

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové



**VYUŽITÍ NMR SPEKTROSKOPIE PŘI STRUKTURNÍ
ANALÝZE LÁTEK IZOLOVANÝCH Z BERBERIS VULGARIS
L. A NARCISSUS POETICUS CV. PINK PARASOL**

(rigorózní práce)

Hradec Králové, 2016

Anežka Hordějčuková

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Poděkování

Za všestrannou a obětavou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracovávání rigorózní práce i za motivaci a nezapomenutelnou atmosféru v laboratoři NMR děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Zdeňku Novákovi, PhD.

Za izolaci a zpracování vzorků děkuji Mgr. Marcele Šafratové, PharmDr. Anně Hošťálkové, PhD. a Ing. Lucii Cahlíkové, PhD.

Za podporu a péči děkuji svému manželovi.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát:	Anežka Hordějčuková
Školitel:	doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.
Název rigorózní práce:	Využití NMR spektroskopie při strukturní analýze látek izolovaných z <i>Berberis vulgaris</i> L. a <i>Narcissus poeticus</i> cv. Pink Parasol

Rigorózní práce je věnována určení struktury tří neznámých látek izolovaných z přírodních zdrojů.

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové byla z rostliny *Berberis vulgaris* z čeledi Berberidaceae i z rostliny *Narcissus poeticus* z čeledi Amarillidaceae izolována celá řada alkaloidů.

Mnohé z nich byly předány do NMR laboratoře s žádostí o provedení strukturní analýzy.

Cílem diplomové práce byla indentifikace dvou neznámých vzorků izolovaných z rostliny *Berberis vulgaris* (s kódovými označeními vzorků B11 a HA 2) a jednoho vzorku izolovaného z rostliny *Narcissus poeticus* vc. Pink Parasol (pod kódovým označením NP - D - 4/3) pomocí NMR analýzy.

U neznámých sloučenin byla na základě provedených NMR experimentů (^1H NMR, ^{13}C NMR, gHSQC, gHMBC, gCOSY, NOESY) určena jejich struktura.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Anežka Hordějčuková

Supervisor: doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.

Title of Diploma Thesis: Use of the NMR Spectroscopy for Structural Analysis of the Substances Isolated from *Berberis vulgaris* L. and *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol

This rigorous thesis deals with determination of three unknown substances structure isolated from natural sources.

A great many alkaloids from the plant *Berberis vulgaris* from the Berberidaceae family and *Narcissus poeticus* from the Amarillidaceae family has been isolated in the Department of Pharmaceutical Botany and Ecology at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

A lot of them were passed to the NMR laboratory, requesting a structure analysis.

The aim of this thesis was to identify two unknown chemical formulas isolated from the plant *Berberis vulgaris* (with code B11 and HA2) and one chemical formula isolated from the plant *Narcissus poeticus* cv. *Pink Parasol* (code NP-D-4/3) with the help of NMR analysis.

The unknown compounds were determined on the basis of NMR experiments (^1H NMR, ^{13}C NMR, gHSQC, gHMBC, gCOSY, NOESY).

Obsah:

1. Úvod a cíl	2
2. Teoretická část	3
2.1. Berberis vulgaris L.....	3
2.1.1. Obsahové látky	4
2.2. Narcissus poeticus.....	7
2.2.1. Obsahové látky a jejich účinky.....	7
3. Experimentální část	11
3.1. Izolace	11
3.2. NMR experimenty	11
3.3. Přístrojové vybavení	14
4. Výsledky s komentářem	15
4.1. B11	15
4.2. HA2.....	27
4.3. NP - D - 4/3.....	41
5. Závěr	50
6. Seznam literatury	51
7. Seznam příloh	53

1. Úvod a cíl

Nukleární magnetická resonance (NMR) patří mezi nejsložitější analytické metody využívané při analýze organických i anorganických sloučenin. Využívá se mj. při ověřování struktury látek syntetizovaných v chemické laboratoři, rovněž i při určování struktury látek izolovaných z přírodních zdrojů, což je také předmětem této rigorózní práce.

Od dob svého vzniku už tato metoda prodělala značný vývoj. V současné době hojně využíváme jak 1D, tak i 2D experimenty a rozvoj metody s četností jejího využití pochopitelně stále pokračuje. Směřuje k 3D spektrům, NMR-imagingu a ke kombinovaným metodám.

Na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové je NMR spektroskop umístěn na Katedře anorganické a organické chemie. Využívá se k analýze látek syntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie a Katedře farmaceutické chemie. Dále slouží k analýze obsahových látek rostlin izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

K práci v NMR laboratoři patří jednak obsluha NMR spektroskopu a jednak analýza a interpretace naměřených spekter, která vede k potvrzení či vyvrácení předpokládané struktury vzorku v případě chemické syntézy či k tvorbě chemické struktury v případě přírodní látky, dále k určení čistoty či právě naopak nežádoucího znečištění vzorků, k NMR stanovení enantiomerní čistoty, atd.

Tato práce mapuje především analýzu a interpretaci naměřených spekter z NMR laboratoře. Tato činnost probíhá již nezávisle na NMR laboratoři. Jde o to, že je třeba nastudovat detailně jak jednotlivá spektra, tak hlavně propojit informace ze všech experimentů, neboť jedině tak lze s určitostí dosáhnout cíle. Každé spektrum totiž poskytuje jiné informace a teprve díky celkovému kontextu všech experimentů získáme výslednou představu o zkoumané molekule.

Cílem této rigorózní práce byla analýza tří neznámých látek izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Jedná se o alkaloidy, z nichž dva byly izolovány z rostliny *Berberis vulgaris* L. a jedna z rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol. Pro účely analýzy byly látky označeny kódy HA2, B11 a NP - D - 4/3. Pod těmito kódovými označeními jsou popisovány i v této práci.

2. Teoretická část

2.1. *Berberis vulgaris* L.



Berberis vulgaris L. - Dřišťál obecný je rostlinou rodu *Berberis* z čeledi *Berberidaceae* (dřišťálovité). Je jediným domácím druhem dřišťálu v ČR.

Jedná se o opadavý, hustě větvený trnitý keř, dorůstající výšky až 3 m, rozšířený od středozeví po mírný pás Evropy a Asie. Roste hojně na okrajích lesů, na pasekách, luzích, podél cest, na mezích, atd. Je také pěstován jako okrasná rostlina a využíván v zahradách a v parcích do živých plotů^{1, 2, 3, 4}.

Má hladkou kůru, podlouhlé vejčité listy vyrůstající v paždí krátkých výhonků, podepřené 1 - 2 cm dlouhými trny palistového původu. Oboupohlavné žluté květy jsou v převislých hroznech s dráždivými tyčinkami. Kvete od dubna do června. Plodem jsou 8 - 10 mm dlouhé, elipsoidní, lesklé červené bobule s 1 - 3 semeny, kyselé chuti a bohaté na vitamíny^{1, 2, 3, 4}.

Ve fytoterapii se používají hlavně kořeny (*Radix berberidis vulgaris*) a kořenová kůra (*Cortex radices berberidis vulgaris*) dřišťálu, díky obsahovým látkám se pak tato droga lidově využívá jako spasmolytikum, cholagogum, diuretikum (při chorobách ledvin, ledvinových kamenech, zánětech močových cest), stimulans nervového systému. Kůra má příznivý účinek na cévní systém. Alkaloid berberin obsažený téměř ve všech částech rostliny vykazuje silné protizánětlivé účinky na celou řadu mikroorganismů. Odvar z listů se užíval jako klotadlo při zánětech dásní a dutiny ústní či k obkladům při zánětech očí. Berberin také stimuluje imunitní systém a působí jako antioxidant. Při podání nepřiměřeného množství může dojít k předávkování, kdy následkem porážení centrální nervové soustavy může nastat ochrnutí dýchacího a vasomotorického centra, omámení, zvracení a průjem^{1, 2, 3, 4, 5}.

V současné době jsou alkaloidy berberisu zkoumány pro svůj možný inhibiční účinek na enzym acetylcholinesterasu a jejich potenciální využití v léčbě Alzheimerovy choroby.

Jednou částí rostliny, která není považována za jedovatou jsou plody (*Fructus berberidis vulgaris*), neboť neobsahují alkaloidy. Obsahují vitamin C a organické kyseliny. Sbírají je ptáci a lidé je využívají v homeopatii či k přípravě čajů, kompotů s šťáv^{1, 2, 3, 4}.

Pro krásnou žlutou barvu a tvrdost je dřevo dřeváku využíváno v řezbářství. Barvivo také sloužilo k barvení kůže a vlny⁶.

2.1.1. Obsahové látky

Všechny části rostliny (vyjma plodů) obsahují alkaloidy. Nejvyšší množství alkaloidů obsahuje kořenová kůra - až 4 %. Nejvíce jsou zastoupeny alkaloidy ze skupiny protoberberinové (berberin **1**, jatrorrhizin **2**, kolumbamin **3**, palmatin **4**, berberrudin **5**, 8 - oxoberberin **6**, lambertin **7**)^{5,7}. benzylochinolinové (yuziphin **8**)⁷ a bisbenzylochinolinové (berbamunin **9**, oxycanthin **10**, berbamin **11**)^{5,7}.

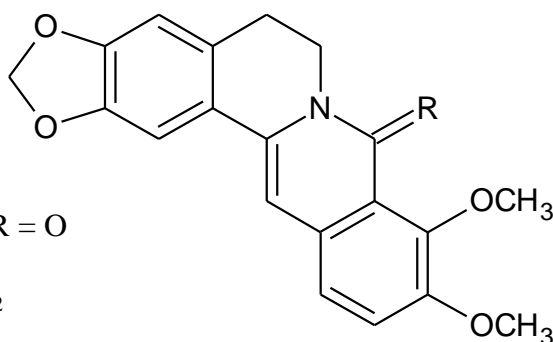
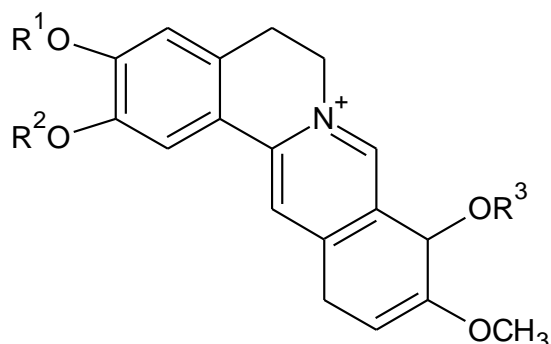
1 berberin: $R^1 + R^2 = \text{CH}_2 -$, $R^3 = \text{CH}_3$

2 jatrorrhizin: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{CH}_3$

3 kolumbamin: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

4 palmatin: $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{CH}_3$

5 berberrudin: $R^1 + R^2 = \text{CH}_2 -$, $R^3 = \text{H}$

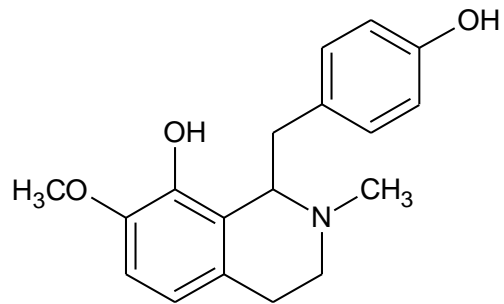


6 8 - oxoberberin: $R = \text{O}$

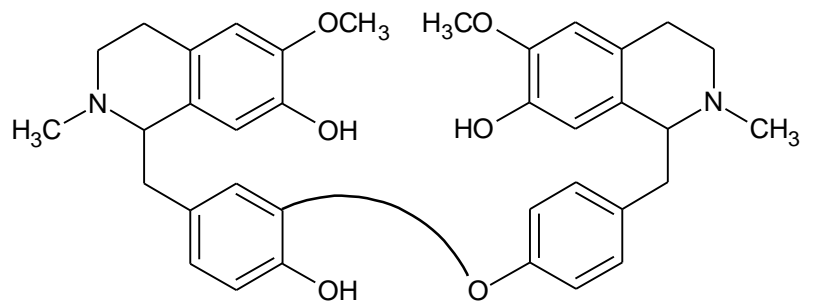
7 lambertin: $R = \text{H}_2$

Dalšími skupinami alkaloidů obsažených v *Berberis vulgaris* L. jsou alkaloidy typu benzylochinolinového (yuziphin **8**)⁷ a bisbenzylochinolinového (berbamunin **9**, oxycanthin **10**, berbamin **11**)^{5,7}.

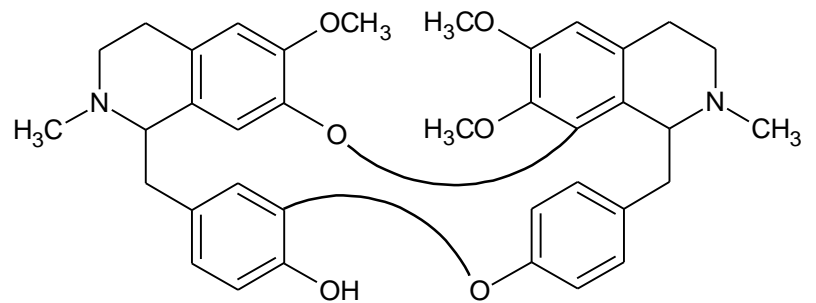
8 yuziphin



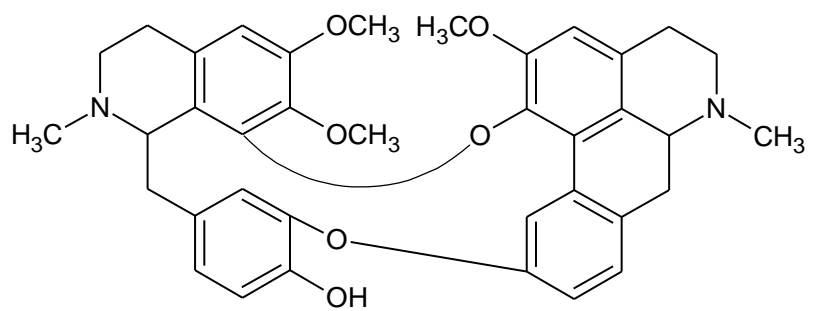
9 berbaminin



10 oxycanthin

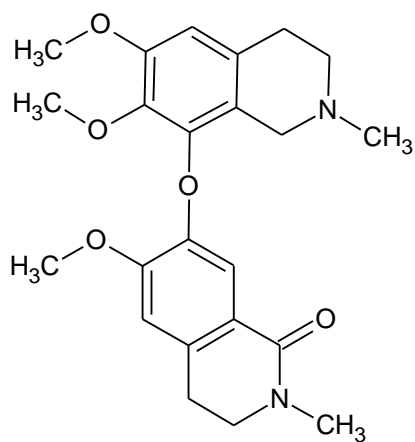


11 berbamin

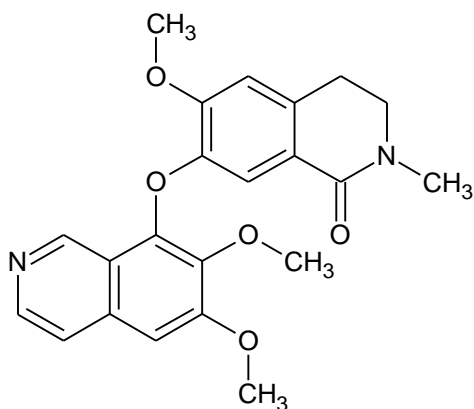


K nově popsaným patří alkalidy typu isochinolin-isochinolonového dimeru (berbidin **12**, berbanin **13**)^{8, 9, 10}.

12 berbidin



13 berbanin



2.2. *Narcissus poeticus*



Narcissus poeticus - Narcis bílý je rostlinou rodu *Narcissus* z čeledi *Amarillidaceae* (amarylkovité). Rod *Narcissus* patří mezi nejznámější cibuloviny vůbec. Existují desítky druhů narcisu a tisíce kultivarů - mimo jiné i kultivar *Pink Parasol*, z něhož byla izolována a v této práci řešena molekula s kódovým označením NP - D - 4/3.

Původním areálem rozšíření tohoto druhu je jihozápadní Evropa - od Španělska přes Řecko, Itálii až do Švýcarska - po západní část Východních Alp. V mnoha částech Evropy je běžně pěstován a často také zplaňuje. U nás se objevuje v parcích, v okolí zahrad a lidských sídel. Běžně se pěstuje a jako poměrně nenáročná okrasná rostlina existuje vyšlechtěna v řadě kultivarů¹¹.

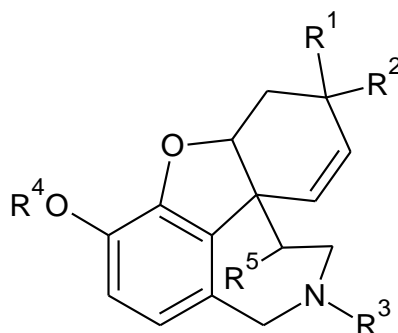
Narcissus poeticus je vytrvalá rostlina s podzemní cibulkou. Dorůstá výšky 20 - 45 cm. Listy jsou řemenovité, šedozelené, dlouhé 20 - 40 cm a široké až 6 mm, jsou ploché v průřezu a z cibule většinou vyrůstají čtyři. Na stonku se tvoří jeden vonný květ s třpytivě bílými nebo světle krémovými okvětními lístky uspořádanými do hvězdice. Pakorunka je malá, mělká, žlutá nebo oranžová s červeným vroubkovaným okrajem. *Narcissus poeticus* kvete koncem dubna až počátkem května a je tak jedním z nejpozději kvetoucích narcisů. Plodem je tobolka^{12, 13, 14, 15}.

2.2.1. Obsahové látky a jejich účinky

Narcissus poeticus, stejně jako celý rod *Narcissus* L. i obecně čeleď *Amarillidaceae* produkuje alkaloidy, které jsou zkoumány pro zajímavé farmakologické a biologické vlastnosti. Alkaloidy čeledi *Amarillidaceae* vykazují diverzitu biologických aktivit včetně protinádorové, antivirové, antibakteriální, antimykotické, antimalarické, acetylcholinesterasu inhibující a cytotoxické^{16, 17}.

Alkaloidy narcisu vykazují specifický efekt jakožto inhibitory acetylcholinesterasy (AChE). Pro tento účinek je využíván galanthamin, který je dlouze působícím, selektivním, reverzibilním a kompetitivním inhibitorem zmiňovaného enzymu. Ukázalo se, že i sanguinin jako další alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Amarillidaceae*, vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE a to dokonce desetkrát silnější než galanthamin. Ve snaze najít další alkaloidy

vykazující podobnou aktivitu jsou tedy izolovány, popisovány a testovány další přírodní alkaloidy z čeledi Amarillidaceae, rodu *Narcissus* L. i různých druhů z tohoto rodu. Studie prokázaly, že jde vysledovat souvislost s typy skeletu alkaloidů, neboť především alkaloidy typu galanthaminového (galanthamin **1**, sanguinin **2**, 11 - hydroxygalanthamin **3**, epinorgalanthamin **4**) a lycorinového (lycorin **5**, pseudolycorin **6**) vykazovaly vůči AChE značný inhibiční efekt.



1 galanthamin: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{H}$

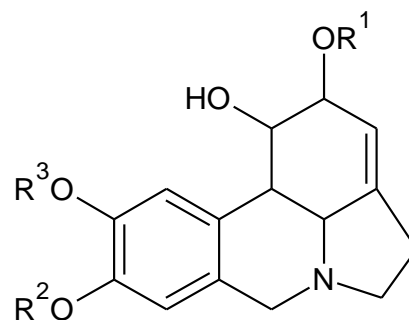
2 sanguinin: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{H}$, $R^5 = \text{H}$

3 11 - hydroxygalanthamin: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{OH}$

4 epinorgalanthamin: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$, $R^4 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{H}$

5 lycorin: $R^1 = \text{H}$, $R^2 + R^3 = \text{CH}_2$

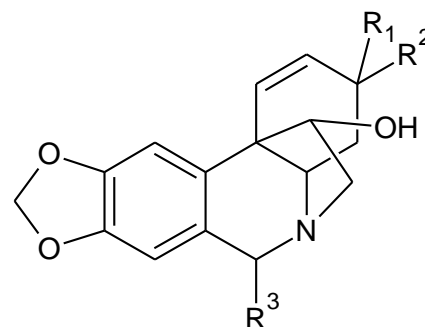
6 pseudolycorin: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$



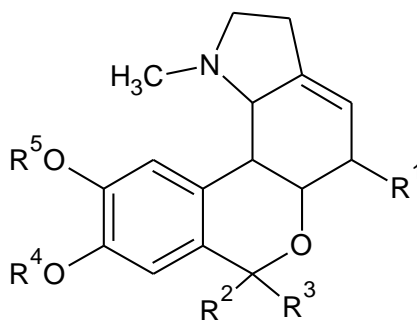
V současné době je věnována značná pozornost alkaloidům, které vykazovaly slibný protinádorový účinek. Studie, do níž je zapojena i Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, popisuje cytotoxickou aktivitu lycorinu a také dvou alkaloidů haemanthaminového typu konkrétně haemanthaminu **7** a haemanthidinu **8** proti buňkám kolorektálního adenokarcinomu¹⁷.

