H*-tetrazoles from isoselenocyanates: unexpected formation of *N*-alkyl-*N*-arylcyanamides and (*Z*)-*Se*-alkyl-*N*-cyano-*N,N'*-diarylisoselenoureas. *Tetrahedron*. **2013**, 69, 8798-8808. (IF 3,025)
6. Cahlíková, L.; Hrabínová, M.; Kulhánková, A.; Benešová, N.; Chlebek, J.; Jun, D.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Kučab, K.; Opletal, J. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. *Natural Product Communications*. **2013**, 11, 1541-1544. (IF 0,956)
7. Šafratová, M.; Novák, Z.; Kulhánková, A.; Kuneš, J.; Hrabínová, M.; Jun, D.; Macáková, K.; Opletal, J.; Cahlíková, L. Revised NMR Data for 9-*O*-Demethylgalanthine: an Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and

- its Biological Activity. *Natural Product Communications*. **2014**, 9, 787-788. (IF 0,956)
8. Kulhánková, A.; Cahlíková, L.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Opletal, L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chemistry&Biodiversity*. **2013**, 10, 1120-1127. (IF 1,808)
  9. Hošťálková, A.; Opletal, L.; Kuneš, J.; Novák, Z.; Hrabínová, M.; Chlebek, J.; Cahlíková, L. Alkaloids from *Peumus boldus* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibition Activity. *Natural Product Communications*. **2014**, 9, 1-2. (IF 0,956)
  10. Chlebek, J.; Novák, Z.; Kassemová, D.; Šafratová, M.; Kostelník, J.; Malý, L.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Novotná, P.; Urbanová, M.; Nováková, L.; Macáková, K.; Hulcová, D.; Solich, P.; Martín, C. P.; Jun, D.; Cahlíková, L. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chemistry&Biodiversity*. **2015** (v tisku) (IF 1,808)
  11. Novák, Z.; Hošťálková, A.; Opletal, L.; Nováková, L.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. (+)-Chenabinol (Revised NMR Data) and Two New Alkaloids from *Berberis vulgaris* L. and their Biological Activity. *Natural Product Communications*. **2015** (v tisku) (IF 0,956)

*„Člověk, který nikdy neplakal, nežil opravdový život!“*  
Jan Werich

**KONEC**