7 haemanthamin: $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$

8 haemanthidin: $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{OH}$

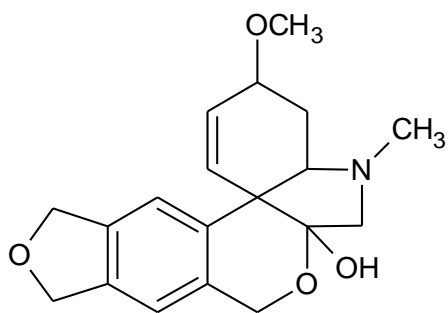


Mezi další typy alkaloidů obsažené v narcisu patří typ homolyrocinový (např. hippeastrin **9**, dubiusin **10**), tazettinový (tazettin **11** a pretazettin **12**) a miscellaneousový (mesembrenon **13**)¹⁷.

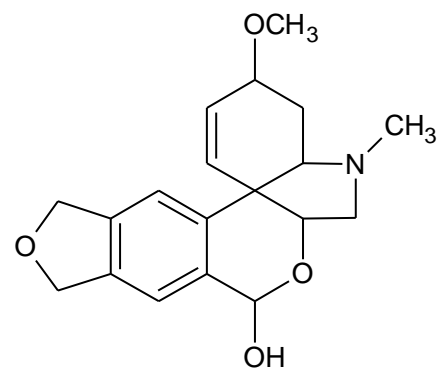


9 hippeastrin: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 + R^3 = \text{O}$, $R^4 + R^5 = \text{CH}_2$

10 dubiusin: $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 + R^3 = \text{O}$, $R^4 = \text{OCH}_3$, $R^5 = \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_3$

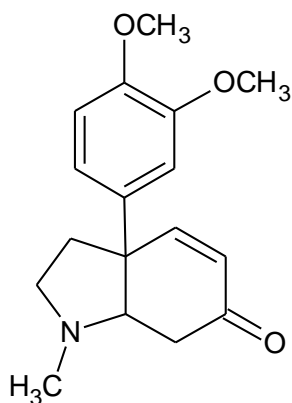


11 tazettin



12 pretazettin

13 mesembrenon



Kromě alkaloidů zkoumaných pro možné terapeutické použití, obsahuje *Narcissus poeticus* také glukomanan - ve vodě rozpustný polysacharid, který vykazuje nízkou toxicitu a hypolipidemickou aktivitu¹⁸.

Obsahuje také karotenoidy a flavonoidy nacházející se především v okvěti a korunách narcisů. Lze vysledovat vztah mezi barvou a obsahem těchto látek¹⁹.

3. Experimentální část

3.1. Izolace

Vzorky neznámých sloučenin s kódovými označeními B11, HA2 a NP - D - 4/3, které jsou předmětem této rigorózní práce, byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Vzorky z rostliny *Berberis vulgaris* L. byly izolovány PharmDr. Annou Hošťálkovou, PhD. a sloučeninu z rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol izolovala Mgr. Marcela Šafratová.

3.2. NMR experimenty

NMR experimenty lze rozdělit na jednodimenzionální a dvoudimenzionální. K první skupině patří např. ^1H a ^{13}C spektra a k druhé skupině pak mj. experimenty homonukleární gCOSY a NOESY a experimenty heteronukleární gHSQC a gHMBC. Pro účely této práce byla použita všechna výše zmíněná spektra. U homonukleárních spekter pozorujeme korelace $^1\text{H} - ^1\text{H}$, co se pak týče 2D heteronukleárních spekter, byly vždy měřeny $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ korelace.

Jednorozměrné ^1H spektrum je základním experimentem a poskytuje informace, které mohou být v případě jednoduchých sloučenin dostačující k ověření jejich struktury. V případě zkoumání složitějších molekul poskytuje toto spektrum prvotní informace o strukturních rysech a čistotě studované látky. ^1H NMR experiment poskytuje spektrum vodíkových atomů. Pro toto spektrum jsou charakteristické čtyři vlastnosti: počet signálů, chemický posun, štěpení a intenzita signálů.

Počet signálů ve spektru čisté látky odpovídá počtu neekvivalentních jader atomů vodíku měřeného vzorku.

Chemický posun vyjádřený jednotkami ppm (pars per milion) odráží vliv působení chemického okolí na konkrétní atom vodíku a popisuje polohu signálu. V případě působení destíníčního efektu na atom jeho chemickým okolím je signál atomu posunut k vyšším hodnotám ppm, v případě stínění je tomu právě naopak. Pro určení velikosti chemických posunů je vždy použit standard. V současné době jsou k dispozici rozsáhlé tabulky s hodnotami chemických posunů a lze usuzovat na možné strukturní fragmenty zkoumané látky.

Štěpení (splitting) jednotlivých signálů je způsobeno spin-spinovými interakcemi (coupling) jaderných spinů přes kovalentní vazby. Velikost těchto interakcí udávají interakční

konstanty (nese označení J , jednotkou jsou Hz), které jsou mírou interakční energie mezi jádry a které lze ve spektrech změřit jako vzdálenost mezi dvěma rameny signálu. Jednotlivé signály mají tedy v závislosti na sousedních atomech vodíku různou multiplicitu a poskytují tak informace o počtu a typu atomů vodíku v sousedních skupinách. Podle štěpení rozlišujeme singlet (s), dublet (d), triplet (t), kvartet (q), multiplet (m). Ačkoliv může být signál rozštěpený na různý počet linií, vždy zůstává zachována symetrie signálu.

Intenzita signálu je daná vytčenou plochou, kterou lze stanovit integrací. Poměrně vyjadřuje počet jader daného signálu.

Ve ^{13}C NMR spektru stejně jako ve spektru vodíkovém počet signálů odpovídá počtu neekvivalentních jader atomů. Taktéž chemický posun analogicky popisuje polohu signálů a je závislý na jejich chemickém okolí. Co se týče štěpení signálů, tak zde je situace odlišná, neboť se v ^{13}C experimentech využívá techniky tzv. širokopásmového heteronukleárního dekaplinku a výsledkem je stav, kdy signály nejsou štěpené a každý jednotlivý signál odpovídá jednomu atomu uhlíku, pokud ovšem molekula neobsahuje atom fluoru, fosforu apod. Vlivem techniky dekaplinku dochází ke zkreslení intenzit signálů a intenzita pak není kvantitativní, proto u tohoto experimentu nehraje velkou roli. Dochází také ke ztátě informace obsažené v interakční konstantě a nejsme tedy už schopni přímo rozlišit, zda se jedná o protonovaný uhlík (případně počtu nesených atomů vodíku) či kvarterní atom uhlíku (nerozlišíme signály CH_3 , CH_2 , CH a C).

Homonukleární experiment gCOSY (2D - NMR Correlation spectroscopy) je taktéž nezbytným experimentem při řešení složitějších struktur. Spektrum v obou dimenzích vyobrazuje chemické posuny atomů vodíku a poskytuje dva typy signálů: jednak diagonální písky, které odpovídají původnímu 1D NMR spektru, a jednak mimodiagonální píky (tzv. krosníky), které indikují korelace mezi různými jádry. Spektrum je symetrické podle diagonály a tak má každá korelace interagujících partnerů ve spektru dva signály (v levém horním a v pravém dolním trojúhelníku). Mimodiagonální korelace odpovídají zpravidla vzdálenosti jader přes tři vazby. Jedná se tedy o korelace atomů vodíku, jež leží na sousedících atomech uhlíku.

Velmi cenné informace při přešení struktury neznámé molekuly poskytuje spektrum NOESY (2D - NMR Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Jedná se opět o homonukleární spektrum, v němž jsou na obou osách chemické posuny atomů vodíku (1D NMR spektrum), a toto spektrum je tedy opět symetrické podle diagonály. Krosníky

indikují přímé dipolární interakce volně přes prostor, tedy nezávisle na chemických vazbách. Toto spektrum můžeme využít k přiřazení prostově blízkých atomů vodíku (využíváno i v této práci) či při konformační analýze molekul a sestavování 3D obrazu molekul.

gHSQC (2D - NMR Heteronuclear Single - Quantum Correlation Spectroscopy) je heteronukleárním experimentem, jehož spektrum není symetrické podle diagonály, neboť na jedné ose jsou chemické posuny atomů vodíku a na druhé ose jsou chemické posuny atomů uhlíku. Spektrum poskytuje přímé korelace atomů uhlíku a atomů vodíku přímo na sebe vázaných, tedy korelace přes jednu vazbu. Výsledkem je tedy připojení konkrétních atomů vodíku ke konkrétním atomům uhlíku.

Posledním a také nejvíce používaným experimentem při hledání struktury neznámé molekuly je gHMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Jde o korelované heteronukleární spektrum, kde na jedné ose jsou chemické posuny vodíků a na druhé ose jsou chemické posuny uhlíků. Ve spektru můžeme pozorovat korelace atomů přes více vazeb, nejčastěji přes tři vazby (v aromatických systémech můžeme pozorovat i korelace přes více či méně vazeb).

3.3. Přístrojové vybavení

Hmotnostní spektra vzorků byla naměřena na přístroji ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Inc., New York, USA).

NMR spektra (zahrnující 1D experimenty ^1H , ^{13}C i 2D experimenty gHMBC, gHSQC, gCOSY, gNOESY) všech zkoumaných látek byla měřena v roztocích CDCl_3 při laboratorní teplotě na přístroji VNMR S500. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v *parts per million* (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl_3 jsou u atomů ^1H $\delta = 7.26$ ppm a u atomů ^{13}C $\delta = 77.0$ ppm.

Měřeními získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a interakční konstanta (Hz).

4. Výsledky s komentářem

4.1. B11

Neznámá sloučenina s kódovým označením B11 byla získána izolací z rostliny *Berberis vulgaris* L. z čeledi Berberidaceae.

V ^1H NMR spektru pozorujeme 13 signálů, z nichž šest nacházíme v oblasti alifatické ($\delta = 2.73$ ppm, $\delta = 3.34$ ppm, $\delta = 3.70$ ppm, $\delta = 3.87$ ppm, $\delta = 3.88$ ppm a $\delta = 3.94$ ppm) a sedm v oblasti aromatické ($\delta = 5.64$ ppm, $\delta = 5.95$ ppm, $\delta = 6.10$ ppm, $\delta = 6.62$ ppm, $\delta = 6.87$ ppm, $\delta = 6.98$ ppm a $\delta = 7.17$ ppm).

Již z vodíkového spektra vyplývá, že dva aromatické vodíky se budou na jednom z jader nacházet na sousedních atomech uhlíku (vodíky s posuny $\delta = 6.87$ a $\delta = 7.98$ ppm), jedná se o dublety štěpené stejnou interakční konstantou ($J = 8.4$ Hz).

Dalším výrazným signálem v aromatické části spektra je pík s chemickým posunem $\delta = 5.95$ ppm, jedná se o dublet s interakční konstantou $J = 0.7$ Hz. Tento signál hodnotou integrálu odpovídá dvěma atomům vodíku a z chemického posunu vyplývá, že bude odstíněn atomy kyslíku. S největší pravděpodobností bude v molekule neznámé sloučeniny obsažen dioxolanový kruh.

V alifatické části nacházíme odstíněné singlety s posuny $\delta = 3.94$ a $\delta = 3.88$ ppm, které odpovídají velikostí chemického posunu, štěpením i integrálem methoxyskupinám.

Z ^{13}C NMR spektra je patrné, že neznámá molekula obsahuje 21 atomů uhlíku. V alifatické části se nachází pouze pět signálů. Atom uhlíku s nejnižší hodnotou chemického posunu ($\delta = 30.5$ ppm) bude s největší pravděpodobností patřit alifatické methylenové skupině. Uhlík s posunem $\delta = 51.6$ ppm svým chemickým posunem poukazuje na odstínění atomem dusíku. Atomy uhlíku s posuny $\delta = 56.3$ ppm a $\delta = 61.0$ ppm pak budou náležet již zmíněným methoxyskupinám. Poslední, nejvíce odstíněný signál alifatické části ^{13}C NMR spektra má výrazně vyšší chemický posun $\delta = 73.5$ ppm.

V aromatické oblasti nacházíme 16 signálů, z nichž čtyři jsou odstíněné kyslíkem a tedy posunuté k vysokým hodnotám ppm, jedná se o uhlíky s posuny: $\delta = 146.4$ ppm, $\delta = 146.7$ ppm, $\delta = 147.5$ ppm a $\delta = 149.7$ ppm. Zbylé signály odpovídají atomům uhlíku nacházejícím se na aromatických kruzích neznámé molekuly. Přiřadit konkrétní posuny konkrétním atomům umožní pokročilejší 2D experimenty.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla zjištěna molekulová hmotnost. Molekulový pík má hodnotu 453, je však rozštěpený, což poukazuje na přítomnost dalších atomů. M+2 štěpení intenzitou i tvarem odpovídá třem atomům chloru.

2D experiment gHSQC umožnil přiřadit protonovaným atomům uhlíku konkrétní atomy vodíku:

C (30.5) - H (2.73 a 3.34)

C (51.6) - H (3.70 a 3.87)

C (56.3) - H (3.88)

C (61.0) - H (3.94)

C (73.5) - H (5.64)

C (97.5) - H (6.10)

C (101.1) - H (5.95)

C (104.1) - H (7.17)

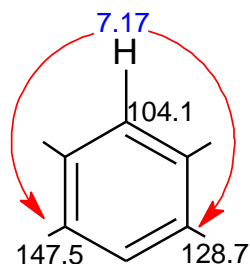
C (108.1) - H (6.62)

C (114.9) - H (6.98)

C (118.6) - H (6.87)

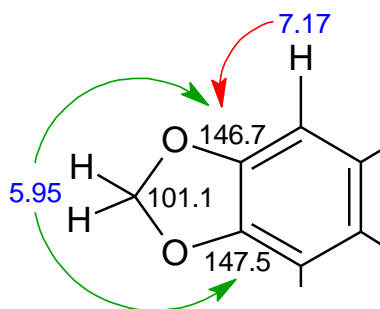
Je tedy zřejmé, že 11 atomů uhlíku nese alespoň jeden atom vodíku. Zbylé atomy uhlíku, které ^{13}C NMR spektrum odhaluje, jsou kvarterní. Jedná se o uhlíky s následujícími chemickými posuny: $\delta = 105.5$ ppm, $\delta = 114.6$ ppm, $\delta = 125.0$ ppm, $\delta = 128.7$ ppm, $\delta = 129.3$ ppm, $\delta = 137.6$ ppm, $\delta = 146.4$ ppm, $\delta = 146.7$ ppm, $\delta = 147.5$ ppm, $\delta = 149.7$ ppm.

Experiment gHMBC poskytuje nejvíce korelací a tedy i nejvíce informací o neznámé molekule. Nejvýraznější korelace atomu vodíku s nejvyšším chemickým posunem ($\delta = 7.17$ ppm) směřují do aromatické oblasti na kvarterní uhlíky s posuny $\delta = 147.5$ ppm a $\delta = 128.7$ ppm, jedná se o korelace právě přes tři vazby (obr. 1).



Obr. 1

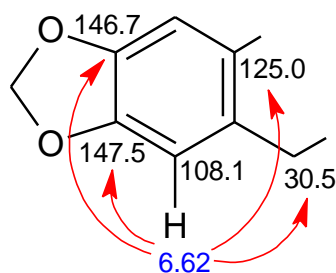
Další korelace tohoto vodíku je na atom uhlíku a chemickým posunem $\delta = 146.7$ ppm, který se bude nacházet na stejném aromatickém jádře hned v sousedství uhlíku s posunem $\delta = 104.1$ ppm a bude odstíněný (stejně jako výše zmiňovaný uhlík $\delta = 147.5$ ppm) atomem kyslíku. Přes tyto heteroatomy a methylenovou skupinu dochází k uzavření dioxolanového kruhu. Tuto skutečnost dokazují korelace atomů vodíku s posunem $\delta = 5.95$ ppm na odstíněné atomy uhlíku, obr. 2. Uhlík methylenové skupiny vykazuje v ^{13}C NMR spektru signál s chemickým posunem $\delta = 101.1$ ppm.



Obr. 2

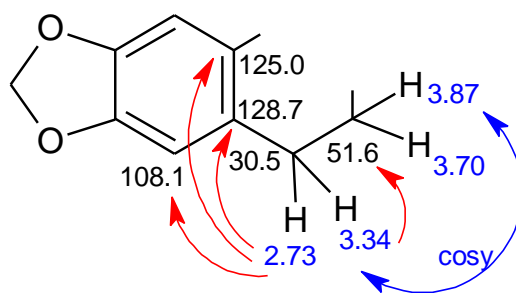
Poslední korelace vodíku s chemickým posunem $\delta = 7.17$ ppm je na kvarterní atom uhlíku s posunem $\delta = 137.6$ ppm. Jedná se o slabší korelaci, což by mohlo nasvědčovat faktu, že se tento atom bude nacházet už mimo dosavadní aromatické jádro. Tuto úvahu však nelze považovat za důkaz, ten poskytnou až další korelace (viz dále obr. 5).

Aromatický kruh nese ještě jeden atom vodíku, jedná se o vodík s posunem $\delta = 6.62$ ppm, který náleží uhlíku $\delta = 108.1$ ppm. Tento vodík má v aromatické části gHMBC spektra tři korelace. Dvě z nich jsou přes tři vazby (na uhlíky s posuny: $\delta = 146.7$ ppm a $\delta = 125.0$ ppm), třetí pouze přes vazby dvě (na atom uhlíku s posunem $\delta = 147.5$). Jedna korelace vodíku s posunem $\delta = 6.62$ ppm směřuje také do alifatické části – na atom uhlíku o chemickém posunu $\delta = 30.5$ ppm. Všechny korelace zachycuje obr. 3.



Obr. 3

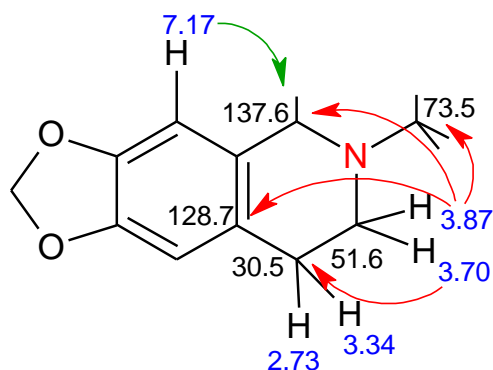
Poslední zmíněný atom methylenové skupiny je uhlík, na který jsou vázány atomy vodíku s posuny $\delta = 2.73$ ppm a 3.34 ppm, jak odhalilo spektrum gHSQC. Ve spektru gHMBC pak nacházíme korelace těchto vodíků do aromatické i alifatické oblasti. Korelace do aromatické části (na uhlíky s posuny: $\delta = 108.1$ ppm, 125.0 ppm a 128.7 ppm) potvrzují polohu v sousedství dokázaného aromatického kruhu. Korelace do alifatické oblasti pak naznačují další směr řešení neznámé molekuly. V této části se jedná o korelace na odstíněný atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 51.6$ ppm, jež také náleží methylenové skupině a nese tedy dva atomy vodíku ($\delta = 3.70$ ppm a $\delta = 3.87$ ppm). Toto uskupení potvrzuje i spektrum gCOSY. Vše názorně na obr. 4.



Obr. 4

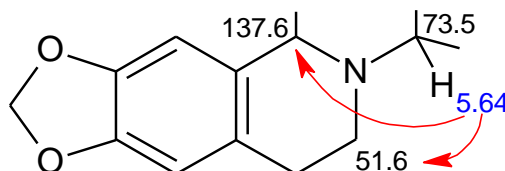
Atomy vodíku s posuny $\delta = 3.70$ ppm a $\delta = 3.87$ ppm mají jednak korelace na již řešenou část neznámé molekuly (na atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 30.5$ ppm a $\delta = 128.7$ ppm). Dále také nacházíme důležité korelace na atom uhlíku, jehož posun ($\delta = 73.5$ ppm) svědčí o přítomnosti heteroatomu v sousedství. Další korelace přes tři vazby směřuje k aromatickému kvarternímu uhlíku s chemickým posunem $\delta = 137.6$ ppm. Stejnou korelaci poskytuje také atom vodíku ($\delta = 7.17$ ppm) a tím je dokázáno umístění výše zmíněného atomu uhlíku (obr. 5). Poslední a velice slabou korelací atomů vodíku o chemických posunech $\delta = 3.70$ ppm a $\delta = 3.87$ ppm je korelace na uhlík s posunem $\delta = 105.5$ ppm (viz dále).

Vzhledem k dosavadním korelacím, velikosti odstínění atomů uhlíku s posuny $\delta = 51.6$ ppm a $\delta = 73.5$ ppm i k chybějícím korelacím do míst v sousedství tohoto uhlíku lze předpokládat, že se zde bude nacházet atom dusíku. Tím je uzavřen další kruh zkoumané molekuly.



Obr. 5

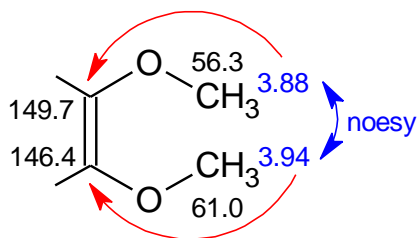
Atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 73.5$ ppm nese jediný vodík ($\delta = 5.64$ ppm), který má ve spektru gHMBC korelaci na již zmiňovaný atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 51.6$ ppm a dále na aromatické atomy uhlíku: $\delta = 146.4$ ppm, $\delta = 137.6$ ppm, $\delta = 129.3$ ppm a $\delta = 114.6$ ppm. Všechny zmíněné aromatické uhlíky jsou kvarterní a pouze jeden z nich ($\delta = 137.6$ ppm) se nachází v již řešeném substrukturálním fragmentu. I tato korelace je dalším důkazem o správnosti úvah při umístění atomu uhlíku s posunem $\delta = 73.5$ ppm. Další korelace v aromatické oblasti bohužel neumožňují jednoznačně přiřadit atomy uhlíku do tvořené struktury neznámé molekuly a bude tedy opět nezbytné kombinovat informace získané z různých NMR experimentů.



Obr. 6

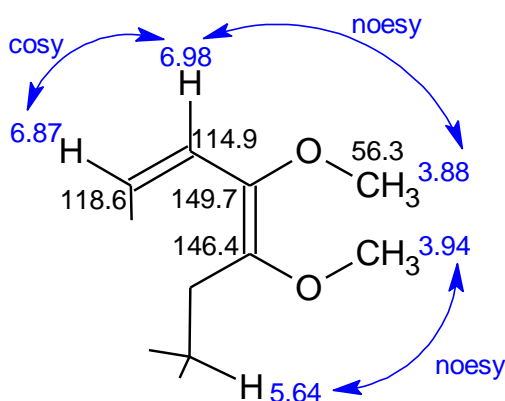
Atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 146.4$ ppm se bude nacházet na aromatickém jádře a odstíněný bude atomem kyslíku, na který bude vázána methylová skupina, jak je patrné již ze základních 1D NMR experimentů. Ze spektra NOESY je pak zřejmé, že atomy vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.94$ ppm (náleží uhlíku $\delta = 61.0$ ppm) náleží zmíněné

methoxyskupině a mají korelaci na atomy vodíku o chemickém posunu $\delta = 3.88$ ppm (náleží uhlíku $\delta = 56.3$ ppm). Zde se jedná opět o odstíněné vodíky, které patří methylové skupině. Ta je přes atom kyslíku napojená na uhlík s posunem $\delta = 149.7$ ppm. Uhlíky ($\delta = 146.4$ ppm a $\delta = 149.7$ ppm) se tedy ve struktuře budou nacházet vedle sebe (viz obr. 7).



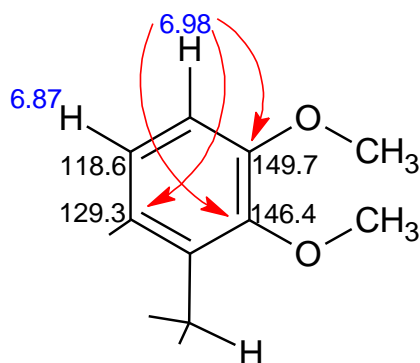
Obr. 7

Ve spektru NOESY nacházíme další korelace atomů uhlíku výše zmíněných methoxyskupin. Jedná se o korelace na atom vodíku s posunem $\delta = 5.64$ ppm a na atom vodíku s posunem $\delta = 6.98$ ppm. Tento vodík dle spektra gHSQC náleží atomu uhlíku s chemickým posunem $\delta = 114.9$ ppm. V ^1H NMR spektru je signál tohoto atomu vodíku rozštěpen na dublet s interakční konstantou $J = 8.4$ Hz. Se stejnou interakční konstantou je v témže spektru štěpen také signál s chemickým posunem $\delta = 6.87$ ppm (náležící uhlíku 118.6 ppm) a je tedy jisté, že se tyto atomy budou nacházet na sousedních uhlících ($\delta = 114.9$ ppm a $\delta = 118.6$ ppm). Tuto úvahu potvrzuje také spektrum gCOSY, kde nacházíme vzájemnou korelaci těchto dvou aromatických vodíků. Všechny zmíněné korelace znázorňuje obr. 8.



Obr. 8

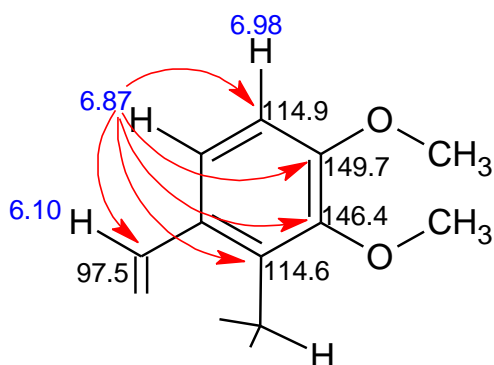
Zaměříme-li se na korelace atomu vodíku s chemickým posunem $\delta = 6.98$ ppm, nalezneme tři. Jedná se o korelace na uhlíky právě řešeného aromatického jádra s chemickými posuny: $\delta = 149.7$ ppm, $\delta = 146.4$ ppm a $\delta = 129.3$ ppm (obr. 9).



Obr. 9

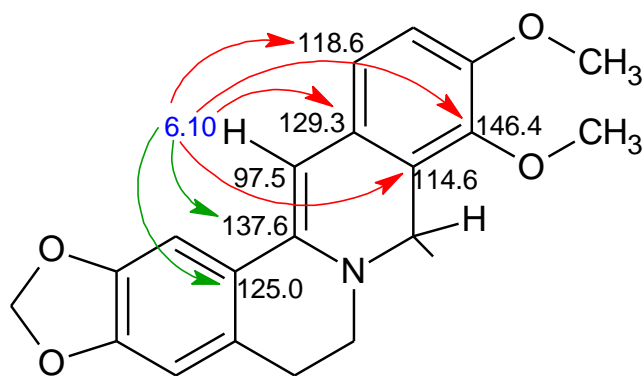
Sousední atom vodíku s posunem $\delta = 6.87$ ppm má korelací pět - tři výrazné, které budou přes tři vazby (na uhlíky s posuny $\delta = 149.7$ ppm, $\delta = 114.6$ ppm $\delta = 97.5$ ppm) a dvě méně výrazné korelace, které budou přes dvě, či čtyři vazby (na atomy uhlíku s posuny $\delta = 114.9$ ppm a $\delta = 146.4$ ppm).

Tímto je dokázána přítomnost dalšího aromatického kruhu v neznámé molekule a zároveň naznačeno další pokračování tvorby struktury díky korelaci na uhlík o posunu $\delta = 97.5$ ppm, o němž ze spektra gHSQC víme, že nese jeden atom vodíku ($\delta = 6.10$ ppm) viz obr. 10.



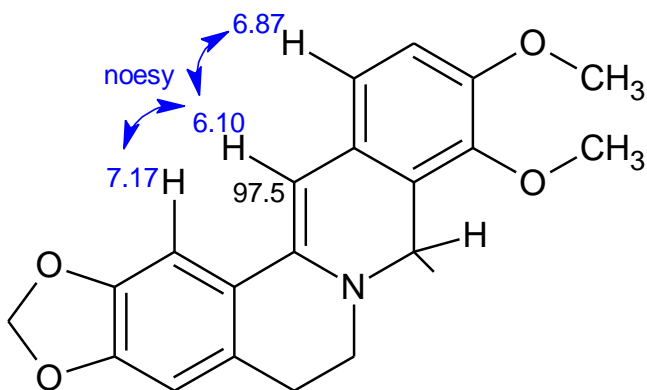
Obr. 10

Atom vodíku s posunem $\delta = 6.10$ ppm poskytuje v gHMBC spektru celou řadu korelací. Všechny směřují na aromatické atomy uhlíku. Nacházíme korelace jednak do posledního řešeného aromatického kruhu - konkrétně jde o korelace na atomy uhlíku s chemickými posuny $\delta = 114.6$ ppm, $\delta = 118.6$ ppm, $\delta = 129.3$ ppm a $\delta = 146.4$ ppm. Dále také nacházíme korelace do substrukturálního fragmentu, který byl řešen v úvodní části (obr. 1 – 6). Zde se jedná o korelace na uhlíky s posuny $\delta = 137.6$ ppm a 125.0 ppm. Tím je dokázáno propojení obou řešených částí, jak znázorňuje obr. 11.



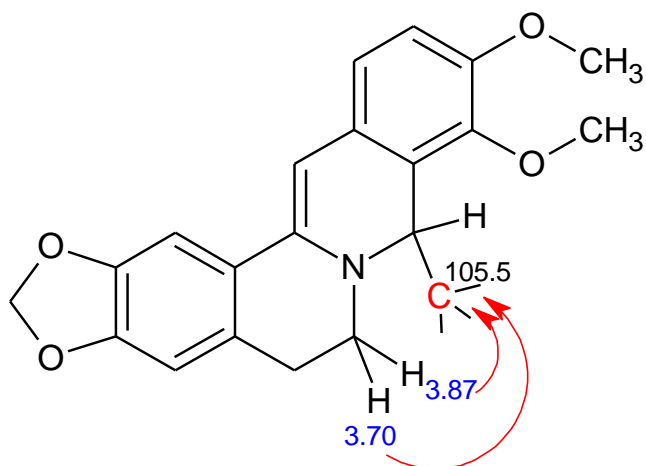
Obr. 11

Atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 6.10$ ppm má také korelace ve spektru NOESY. Jedná se o korelace na atomy vodíku s posuny $\delta = 7.17$ ppm a $\delta = 6.87$ ppm. Tyto korelace potvrzují informace, které již poskytlo spektrum gHMBC o propojení substrukturálních částí viz obr. 12.



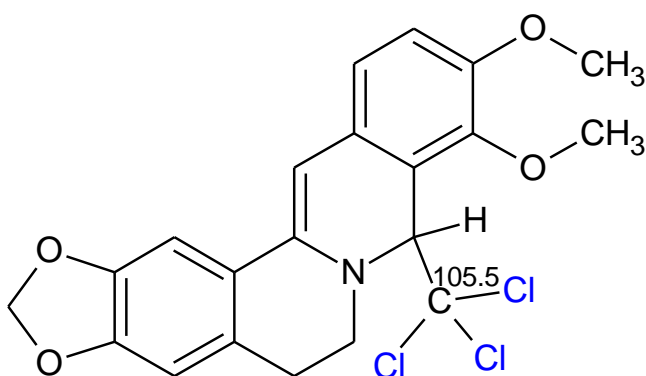
Obr. 12

Aktuálně řešený fragment neznámé molekuly obsahuje všechny atomy vodíku, jejichž signály poskytuje ^1H NMR spektrum, z ^{13}C spektra jsou vyčerpány všechny atomy uhlíku až na jediný – uhlík o chemickém posunu $\delta = 105.5$ ppm. Tento uhlík ovšem nemá téměř žádné korelace ve spektrech. Ze spektra gHSQC je patrné, že se jedná o uhlík karterní, neboť zde není žádná korelace. Ve spektru gHMBC nacházíme na tento uhlík pouze dvě velmi slabé korelace atomů vodíku s chemickými posuny $\delta = 3.70$ ppm a $\delta = 3.87$ ppm (obr. 13).



Obr. 13

Celý fragment má molekulovou hmotnost 348, tedy o 105 menší než je hodnota píku v hmotnostním spektru. Jak už ale na začátku bylo předesláno, molekulový pík je štěpný a charakteristika jeho štěpení by nasvědčovala přítomnosti tří atomů chloru. Tento fakt naprosto koreluje s rozdílem mezi molekulovou hmotností fragmentu a celé neznámé molekuly. Struktura neznámé molekuly se sumárním vzorcem $C_{21}H_{18}NO_4Cl_3$ je znázorněna na obr. 14.

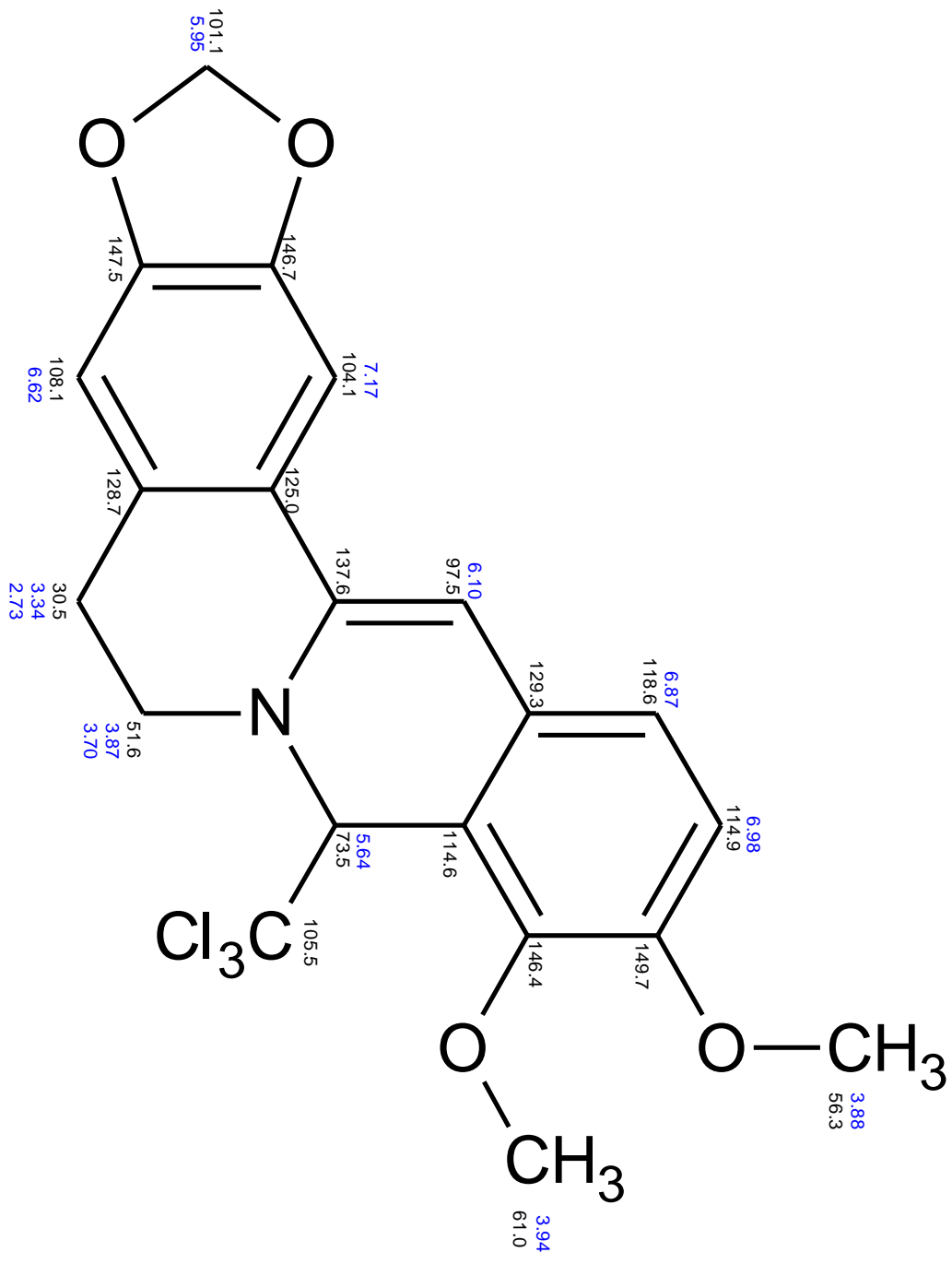


Obr. 14

Z výše uvedené struktury, vzhledem k obsahu tří atomů chloru, vyplývá, že se bude pravděpodobně jednat o izolační artefakt. V literatuře je tato látka popsána jako 8-trichlormethyl-dihydroberberin²¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.17 (1H, s), 6.98 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.62 (1H, s), 6.10 (1H, s), 5.95 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 5.64 (1H, s), 3.94 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (1H, ddd, *J* = 13.4, 5.7, 4.6 Hz), 3.70 (1H, ddd, *J* = 13.4, 9.4, 3.9 Hz), 3.34 (1H, ddd, *J* = 15.4, 9.4, 4.6 Hz), 2.73 (1H, ddd, *J* = 15.4, 5.7, 3.9 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 149.7, 147.5, 146.7, 146.4, 137.6, 129.3, 128.7, 125.0, 118.6, 114.9, 114.6, 108.1, 105.5, 104.1, 101.1, 97.5, 73.5, 61.0, 56.3, 51.6, 30.5.



4.2. HA2

Neznámá sloučenina s kódovým označením HA2 byla izolována z rostliny *Berberis vulgaris* L. z čeledi Berberidaceae.

Z ^1H NMR spektra nelze přesně na první pohled odečíst počet atomů vodíku, které náleží zkoumané molekule. Spektrum obsahuje mnoho signálů, z nichž některé náleží i nečistotám – jedná se o signály nacházející se v alifatické části spektra. V této části spektra dle velikosti integrálů nacházíme přibližně 41 atomů vodíku. V aromatické části jsou čtyři signály odpovídající šesti atomům vodíku.

Již z ^1H NMR spektra můžeme uvažovat přítomnost tří methoxy skupin – jedná se o singlety s chemickými posuny: $\delta = 3.39$ ppm, $\delta = 3.80$ ppm a $\delta = 3.89$ ppm, z nichž každý signál odpovídá vždy třem atomům vodíku. V oblasti chemického posunu $\delta = 2.60$ ppm a 2.61 ppm se také nacházejí dva signály, z nichž každý má tvar singletu a každý odpovídá třem atomům vodíku, dle velikosti chemického posunu je ale zřejmé, že tyto vodíky budou odstíněné dusíkem.

Dále spektra odhalují mnoho na sebe navazujících rozštěpených signálů, o nichž více napoví 2D experimenty. Stejně jako o dalším, tentokrát výrazném signálu, kterým je singlet s chemickým posunem $\delta = 4.89$ ppm.

V aromatické části nacházíme čtyři signály s chemickými posuny: $\delta = 6.47$ ppm, $\delta = 6.54$ ppm, $\delta = 6.61$ ppm a $\delta = 6.66$ ppm. Dva z těchto signálů mají charakter AA'BB' systému, který svědčí o p-disubstituovaném systému.

V ^{13}C NMR spektru je celkem 35 signálů, je ale jasné, že všechny opět do zkoumané molekuly patřit nebudou, neboť známe molekulovou hmotnost (a ta by musela být větší, pokud by zahrnovala všechny signály ze spektra) a nakonec i 2D spektra dokazují, že zkoumaný vzorek obsahuje zbytky nečistot. V alifatické části nacházíme 18 signálů a v části aromatické je signálů 17. V alifatické oblasti nacházíme signály atomů uhlíku, které svým chemickým posunem odpovídají již zmiňovaným methoxyskupinám, i atomy uhlíků, které menším chemickým posunem odpovídají methylovým skupinám odstíněným atomem dusíku - přesněji tuto situaci popisuje gHSQC spektrum. I v aromatické části molekuly nacházíme výrazně odstíněné atomy, které poukazují na odstínění atomem kyslíku.

Molekulová hmotnost, která byla změřena pomocí MS, je 504 a poukazuje na sudý počet atomů dusíku ve zkoumané molekule. Již dle odstíněných methylových skupin v ^1H NMR spektru lze očekávat minimálně dva atomy dusíku.

Z 2D experimentů byl prvně využit experiment gHSQC, s jehož pomocí lze přiřadit jednotlivé atomy uhlíku k jednotlivým atomům vodíku takto:

C (11.4) - 3H (1.41)

C (18.4) - 3H (1.24)

C (22.7) - 3H (2.00)

C (24.1) - 2H (2.80 a 3.05 - 2.99)

C (27.7) - 2H (2.72 a 3.37 - 3.29)

C (29.7) - 3H (1.24)

C (39.3) - 2H (2.52 a 3.37 - 3.29)

C (41.2) - 3H (2.60)

C (42.1) - 2H (2.99 - 2.97)

C (44.9) - 2H (3.05 - 2.99 a 3.42 - 3.39)

C (45.0) - 3H (2.61)

C (52.0) - 2H (2.72 a 3.17 - 3.12)

C (52.5) - 2H (3.30 a 3.78)

C (55.9) - 3H (3.80)

C (56.1) - 3H (3.89)

C (58.4) - 2H (3.71)

C (60.0) - 3H (3.39)

C (64.7) - H (3.61)

C (108.1) - H (6.47)

C (111.8) - H (6.66)

C (115.1) - H (4.86)

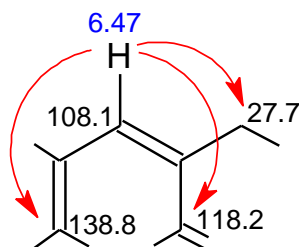
2C (117.9) - 2H (6.54)

2C (130.8) - 2H (6.61)

Po přiřazení atomů vodíku k atomům uhlíku je zřejmé, že spektrum odhaluje 17 alifatických protonovaných uhlíků a 7 aromatických protonovaných uhlíků. Kvarterní uhlíky nacházíme v alifatické i aromatické části - zde jsou jejich posuny: $\delta = 18.4$ ppm, $\delta = 118.2$ ppm, $\delta = 125.3$ ppm, $\delta = 125.6$ ppm, $\delta = 128.7$ ppm, $\delta = 128.9$ ppm, $\delta = 138.8$ ppm, $\delta = 144.1$ ppm, $\delta = 144.2$ ppm, $\delta = 147.5$ ppm, $\delta = 152.1$ ppm, $\delta = 156.2$ ppm, $\delta = 176.1$ ppm.

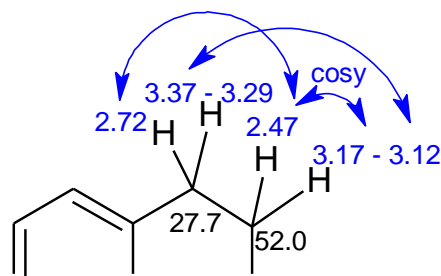
V následující části bude využíváno především gHMBC spektrum, gCOSY, resp. NOESY spektra.

Sestavování struktury začneme pomocí gHMBC a konkrétně aromatickým vodíkem s chemickým posunem $\delta = 6.47$ ppm, který náleží uhlíku a chemickým posunem $\delta = 108.1$ ppm. Tento vodík má korelace přes tři vazby na aromatické uhlíky $\delta = 138.8$ ppm a $\delta = 118.2$ ppm a na alifatický uhlík $\delta = 27.7$ ppm, jak naznačuje obr. 15.



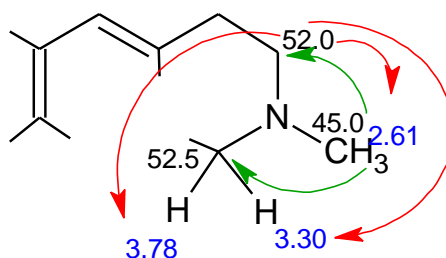
Obr. 15

Mezi další již méně výrazné korelace vodíku $\delta = 6.47$ ppm patří korelace na uhlíky s posuny $\delta = 128.7$ ppm, $\delta = 144.1$ ppm a 152.1 ppm. Tyto uhlíky budou společně s třemi již zmíněnými aromatickými atomy uhlíku tvořit jedno aromatické jádro. Z gHSQC víme, že uhlík s chemickým posunem $\delta = 27.7$ ppm nese dva atomy vodíku s posuny $\delta = 2.72$ ppm a $\delta = 3.37 - 3.29$ ppm. Tyto atomy sice nemají žádné korelace v gHMBC, ale mají korelaci ve spektru gCOSY na vodíky s posuny $\delta = 3.17 - 3.12$ ppm a $\delta = 2.47$ ppm (obr. 16). Tato korelace tedy potvrzuje sousedství uhlíků, jež tyto atomy vodíku nesou – uhlíky $\delta = 27.7$ ppm a $\delta = 52.0$ ppm.



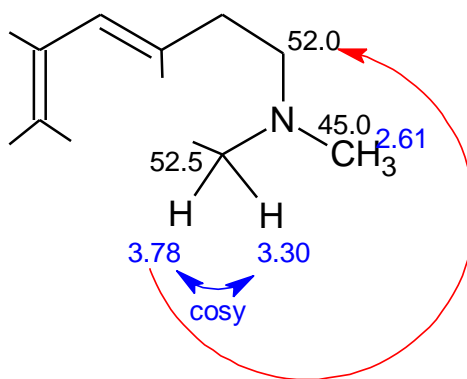
obr. 16

Atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 52.0$ ppm je odstíněný a v souvislosti s polohou ve spektru je pravděpodobné, že tento uhlík bude navázán na atom dusíku. Podíváme-li se na korelace zmiňovaného uhlíku, nacházíme korelace přes tři vazby na vodíky s posuny $\delta = 2.61$ ppm (náleží uhlíku s posunem $\delta = 45.0$ ppm) a vodíky $\delta = 3.78$ ppm a $\delta = 3.37 - 3.29$ ppm (oba náleží uhlíku s posunem $\delta = 52.5$ ppm). Vodíky s chemickým posunem $\delta = 2.61$ ppm pak mají korelaci přes tři vazby na oba odstíněné uhlíky s posuny $\delta = 52.0$ ppm a $\delta = 52.5$ ppm, jak zobrazuje obrázek č. 17.



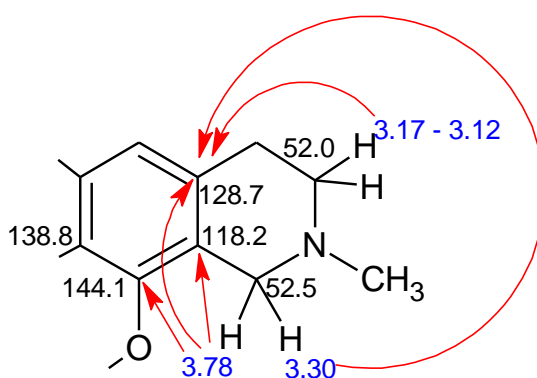
Obr. 17

Dále hledejme korelace vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.78$ ppm. Ve spektru gCOSY má korelaci na vodík s chemickým posunem $\delta = 3.30$ ppm, který náleží stejnému uhlíku. Ve spektru gHMBC nacházíme korelaci na uhlík s posunem $\delta = 52.0$ ppm (obr. 18).



Obr. 18

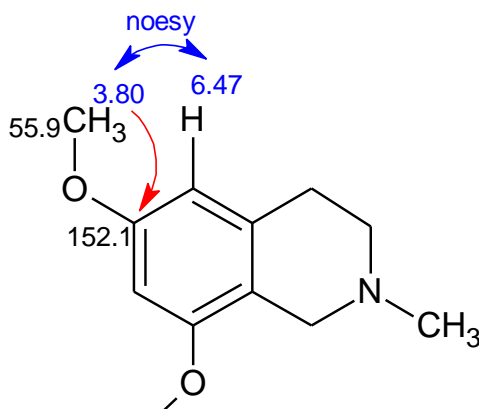
Vodík s chemickým posunem $\delta = 3.78$ ppm má dále korelace na aromatické uhlíky s chemickými posuny: $\delta = 118.2$ ppm (jeho přesné umístění v kruhu už víme díky korelaci vodíku s posunem $\delta = 6.47$ ppm, jak ukazuje obr. 15), 128.7 ppm a 144.1 ppm. Umístění atomu uhlíku s chemickým posunem $\delta = 128.7$ na jádře vyplývá z jeho korelaci na již zmiňované atomy vodíku s posuny $\delta = 3.78$ ppm, $\delta = 3.30$ ppm, $\delta = 3.17 - 3.12$ ppm a na aromatický atom vodíku $\delta = 6.47$ ppm. Z toho vyplývá, že atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 144.1$ ppm se na jádře bude nacházet mezi atomy uhlíků $\delta = 118.2$ ppm a 138.8 ppm. Dle velikosti chemického posunu je pak zřejmé, že uhlík ($\delta = 144.1$ ppm) bude odstíněn kyslíkem. Jelikož ale nenacházíme žádnou korelaci přes tři vazby, lze předpokládat, že právě přes atom kyslíku bude tato část molekuly spojená s dalším molekulovým fragmentem (bude navazovat na kvartérní uhlík a tím pádem nelze najít v gHMBC spektru vzájemné korelace těchto částí).



Obr. 19

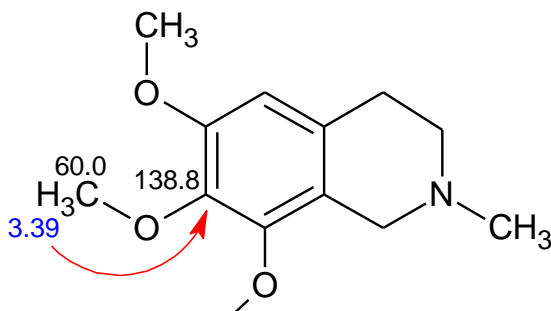
Uhlík s chemickým posunem $\delta = 152.1$ ppm je na první pohled podle velikosti chemického posunu odstíněný, dle korelaci přes tři vazby je jasné, že k posunu k vyšším hodnotám ppm došlo díky přítomnosti methoxyskupiny, která tento atom odstiňuje.

Tuto skutečnost dokazuje korelace uhlíku (152.1 ppm) s atomy vodíku ($\delta = 3.80$ ppm), které náleží odstíněnému alifatickému uhlíku ($\delta = 55.9$ ppm), jak znázorňuje obr. 20. V NOESY spektru navíc nacházíme korelaci atomů vodíku s posunem $\delta = 3.80$ ppm na aromatický vodík s posunem $\delta = 6.47$ ppm (viz obr. 20), což dokazuje správnost předchozích úvah o rozmístění atomů uhlíku na jádře.



Obr. 20

Zbývá vyřešit poslední aromatický uhlík $\delta = 138.8$ ppm, jehož umístění je zřejmé z obr. 15 a jehož chemický posun opět poukazuje na odstínění methoxyskupinou, kterou tvoří atom uhlíku s posunem $\delta = 60.0$ ppm a tři atomy vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.39$ ppm. Tyto vodíky mají v gHMBC spektru korelaci na atom uhlíku ($\delta = 138.8$ ppm), jak znázorňuje obr. 21.

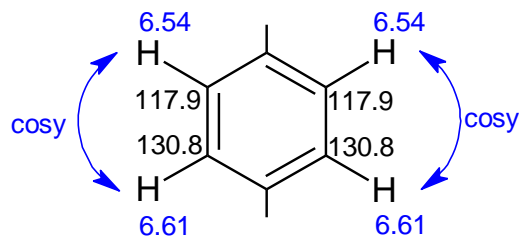


Obr. 21

Tuto část molekuly lze považovat za vyřešenou a lze tedy pokračovat druhým fragmentem zkoumané molekuly.

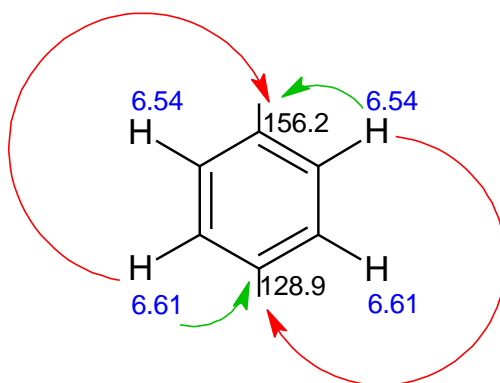
V ^1H spektru, konkrétně v aromatické části, lze pozorovat AA'BB'systém, který vypovídá o para substituci aromatického jádra. To, že se atomy vodíků nacházejí

na sousedních uhlících, potvrzuje i spektrum gCOSY, kde nacházíme vzájemné korelace atomů. Jedná se o atomy vodíků s posuny $\delta = 6.61$ ppm a $\delta = 6.54$ ppm. Tyto atomy náležejí atomům uhlíku s posuny $\delta = 130.8$ ppm a $\delta = 117.9$ ppm, jak znázorňuje obr. 22.



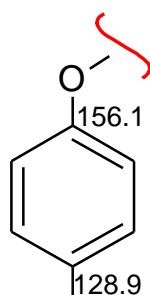
Obr. 22

Výše zmíněné atomy vodíků mají také korelace v gHMBC spektru, a to jak na sousední uhlíky, tak na další uhlíky, které jsou součástí aromatického jádra. Vodík s posunem $\delta = 6.61$ ppm má korelaci přes tři vazby na uhlík s chemickým posunem $\delta = 156.2$ ppm a atom vodíku s posunem $\delta = 6.54$ ppm má korelaci přes tři vazby na atom uhlíku s posunem $\delta = 128.9$ ppm. Mají i slabé korelace přes dvě vazby přímo na sousední atom uhlíku (na obr. 23 znázorněny zeleně) - tedy vodík s posunem $\delta = 6.61$ ppm má korelaci na uhlík s chemickým posunem $\delta = 128.9$ ppm a vodík s chemickým posunem $\delta = 6.54$ ppm má korelaci na uhlík s posunem $\delta = 156.2$ ppm.



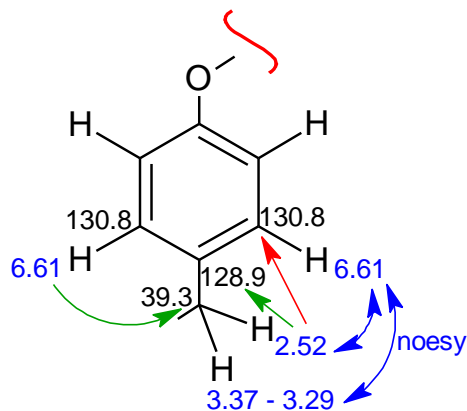
Obr. 23

Atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 156.2$ ppm, bude dle velikosti chemického posunu odstíněn atomem kyslíku (obr. 24). Bohužel pro tento atom ve spektrech žádné další korelace nejsou, je tedy třeba uvažovat o možnosti napojení přes heteroatom na nějakou z dalších částí zkoumané molekuly.



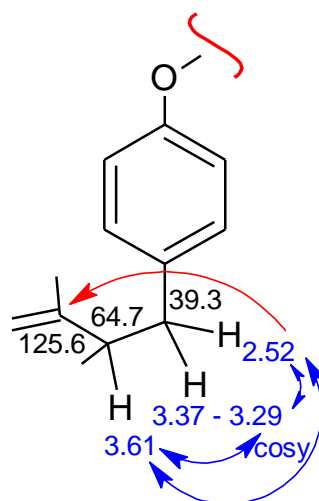
Obr. 24

Aromatický vodík tohoto jádra s chemickým posunem $\delta = 6.61$ ppm má korelaci do alifatické oblasti na atom uhlíku s posunem $\delta = 39.3$ ppm, který nese dva atomy vodíku ($\delta = 3.37 - 3.29$ ppm a $\delta = 2.52$ ppm). Tyto atomy navíc mají ve spektru NOESY korelaci na vodík s posunem $\delta = 6.61$ ppm. Atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 2.52$ ppm má v gHMBC spektru korelaci na atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 130.8$ ppm. Mezi atomy uhlíků s chemickými posuny $\delta = 39.3$ ppm a $\delta = 130.8$ ppm se bude nacházet uhlík s chemickým posunem $\delta = 128.9$ ppm. Na tento uhlík mají korelace atomy vodíku s posuny $\delta = 6.61$ ppm, resp. $\delta = 2.52$ ppm, zde se však jedná o korelace pouze přes 2 vazby (znázorněno zeleně), viz. obr. 25.



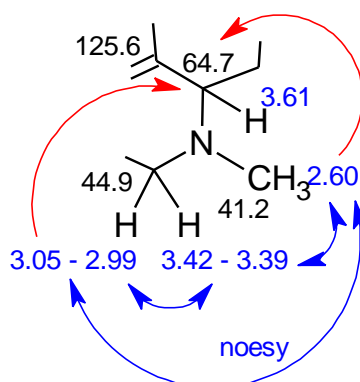
Obr. 25

Podíváme-li se podrobněji na korelace atomu vodíku s chemickým posunem $\delta = 2.52$ ppm, nacházíme korelace ve spektru gCOSY - a sice na atom vodíku ($\delta = 3.37 - 3.29$ ppm), který náleží stejnému uhlíku, a na atom vodíku ($\delta = 3.61$ ppm), který náleží sousednímu atomu uhlíku ($\delta = 64.7$ ppm). Ve spektru gHMBC má atom vodíku s posunem $\delta = 2.52$ ppm korelaci přes tři vazby na aromatický atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 125.6$ ppm (viz obr. 26).



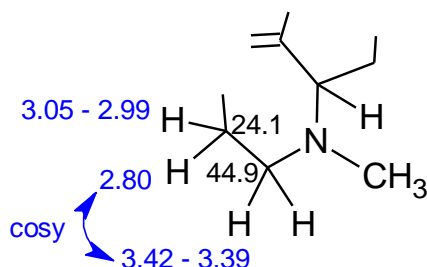
Obr.26

Atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 64.7$ ppm je jednoznačně (dle velikosti posunu) odstíněný a bude tedy vázán na heteroatom. Na tento atom uhlíku má výraznou gHMBC korelaci singlet s chemickým posunem $\delta = 2.60$ ppm odpovídající třem atomům vodíku, tedy methylové skupině, které náleží atom uhlíku s posunem $\delta = 41.2$ ppm. Podle posunu je opět zřejmé odstínění - nejpravděpodobněji atomem dusíku. Další korelaci na uhlík ($\delta = 64.7$ ppm) má atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.05 - 2.99$ ppm, který náleží uhlíku s posunem $\delta = 44.9$ ppm a společně s dalším atomem vodíku ($\delta = 3.42 - 3.39$ ppm) tvoří methylenovou skupinu. Opět velikost odstínění atomu uhlíku poukazuje na přítomnost heteroatomu a vzhledem k třetí vazbě se bude opravdu jednat o atom dusíku. Pro úplnost lze uvést i korelace atomů vodíku ve spektru NOESY, kde nacházíme korelace vodíků: ($\delta = 2.60$ ppm) - ($\delta = 3.05 - 2.99$ ppm), ($\delta = 2.60$ ppm) - ($\delta = 3.42 - 3.39$ ppm) a ($\delta = 3.05 - 2.99$ ppm) - ($\delta = 3.42 - 3.39$ ppm). Vše je uvedeno na obr. 27.



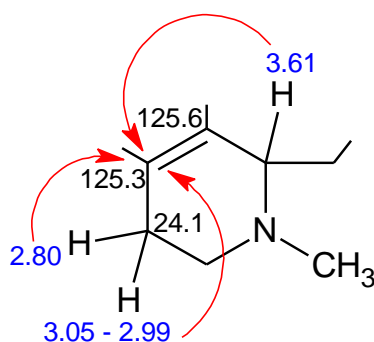
Obr. 27

Ve spektru gCOSY nacházíme korelace vodíku ($\delta = 3.42 - 3.39$ ppm) na vodík s posunem $\delta = 2.80$ ppm, který náleží atomu uhlíku s chemickým posunem $\delta = 24.1$ ppm a který tedy sousedí s uhlíkem o chemickém posunu $\delta = 44.9$ ppm, jak naznačuje obr. 28. Uhlík s posunem $\delta = 24.1$ ppm náleží methylenové skupině a nese ještě jeden atom vodíku, ten má chemický posun $\delta = 3.05 - 2.99$ ppm.



Obr. 28

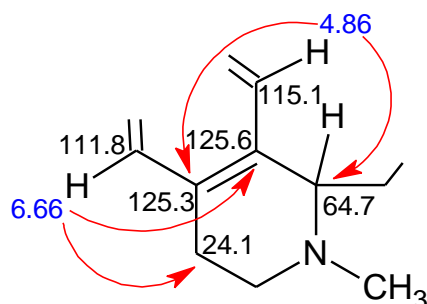
Vodíky náležící uhlíku ($\delta = 24.1$ ppm) mají korelaci na aromatické jádro, konkrétně na atomy uhlíku s posuny $\delta = 125.3$ ppm a $\delta = 125.6$ ppm. Na atom uhlíku ($\delta = 125.3$ ppm) má korelaci i atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.61$ ppm a je tedy jasné, že došlo k uzavření dalšího kruhu ve zkoumané molekule, viz obr. 29. Můžeme nyní očekávat přítomnost aromatického jádra v sousedství.



Obr. 29

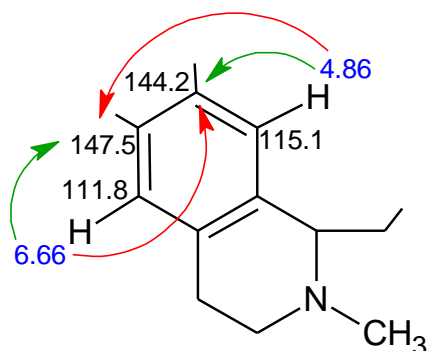
Napojení kruhů potvrzují i korelace ve spektru gHMBC. Mezi ně patří korelace aromatického atomu vodíku s chemickým posunem $\delta = 6.66$ ppm (náleží uhlíku s posunem $\delta = 111.8$ ppm) na alifatický atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 24.1$ ppm a na aromatický uhlík s posunem $\delta = 125.6$ ppm. Druhý aromatický vodík s posunem $\delta = 4.86$ ppm (náleží uhlíku s posunem $\delta = 115.1$ ppm) má korelaci na alifatický atom uhlíku

s chemickým posunem $\delta = 64.7$ ppm a na aromatický uhlík s posunem $\delta = 125.3$ ppm, jak ukazuje obr. 30.



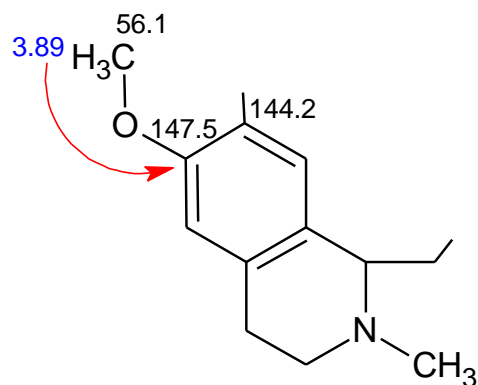
Obr. 30

K dalším korelacím vodíku s chemickým posunem $\delta = 4.86$ ppm patří korelace na uhlík s posunem $\delta = 147.5$ ppm a méně výrazná korelace na atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 144.2$ ppm (tato korelace bude přes dvě vazby a v obr. 31 je vyznačena zeleně). Atom vodíku s posunem $\delta = 6.66$ ppm má pak korelace po aromatickém jádru v porovnání s předchozím vodíkem přesně naopak - tedy výrazná korelace přes tři vazby je na atom uhlíku s posunem $\delta = 144.2$ ppm a méně výrazná korelace, která bude jen přes dvě vazby, je na uhlík s chemickým posunem $\delta = 147.5$ ppm viz obr. 31.



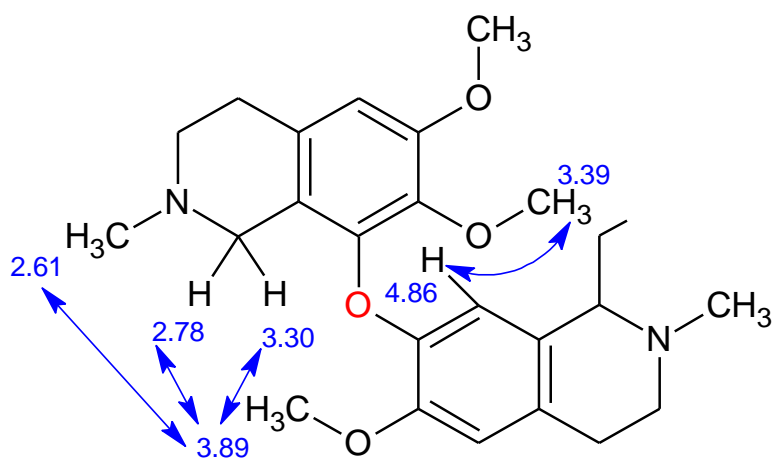
Obr. 31

Podíváme-li se na chemické posuny obou posledně řešených atomů uhlíku, je zřejmé, že budou odstíněny atomem kyslíku. Na uhlík s posunem $\delta = 147.5$ ppm vykazují korelaci alifatické vodíky s chemickým posunem $\delta = 3.89$ ppm (náleží atomu uhlíku s posunem $\delta = 56.1$), tyto atomy náleží také dle svého chemického posunu methoxyskupině. Tomuto předpokladu odpovídá i jediná gHMBC korelace těchto vodíků na již zmiňovaný aromatický uhlík (obr. 32).



Obr. 32

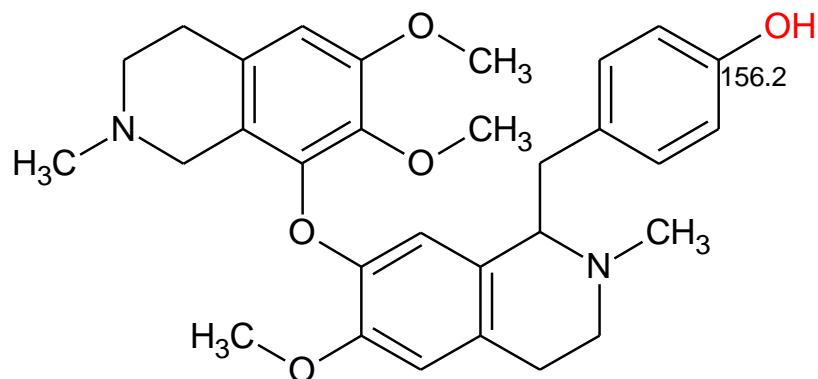
Druhý atom vodíku tohoto aromatického jádra v gHMBC spektru žádnou korelaci přes tři vazby nemá. Podle chemického posunu je zřejmé, že bude i tento uhlík odstíněn atomem kyslíku a je tedy vysoce pravděpodobné, že právě přes tento heteroatom bude spojen s prvním řešeným fragmentem zkoumané molekuly - tedy k odstíněnému atomu uhlíku o chemickém posunu $\delta = 144.1$ ppm, jak znázorňuje obr. 33. Napojení těchto dvou částí molekul potvrzují i korelace ve spektru NOESY, konkrétně korelace vodíku methoxyskupiny s chemickým posunem $\delta = 3.89$ ppm na vodíky s posuny $\delta = 3.30$ ppm, $\delta = 3.78$ ppm a $\delta = 2.61$ ppm. Dále pak NOESY korelace vodíků s chemickými posuny $\delta = 3.39$ ppm a $\delta = 4.86$ ppm. A spektrum NOESY by poskytlo i další korelace, které by dokazovaly správnost tohoto propojení.



Obr. 33

Když připojíme ještě para disubstituované jádro, získáme téměř celou zkoumanou molekulu. Tento fragment má totiž molekulovou hmotnost 503 (naměřená molekulová hmotnost celé molekuly činí 504) a je tedy jasné, že uhlík s chemickým posunem $\delta = 156.2$

ppm bude odstíněn hydroxyskupinou, neboť právě tento vodík odpovídá rozdílu molekulové hmotnosti zkoumané molekuly a dosavadního vyřešeného fragmentu. Výsledná molekula má tedy sumární vzorec $C_{30}H_{36}O_5N_2$ a její výslednou podobu znázorňuje obr. 34.

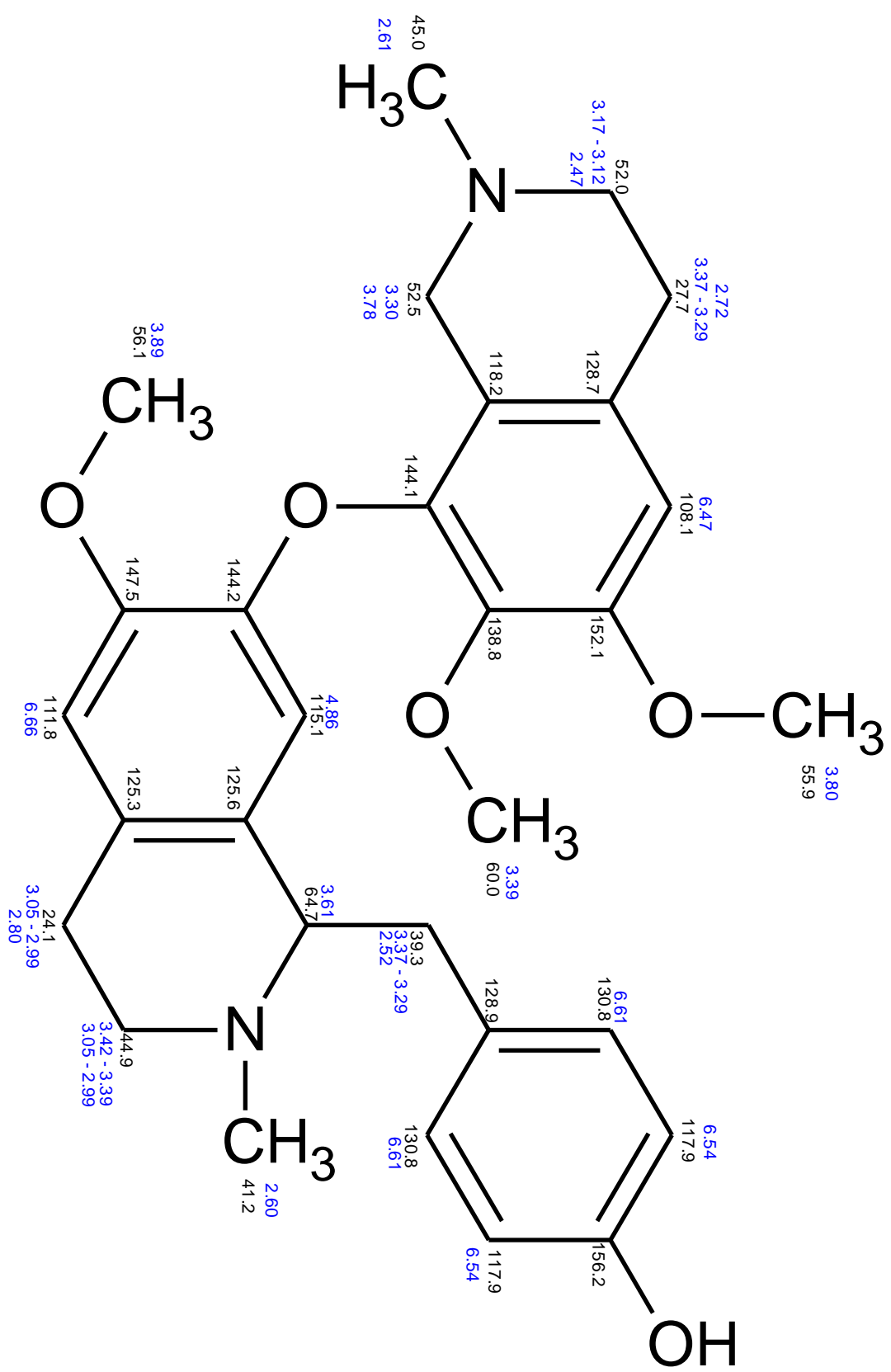


Obr. 34

Výsledná struktura neznámé látky odpovídá muraricinu²⁰.

¹H NMR (500 Hz, $CDCl_3$): δ 6.66 (1H, s), 6.61 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.54 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.47 (1H, s), 4.86 (1H, s), 3.89 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.78 (1H, d, $J = 15.0$ Hz), 3.61 (1H, dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz), 3.42 – 3.39 (1H, m), 3.39 (3H, s), 3.37 – 3.29 (2H, m), 3.30 (1H, d, $J = 15.0$ Hz), 3.17 – 3.12 (1H, m), 3.05 – 2.99 (2H, m), 2.80 (1H, ddd, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, $J_3 = 0.7$ Hz), 2.72 (1H, ddd, $J_1 = 16.1$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, $J_3 = 1.3$ Hz), 2.61 (3H, s), 2.60 (3H, s), 2.52 (1H, dd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz), 2.47 (1H, ddd, $J_1 = 15.3$ Hz, $J_2 = 11.7$ Hz, $J_3 = 4.2$ Hz)

¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 156.2, 152.1, 147.5, 144.2, 144.1, 138.8, 130.8, 128.9, 128.7, 125.6, 125.3, 118.2, 117.9, 115.1, 111.8, 108.1, 64.7, 60.0, 56.1, 55.9, 52.5, 52.0, 45.0, 44.9, 41.2, 39.3, 27.7, 24.1



4.3. NP - D - 4/3

Neznámá sloučenina označená kódem NP - D - 4/3 byla izolována z rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol z čeledi Amarillidaceae.

V ^1H NMR spektru nacházíme celkem 15 signálů, z nichž 10 se nachází v alifatické oblasti ($\delta = 1.94 - 2.01$ ppm, $\delta = 2.32 - 2.37$ ppm, $\delta = 2.53$ ppm, $\delta = 2.84$ ppm, $\delta = 2.87 - 2.93$ ppm, $\delta = 3.17$ ppm, $\delta = 3.40 - 3.45$ ppm, $\delta = 3.69$ ppm, $\delta = 3.85$ ppm a $\delta = 4.23$ ppm) a 5 signálů v aromatické oblasti ($\delta = 5.97$ ppm, $\delta = 6.06$ ppm, $\delta = 6.52$ ppm, $\delta = 6.71$ ppm a $\delta = 7.93$ ppm). Podle velikosti integrálů můžeme usuzovat, že molekula neznámé sloučeniny obsahuje pravděpodobně 17 atomů vodíku. Nejvýraznějším signálem alifatické části spektra je singlet s chemickým posunem $\delta = 3.85$ ppm, který odpovídá třem atomům vodíku, a dle velikosti chemického posunu můžeme uvažovat, že bude náležet methoxyskupině. Dva dublety štěpené stejnou interakční konstantou ($J = 17.6$ Hz) s chemickými posuny $\delta = 3.69$ ppm a $\delta = 4.23$ ppm svým odstíněním poukazují na přítomnost dalšího heteroatomu. Další alifatické signály mají tvary multipletu či dubletu dubletů.

V aromatické oblasti nacházíme čtyři dublety, z nichž vždy dva jsou štěpené stejnou interakční konstantou. Jedná se o vodíky s chemickými posuny $\delta = 5.97$ ppm a $\delta = 7.93$ ppm ($J = 9.8$ Hz) a $\delta = 6.52$ ppm a $\delta = 6.71$ ppm ($J = 8.3$ Hz).

^{13}C NMR spektrum poskytuje 16 signálů. Sedm signálů náleží alifatické oblasti a čtyři z nich jsou více odstíněné a poukazují tedy na přítomnost heteroatomů - dle velikosti odstínění můžeme předpokládat, že uhlíky s chemickými posuny $\delta = 53.5$ ppm, $\delta = 54.6$ ppm a $\delta = 56.1$ ppm resp. $\delta = 65.1$ budou odstíněny atomem dusíku popř. kyslíku.

V aromatické oblasti ^{13}C NMR spektra nacházíme devět signálů. Opět jsou zde čtyři signály odstíněné - jedná se o atomy uhlíku s posuny $\delta = 142.8$ ppm, $\delta = 145.6$ ppm, $\delta = 154.8$ ppm a $\delta = 198.9$ ppm. Nejvíce odstíněný poslední zmíněný signál bude s největší pravděpodobností náležet ketonické skupině v konjugaci s dvojnou vazbou.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla naměřena molekulová hmotnost neznámé sloučeniny. Molekulový pík dosáhl hodnoty 271 a lichá hodnota poukazuje na přítomnost lichého počtu atomů dusíku ve zkoumané molekule.

Za pomoci 2D experimentu gHSQC bylo možné přiřadit konkrétní atomy vodíku ke konkrétním atomům uhlíku:

C (38.7) - 2H (2.53 a 2.84)

C (40.2) - 2H (1.94 - 2.02 a 2.32 - 2.37)

C (53.4) - 2H (2.87 - 2.93 a 3.40 - 3.45)

C (54.6) - 2H (3.69 a 4.23)

C (56.1) - 3H (3.85)

C (65.1) - H (3.17)

C (109.3) - H (6.71)

C (116.8) - H (6.52)

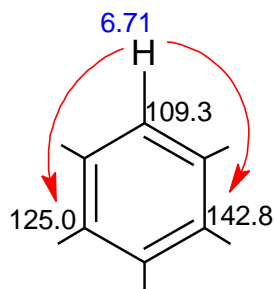
C (128.0) - H (5.97)

C (154.8) - H (7.93)

Neznámá molekula tedy obsahuje deset protonovaných atomů uhlíku. Zbýlých šest atomů uhlíku vodík nenese - jedná se o kvarterní uhlíky s posuny: $\delta = 43.5$ ppm, $\delta = 125.0$ ppm, $\delta = 126.0$ ppm, $\delta = 142.8$ ppm, $\delta = 145.6$ ppm, $\delta = 198.9$ ppm.

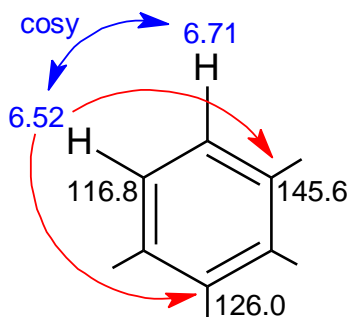
Spektrum gHMBC, které je pro sestavování struktury neznámé molekuly stěžejním experimentem, obsahuje zřetelné signály nezbytné pro řešení struktury zkoumané molekuly.

Začneme atomem vodíku s chemickým posunem $\delta = 6.71$ ppm, který náleží atomu uhlíku o chemickém posunu $\delta = 109.3$ ppm. Jeho korelace přes tři vazby jsou dvě, obě směřují do aromatické části molekuly na atomy uhlíku s posuny $\delta = 142.8$ ppm a 125.0 ppm, jak naznačuje obr. 35.



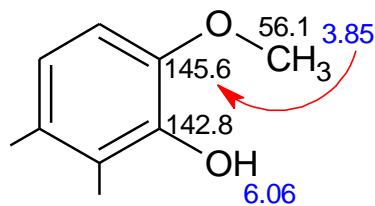
Obr. 35

V ^1H NMR spektru je signál vodíku s posunem $\delta = 6.71$ ppm štěpen interakční konstantou $J = 8.3$ Hz na dublet. Stejný tvar signálu štěpený se stejnou interakční konstantou má i vodík s chemickým posunem $\delta = 6.52$ ppm a je tedy zřejmé, že tyto atomy budou náležet sousedním uhlíkům. Tento fakt potvrzuje také spektrum gCOSY, v němž nacházíme vzájemnou korelaci těchto dvou atomů vodíku. Vodík s posunem $\delta = 6.52$ ppm náleží atomu uhlíku s posunem $\delta = 116.8$ ppm a má v gHMBC spektru korelace přes tři vazby na atomy uhlíku s posuny $\delta = 145.6$ ppm a $\delta = 126.0$ ppm. Tyto korelace dokazují přítomnost prvního aromatického jádra ve zkoumané molekule (obr. 36).



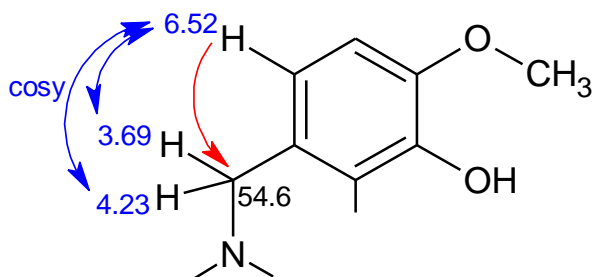
Obr. 36

Podle velikosti chemického posunu je zřejmé, že atomy uhlíku s posuny $\delta = 142.8$ ppm a $\delta = 145.6$ ppm jsou odstíněné atomem kyslíku. Atom uhlíku s posunem $\delta = 145.6$ ppm má v gHMBC spektru korelaci na atomy vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.85$ ppm. Tyto vodíky náleží uhlíku s posunem $\delta = 56.1$ ppm a tvoří zmiňovanou methoxyskupinu. Uhlík s posunem $\delta = 142.8$ ppm nemá žádnou korelaci přes tři vazby a s největší pravděpodobností bude odstíněn hydroxylovou skupinou, jejíž atom vodíku má chemický posun $\delta = 6.06$ ppm, viz obr. 37. Této skutečnosti odpovídá i tvar signálu zmíněného vodíku ($\delta = 6.06$ ppm) v ^1H NMR spektru.



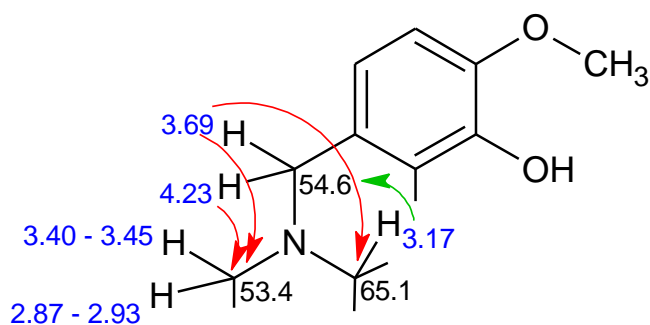
Obr. 37

Atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 6.52$ ppm má také jednu výraznou korelaci do alifatické části zkoumané molekuly, a sice na atom uhlíku o chemickém posunu $\delta = 54.6$ ppm. Tento uhlík nese dva atomy vodíku s chemickými posuny $\delta = 3.69$ ppm a $\delta = 4.23$ ppm. Signály vodíků v ^1H NMR spektru jsou štěpené, jedná se o dublety se stejnou interakční konstantou $J = 17.6$ Hz. A podle velikosti chemických posunů zmíněných atomů můžeme usuzovat, že se tato methylenová skupina bude nacházet v sousedství heteroatomu, nejpravděpodobněji dusíku (obr. 38).



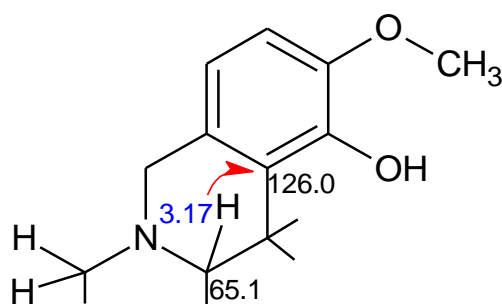
Obr. 38

Atomy vodíku s chemickými posuny $\delta = 3.69$ ppm a $\delta = 4.23$ ppm mají v gHMBC spektru korelace přes tři vazby na uhlík s posunem $\delta = 53.4$ ppm. Tento uhlík nese dva atomy vodíku o chemických posunech $\delta = 3.40 - 3.45$ ppm a $\delta = 2.87 - 2.93$ ppm. Odstínění atomů opět odpovídá přítomnosti atomu dusíku v sousedství. Vodík s posunem $\delta = 3.69$ ppm má navíc korelaci na atom uhlíku s posunem $\delta = 65.1$ ppm. Ten nese atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.17$ ppm, který má korelaci na uhlík $\delta = 54.6$ ppm. Signály odstíněné k vyšším hodnotám ppm opět potvrzují přítomnost atomu dusíku. Vše znázorňuje obr. 39.



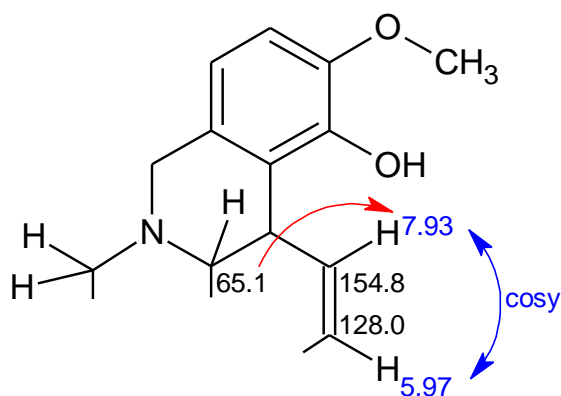
Obr. 39

Atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 3.17$ ppm má korelaci přes tři vazby na aromatický uhlík s posunem $\delta = 126.0$ ppm a dokazuje tak uzavření druhého kruhu ve zkoumané molekule, viz obr. 40.



Obr. 40

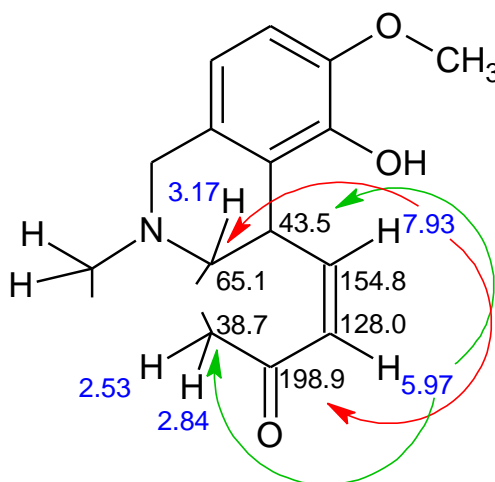
Atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 65.1$ ppm má výraznou korelaci v gHMBC spektru na aromatický vodík o chemickém posunu $\delta = 7.93$ ppm, který náleží uhlíku s posunem $\delta = 154.8$ ppm. Signál toho vodíku v ^1H NMR spektru je štěpený a tvarem se jedná o dublet ($J = 9.8$ Hz). Stejnou interakční konstantou je štěpen i signál atomu vodíku s posunem $\delta = 5.97$ ppm, který se tedy nachází na sousedním atomu uhlíku s posunem $\delta = 128.0$ ppm, jak je znázorněno na obr. 41. Samozřejmě tento fakt potvrzuje i korelace zmíněných vodíků ve spektru gCOSY.



Obr. 41

Vodík s chemickým posunem $\delta = 7.93$ ppm má jednak již zmiňovanou korelaci na uhlík s posunem $\delta = 65.1$ ppm, ale má také výraznou korelaci na atom uhlíku s chemickým posunem $\delta = 198.9$ ppm. Jedná se o kvarterní uhlík, z jehož odstínění je patrné, že bude náležet karbonylové skupině.

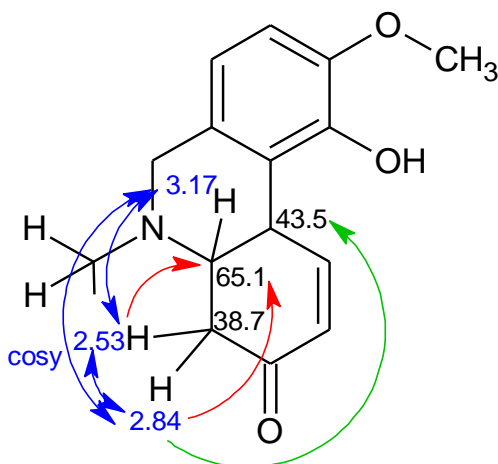
Atom vodíku s chemickým posunem $\delta = 5.97$ ppm má výraznou korelaci přes tři vazby na alifatický uhlík s posunem $\delta = 43.5$ ppm, dále méně výraznou korelaci na uhlík s posunem $\delta = 38.7$ ppm, který náleží methylenové skupině a nese tedy dva atomy vodíku ($\delta = 2.53$ ppm a $\delta = 2.84$ ppm). Výše zmíněné korelace vystihnuje obr. 42



Obr. 42

Signál vodíku $\delta = 3.17$ ppm má v ^1H NMR spektru tvar dublet dubletu ($J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 14.2$ Hz) a je tedy zřejmé, že je štěpen dvěma atomy vodíku, které leží na sousedním atomu uhlíku. Podle interakčních konstant lze vysledovat, že se jedná o atomy vodíku s posuny $\delta = 2.53$ ppm ($J_1 = 14.2$ Hz a $J_2 = 16.5$ Hz) a $\delta = 2.84$ ppm ($J_1 = 4.0$ Hz a $J_2 = 16.5$ Hz), jejich signály mají také tvar dublet dubletu. Atom uhlíku této methylenové skupiny

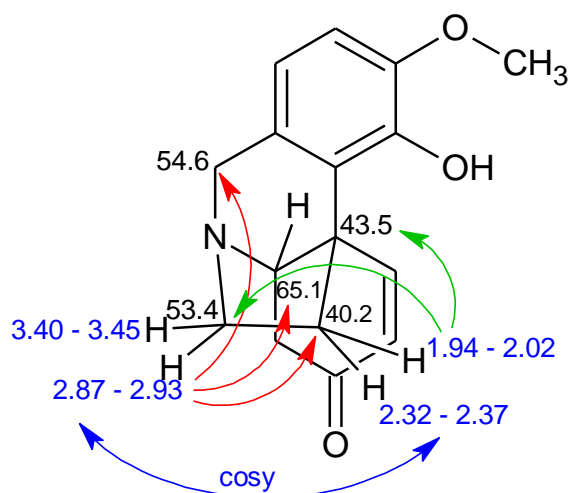
má v ^{13}C NMR spektru chemický posun $\delta = 38.7$ ppm. Všechny zmiňované atomy vodíku vykazují korelaci ve spektru gCOSY. Navíc nacházíme výraznou korelaci atomů vodíku ($\delta = 2.53$ ppm a $\delta = 2.84$ ppm) na uhlík s posunem $\delta = 65.1$ ppm (obr. 43). Vodík s posunem $\delta = 2.84$ ppm vyazuje také výraznou korelaci na kvarterní uhlík s posunem $\delta = 43.5$ ppm. Z výše uvedeného a níže zobrazeného je zřejmé, že došlo k uzavření třetího kruhu ve zkoumané molekule.



Obr. 43

Zbývá dořešit dusíkem odstíněnou methylenovou skupinu, jejíž atomy vodíku mají chemické posuny $\delta = 2.87 - 2.93$ ppm a $\delta = 3.40 - 3.45$ ppm a v ^1H NMR spektru mají tvar multiplu. Tyto vodíky náleží atomu uhlíku s posunem $\delta = 53.4$ ppm. Také zůstává nedořešen uhlík s posunem 43.5 ppm, který je dle spekter kvarterní.

Korelace vodíku s posunem $\delta = 2.87 - 2.93$ ppm přes tři vazby směřují na dusíkem odstíněné uhlíky s posuny $\delta = 65.1$ ppm a 54.6 ppm. Poslední korelace zmiňovaného vodíku je slabá a patří k uhlíku 40.2 ppm. Tento posledně zmíněný uhlík nese dva atomy vodíku s posuny $\delta = 1.94 - 2.02$ ppm a $\delta = 2.32 - 2.37$ ppm. Vodík s posunem $\delta = 1.94 - 2.02$ ppm má v gHMBC spektru výrazné korelace na uhlíky $\delta = 53.4$ ppm a $\delta = 43.5$ ppm. Ze spektra gCOSY je zřejmé, že zmíněné methylenové skupiny se nacházejí v sousedství. Z výše uváděných skutečností lze udělat závěr, že v molekule se uzavírá čtvrtý a tím i poslední kruh viz. obr. 44.

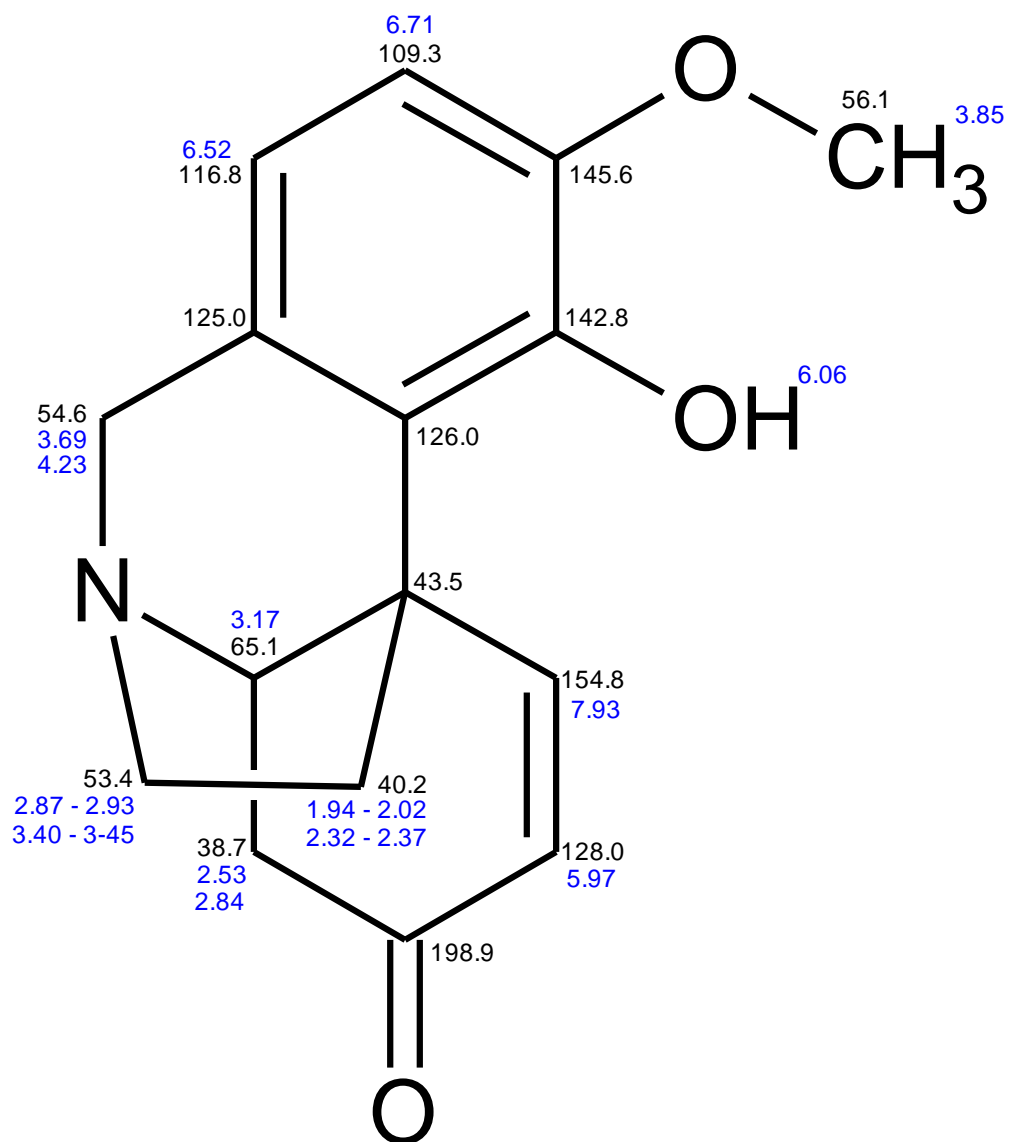


Obr. 44

Molekulová hmotnost naměřená pomocí hmotnostní spektrometrie koreluje s určenou strukturou i všechny signály NMR spekter byly ve struktuře zabudovány. Uvedená struktura odpovídá seco-isopowellaminonu²².

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃): δ 4.23 (1H, d, $J = 17.6$ Hz), 3.69 (1H, d, $J = 17.6$ Hz), 3.85 (3H, s), 3.40 – 3.45 (1H, m), 3.17 (1H, dd, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 14.2$ Hz), 2.87 – 2.93 (1H, m), 2.84 (1H, dd, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 16.5$ Hz), 2.53 (1H, dd, $J_1 = 14.2$ Hz, $J_2 = 16.5$ Hz), 2.32 – 2.37 (1H, m), 1.94 – 2.02 (1H, m)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 198.9, 154.8, 145.6, 142.8, 128.0, 126.0, 125.0, 116.8, 109.3, 65.1, 56.1, 54.6, 53.5, 43.5, 40.2, 38.7



5. Závěr

V této rigorózní byla řešena struktura tří neznámých látek izolovaných z přírodních zdrojů - konkrétně z rostlin *Berberis vulgaris* L. (čeleď Berberidaceae) a *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol (čeleď Amarillidaceae). Neznámé sloučeniny byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Následně byla u všech tří látek provedena NMR analýza na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Výsledkem je určení struktury všech tří neznámých látek.

Látka označená kódem B11 byla izolována rovněž z rostliny *Berberis vulgaris* L. a po porovnání s literaturou bylo zjištěno, že již byla popsána jako 8-trichlormethyl-dihydroberberin. Jedná se o izolační artefakt, nikoliv přímo o sekundární metabolit rostliny.

Neznámá molekula s kódovým označením HA2 pocházející z rostliny *Berberis vulgaris* L. byla již popsána jako muraricin. Jedná se o novou látku, která nebyla synteticky připravena a izolována byla poprvé právě Mgr. Annou Hošťálkovou, PhD.

Poslední zkoumaná molekula nesla kódové označení NP-D-4/3 a byla získána izolací z rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol. Po provedení NMR analýzy a porovnání s literaturou docházíme k závěru, že se jedná o seco-isopowellaminon.

6. Seznam literatury

1. HECKER, U. Stromy a keře: klíč ke spolehlivému určování - 3 znaky. 2. vyd. Editor Miroslav Volf. Čestlice: Rebo, 2009, 238 s. Průvodce přírodou (Rebo). ISBN 978-80-255-0291-4. Dříšťál obecný, s. 102
2. BALOUN, J.; JAHODÁŘ, L.; LEIFERTOVIÁ, I.; ŠTÍPEK, S. Rostliny způsobující otravy a alergie. Praha: Avicenum, 1989. 267 s. ISBN 08-083-89. *Berberis vulgaris* L., s. 89 – 90.
3. KORBELÁŘ, J., ENDRIS Z. Naše rostliny v lékařství. 4. vyd. Ilustrace Krejča, J. Praha: Avicenum, 1973, 493 s. ISBN 08-006-74. Dříšťál, *Berberis vulgaris* L., s. 128.
4. <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/607-berberis-vulgaris-dristal-obecny> (citováno 2.1.2016)
5. Arayne, M. S.; Sultana, N.; Bahadur, S. S. The Berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. Pakistan Journal of Pharmaceurical Sciences. 2007, 20, 83-92
6. <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=142> (citováno 2.1.2016)
7. Novák Z.: Analýza struktury alkaloidů metodami multidimensionální NMR spektroskopie. (dizertační práce) Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015, s. 8 - 10
8. Hussain, S.F.; Siddiqui, M.T.; Shamma, M. Berbidine: a simple isoquinoline-isoquinolone dimer. Journal of Natural Products. 1989, 52, 317-319
9. Cava, M.P.; Wakisaka, K.; Noguchi, I.; Edie, D.L. Phlebicine, a New Bisphenylbisbenzylisoquinoline Alkaloid from *Crematosperma polyphlebum*. Journal of The Organic Chemistry. 1974, 39, 3588-359.1
10. 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.
11. <http://botany.cz/cs/narcissus-poeticus/> (citováno 9.1.2016)
12. Bryan J. E.: Cibuloviny: kapesní atlas, Praha: Knižní klub, 2010, 224 s. ISBN 978-80-242-2716-0. *Narcissus poeticus*, s. 152

13. van Dijk H., Kurpershoek M.: Encyklopedie cibulnatých a hlíznatých okrasných rostlin. Čestlice: Rebo, 2002, 336 s. ISBN 80-7234-203-7. *Narcissus* skupina *poeticus*, str. 245
14. Brickell, Ch.: Velká encyklopedie květin a okrasných rostlin, Euromedia group - Ikar, 2000, 597 s. ISBN 80-7202-719-0. *N. Poeticus*, s. 513
15. KŘESADLOVÁ, Lenka a Stanislav VILÍM. *Encyklopedie tulipánů, hyacintů, begonií a dalších cibulnatých a hlíznatých rostlin*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2009, 615 s. ISBN 978-80-251-2830-5. *Narcissus poeticus*, s. 455
16. López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 71. 2002, 2521 - 2529
17. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 13. 2015, 394 - 398
18. Zhauynkaeva K.S., Malikova M.Kh., Rakhimov D.A., Khushbaktova Z.A. Water - soluble polysaccharides from *Narcissus poeticus* and their biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 2003, 520 - 521
19. Li X., Lu M., Tang D., Shi Y. Composition of Carotenoids and Flavonoids in *Narcissus* Cultivars and their Relationship with Flower Color. *PLoS ONE* 10 (11): e0142074. doi: 10.1371/journal.pone.0142074, 2015
20. Hošťálková A.: Studium obsahových látek vybraných taxonů z řádů Laurales a Ranunculales s potencialně neuroprotektivní aktivitou. Doktorská disertační práce. 2015, s. 83-84
21. Marek R., Sečkářová P., Hulová D., Marek J., Dostál J., Sklenář V.: Palmatine and Berberine Isolation Artifacts. *Journal of Natural Products*. 2003, 66, 481-6
22. Kogure N., Katsuta N., Kitajima M., Takyama H.: Two New alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum*. *Chem. Pharm. Bull.* 59 (12), 2011, 1545-8

7. Seznam příloh

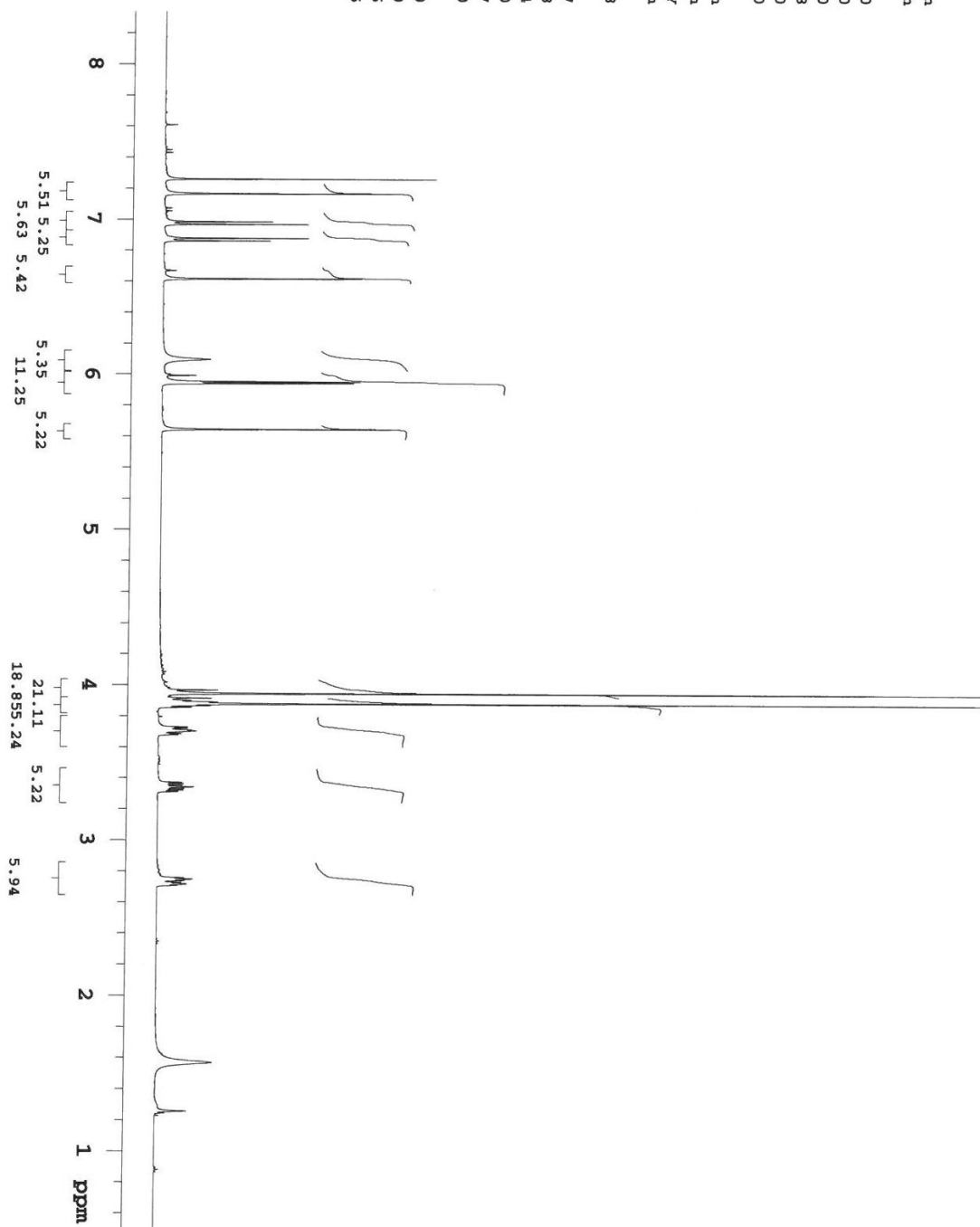
NMR spektra sloučeniny B11	54
¹³ C - NMR.....	56
gCOSY	57
gHSQC.....	58
gHMBC.....	59
NOESY	60
NMR spektra sloučeniny HA2.....	61
¹ H – NMR	62
¹³ C – NMR.....	63
gCOSY	64
gHSQC.....	65
gHMBC.....	66
NOESY	67
NMR spektra sloučeniny NP-D-4/3.....	68
¹ H – NMR	69
¹³ C – NMR.....	70
gCOSY	71
gHSQC.....	72
gHMBC.....	73
NOESY	74

NMR spektra sloučeniny B11

B11

expt1 PROTON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Feb 14 2014 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vnmr1/v~ SPECIAL
nmrSYS/data/nuclie/~ temp 25.0
Berberis_vulgaris/~ gain 30
B11/B11_Hr.fid spin 20
ACQUISITION  hat 0.008
sw 3930.8 pw90 9.100
at 4.000 alfa 10.000
np 31446 FLAGS
fb 4000 il n
bs 32 in n
dl 1.000 dp Y
nt 32 hs nm
ct 32 PROCESSING
TRANSMITTER fn 524288
tn H1 DISPLAY
sfreq 499.865 sp 236.7
tof -291.1 wp 3930.8
tpwr 60 rfl 3392.4
pw 4.550 rfp 3629.0
DECOUPLER ip 92.7
dn C13 lp 0
dof 0 PLOT
dm nm wc 200
decwave W40_OneNMR~ sc 0
_W018 vs 416
dpwr 37 th 45
dmf 32258 al cdc ph
```



¹H - NMR

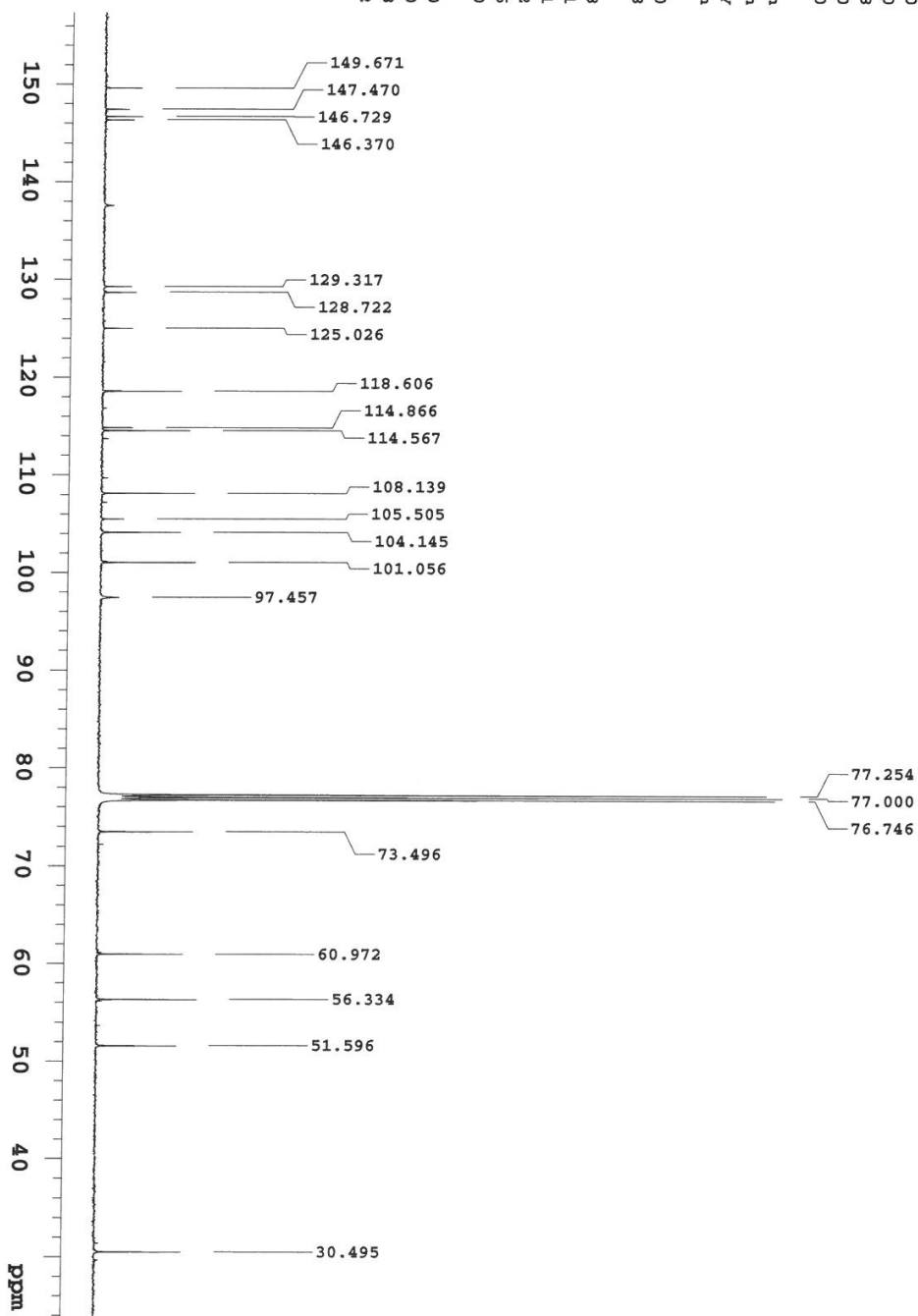
¹³C - NMR

B11

exp2 CARBON

```

SAMPLE      PRESATURATION
date Feb 14 2014 satmode n
solvent cdc13 wet n
file /home/vnmr1/v- SPECIAL
nmrsysa/data/lucifer/~ temp 25.0
Berberis_vulgaris/~ gain 30
B11/B11_Cr.fid spin 20
ACQUISITION hst 0.008
sw 31250.0 pw90 11.300
at 1.049 alfa 10.000
np 65536
fb 17000 il
bs 2 in n
d1 3.000 dp y
nt 4000 hs nm
ct 4000 PROCESSING 2.00
TRANSMITTER lb 524288
tn C13 fm
sfrq 125.705 DISPLAY 2953.8
tof 1913.9 sp 16825.1
cpwr 55 wp 11479.1
pw 5.650 rfl 9678.2
DECOUPLER H1 rfp -92.6
dn H1 ip 0
dof 0 lp 0
dm YYY PLOT 200
decwawe w wc 0
dpcwr 41 sc 0
dmf 12346 vs 41578
ai cdc ph 2
    
```



B11

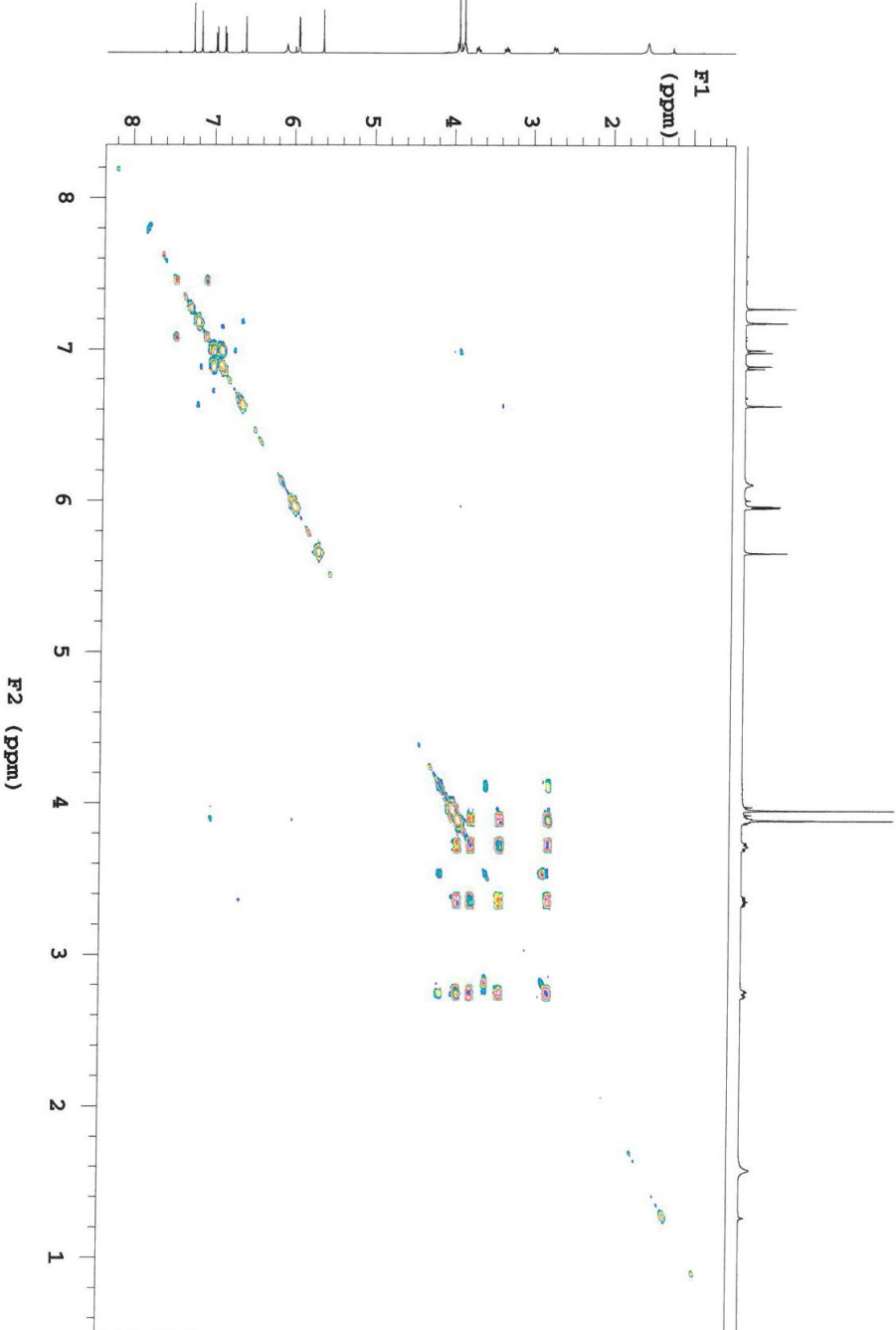
Sample Name:
Data Collected on:
vnmr500-vnmr500
Archive directory:

Sample directory:

File: B11_Cosy

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Feb 14 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3930.8 Hz
2D Width 3930.8 Hz
8 repetitions
256 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.065 sec
F2 size 2048 x 2048
Total time 41 min



gCOSY

B11

Sample Name:

Data collected on:
vnmr500-vnmr500
Archive directory:

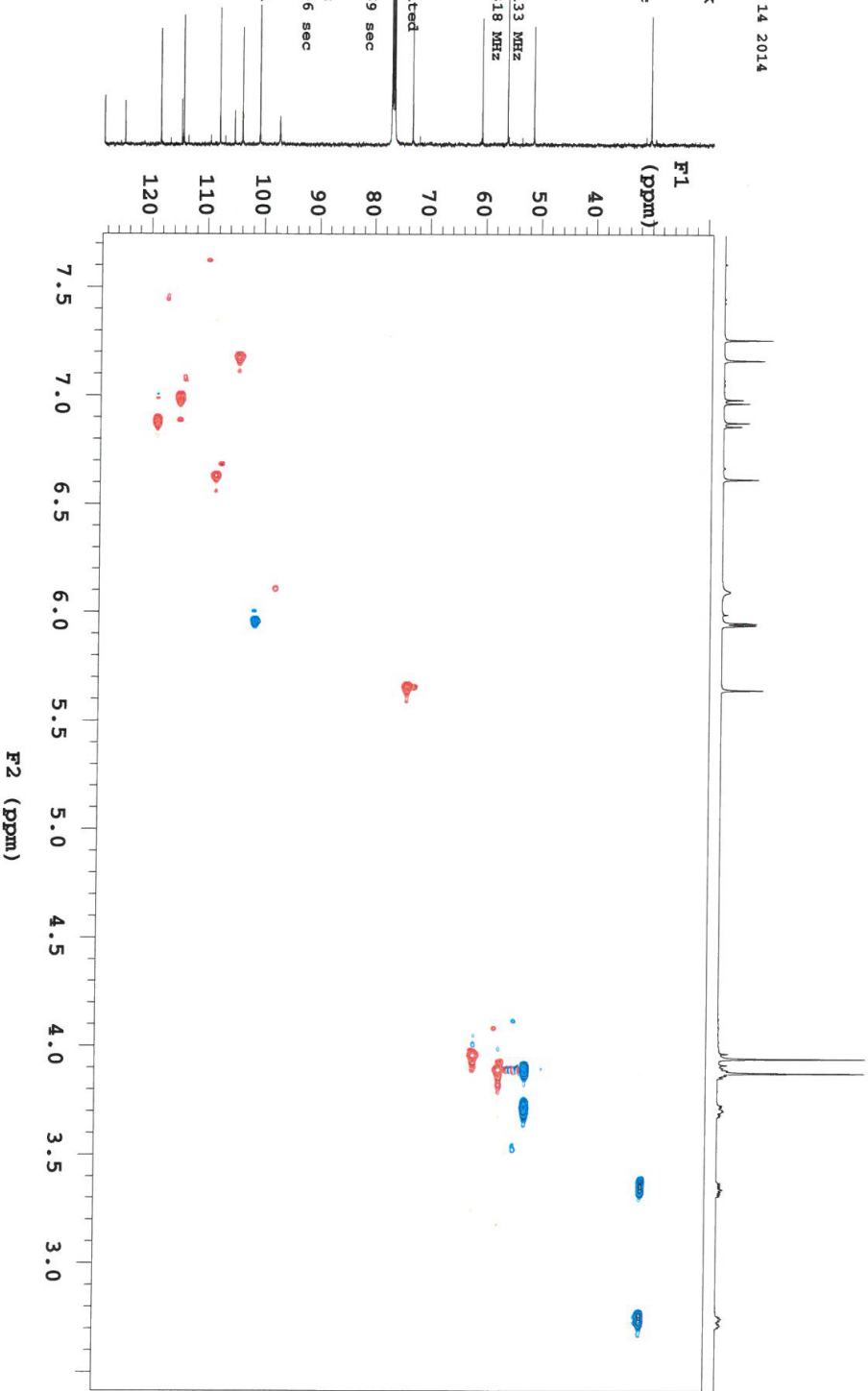
Sample directory:

Fidfile: B11_Het

Pulse Sequence: ghsqc
Solvent: cdcl3
Data collected on: Feb 14 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.306 sec
Width 3930.8 Hz
2D Width 21367.5 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DECOUPLE C13, 125.7001318 MHz
Power 37 db
on during acquisition
off during delay
W40 OneNMR w018 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
Gauss apodization 0.006 sec
FT size 4096 x 2048
Total time 1 hr, 32 min



gHSQC



B11

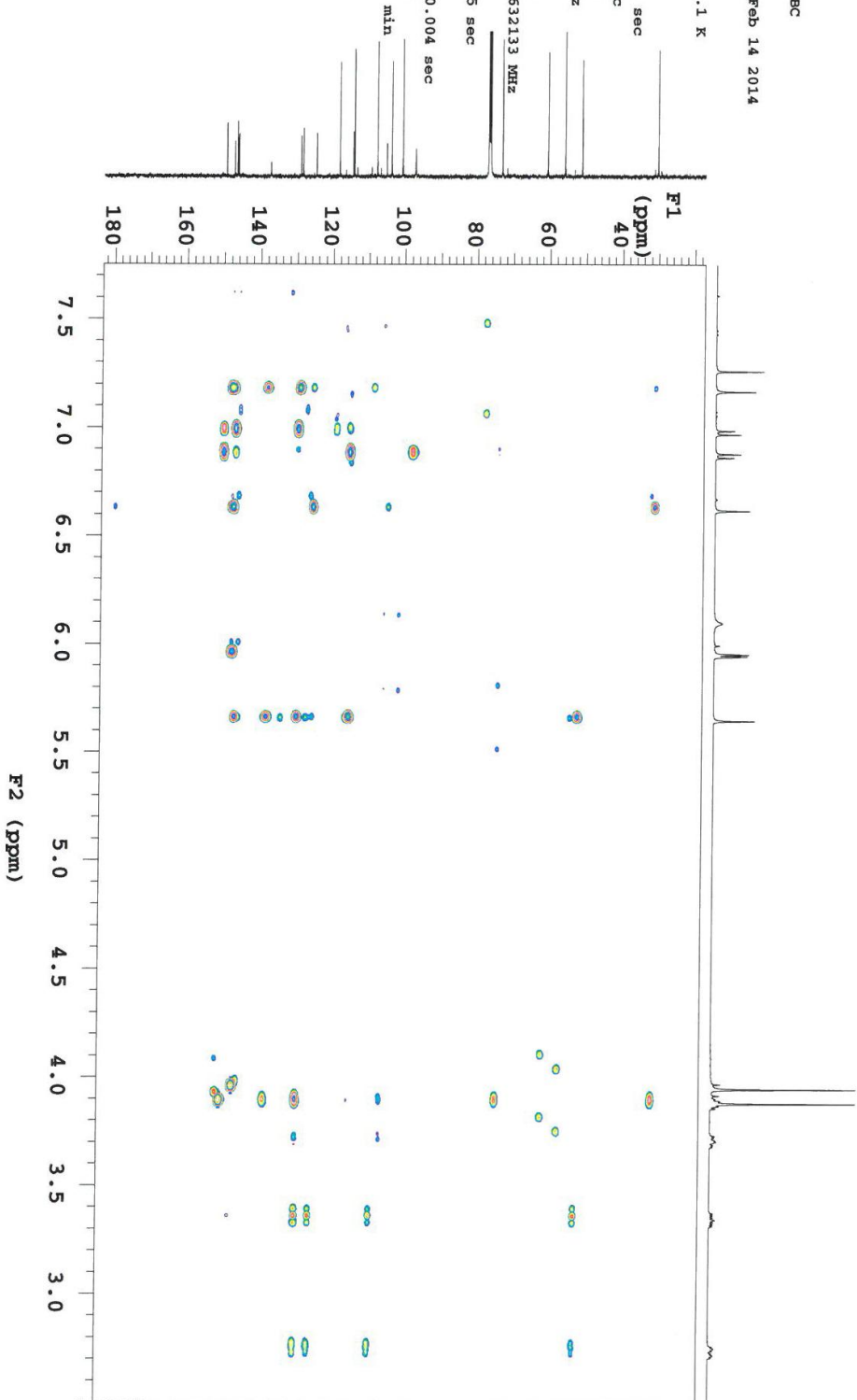
Sample Name:
Data Collected on:
vnmrs500-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

Fidfile: B11_IR

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: cdcl3
Data collected on: Feb 14 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.306 sec
Width 3930.8 Hz
2D Width 30165.9 Hz
32 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Sd. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.004 sec
F1 size 4096 x 2048
Total time 6 hr, 20 min



gHMBC



B11

Sample Name:

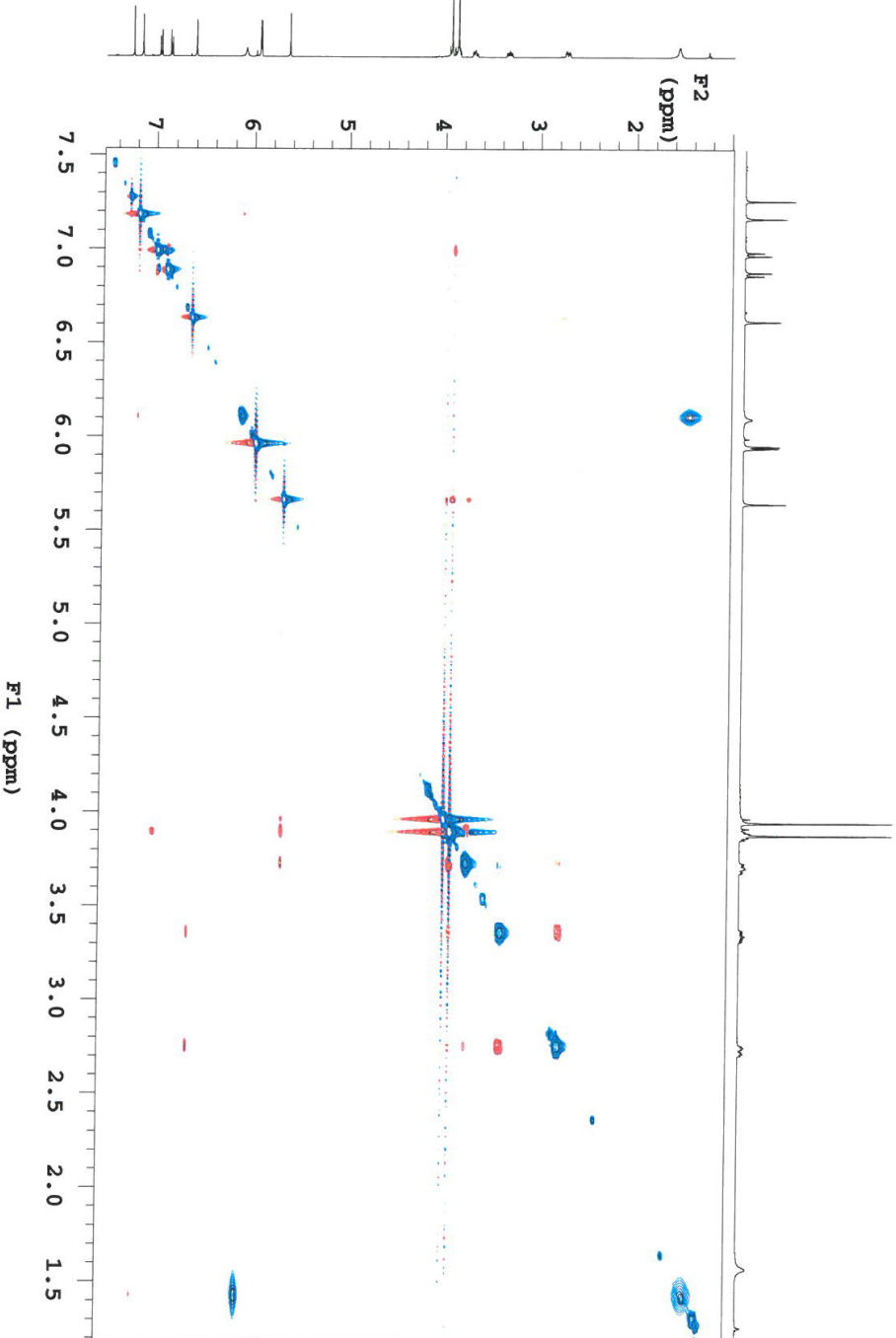
Data Collected on:
vnmrs500-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

F1File: B11_NOESY

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Feb 14 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3930.8 Hz
2D Width 3930.8 Hz
32 repetitions
2 x 512 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.051 sec
F1 size 4096 x 4096
Total time 14 hr, 45 min



NOESY



NMR spektra sloučeniny HA2

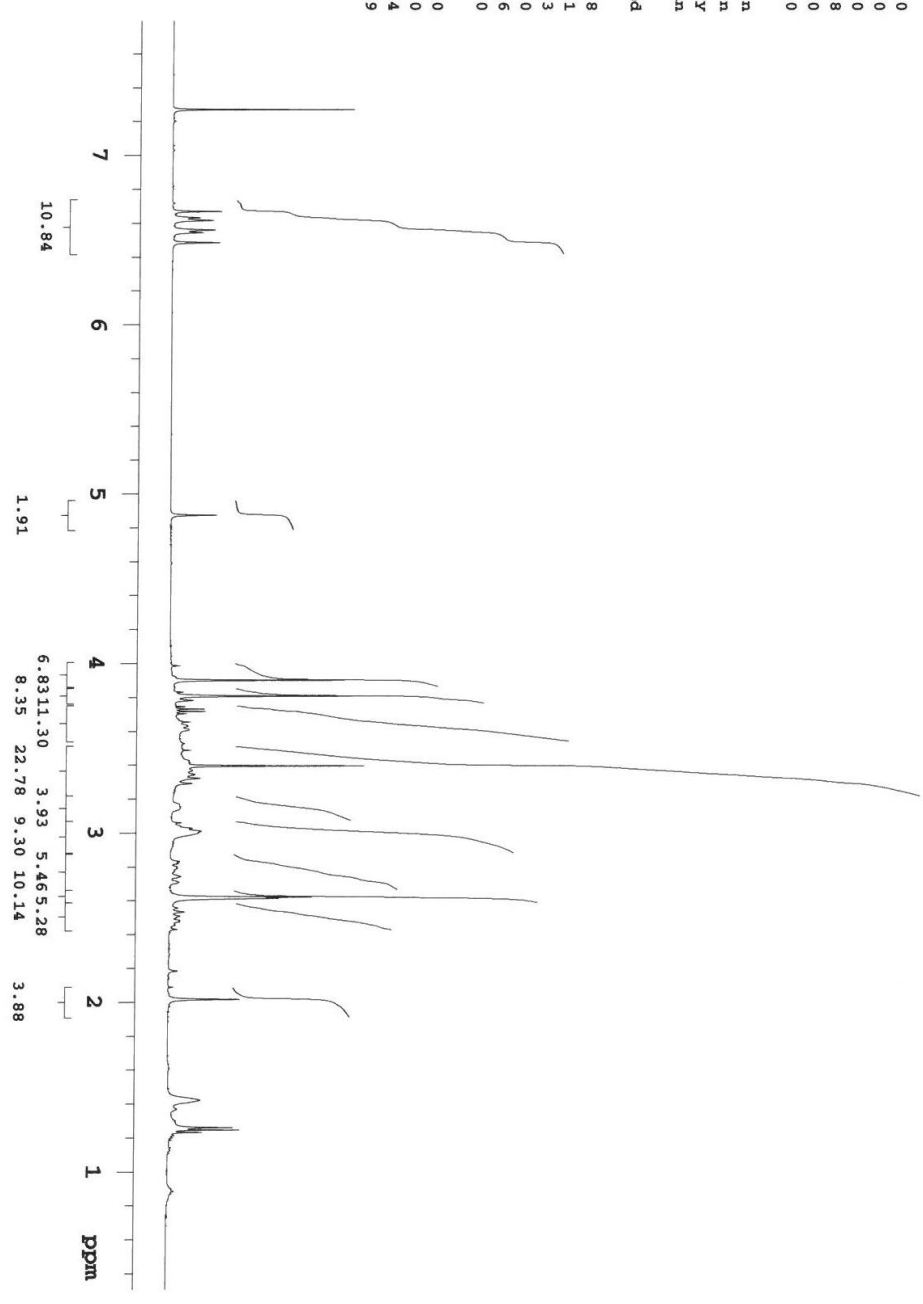
¹H - NMR

```

HA2
exp1 PROTON

SAMPLE PRESATURATION
date Aug 5 2013 satmode n
solvent cdc13 wet n
file /home/vnmr1/v~ SPECTAL
nmrsgs/data/lucile/~ temp 25.0
Berberis_vulgaris/~ gain 30
HA2/HA2_H.fid spin 20
ACQUISITION hst 0.008
sw 3742.5 pw90 9.100
at 2.189 alfa 10.000
np 16384 FLAGS
fb 4000 i1 n
bs 32 in n
dl 1.000 dp y
nt 32 hs nm
ct 32 PROCESSING

TRANSMITTER fn not used
tn H1 DISPLAY
sfreq 499.865 sp 153.8
tof -474.7 wp 3742.1
tpwr 60 xfi -153.3
pw 4.550 xfp 0
DECOUPLER tp 74.6
dn C13 1p 0
dof 0 PLOT
dm mm wc 200
decwave W40_OneNMR~ sc 0
_M018 vs 384
dpwr 37 th 49
dmf 32258 ai cdc ph
  
```

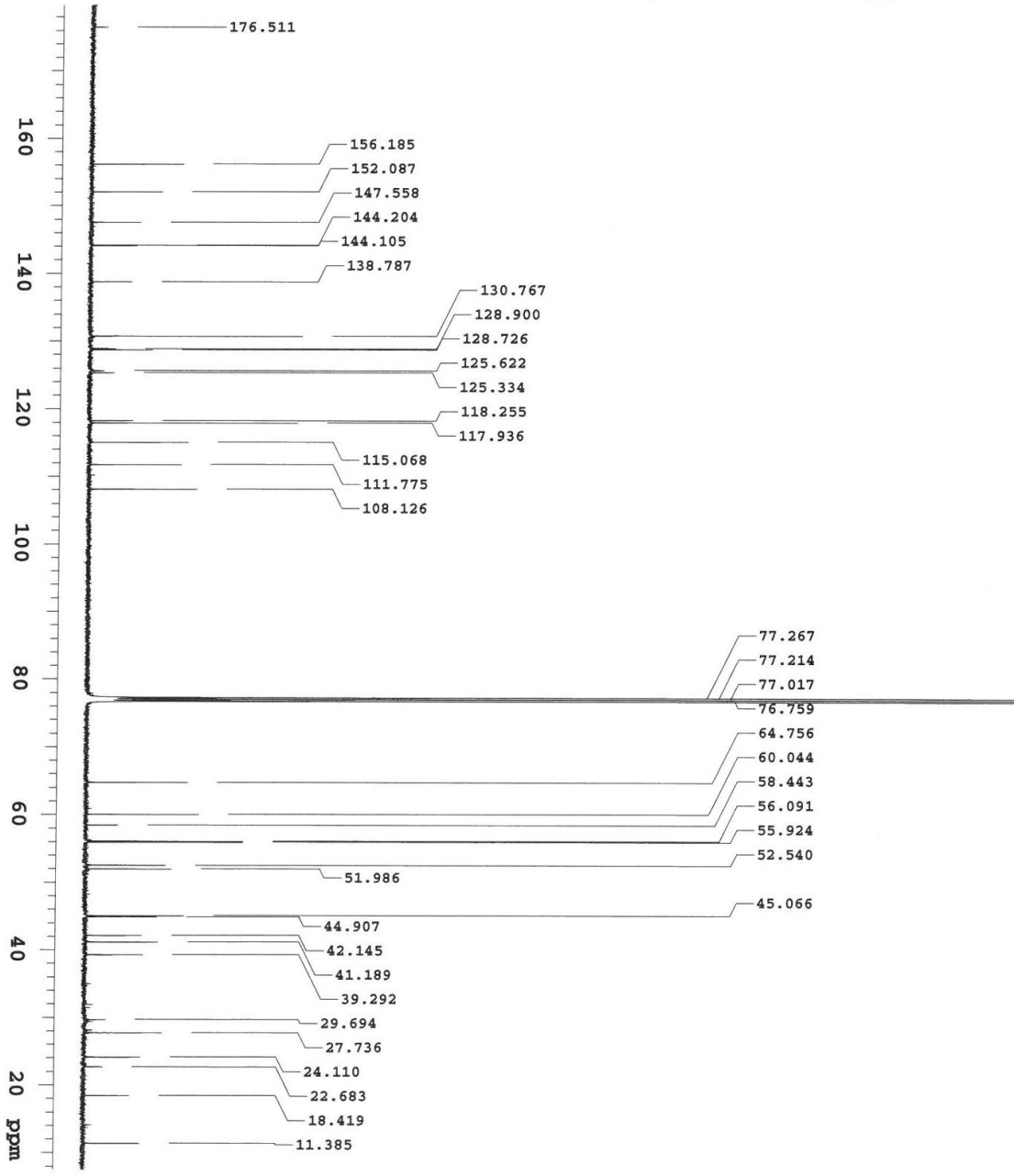


¹³C - NMR

HA2
exp2 CARBON

```

SAMPLE      PRESATURATION
date      Aug 5 2013      satmode
solvent    cdcl3          wet
file       /home/vmri/v-
nmrSYS/data/luclie/- temp
Berberis_vulgariis/- gain
HA2/HA2.C.fid      spin
ACQUISITION      hst
sw      31250.0      pw90      11.300
at      1.049      alfa      10.000
np      65536
fb      17000      fl
bs      1      in
dl      4.000      dp
nt      25000      hs
ct      25000
TRANSMITTER      lb
tn      C13      fn
sfreq      125.705      DISPLAY
tof      1913.9      sp
lpwr      55      wp      21649.4
pw      5.650      rfl      1799.1
DECOUPLER      rfp
dn      H1      rp      -119.1
dof      0      lp
dm      YYY      PLOT
decwave      w      wc      200
dpxr      41      sc      0
dnt      12346      vs      91977
ai      cdc      ph      2
    
```



HA2

Sample Name:
Data Collected on:
vnmr500-vnmr500
Archive directory:

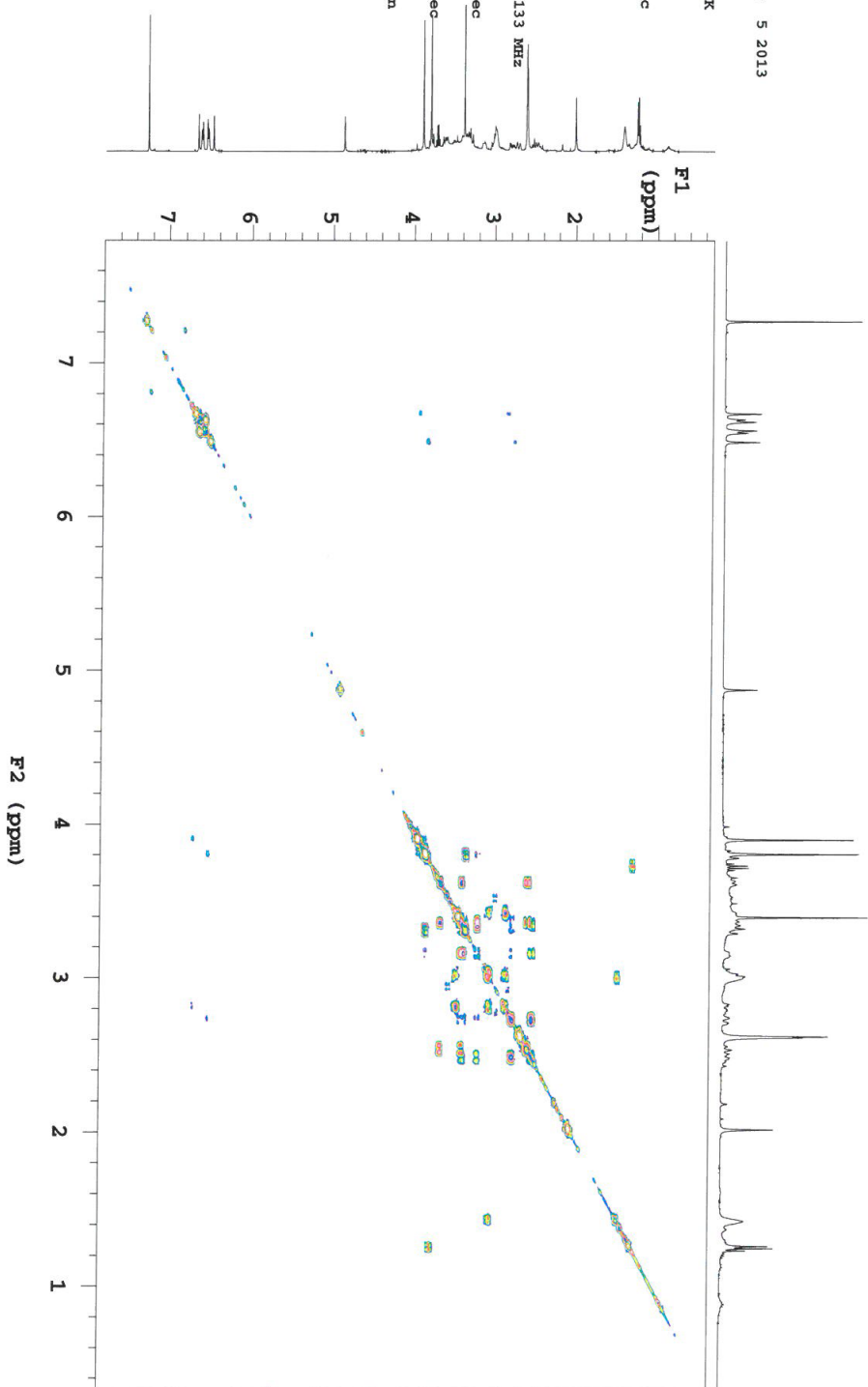
Sample directory:

Fidfile: HA2_Cosy

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Aug 5 2013

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3742.5 Hz
2D Width 3742.5 Hz
16 repetitions
256 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.068 sec
F2 size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 23 min



gCOSY

new experiment

Sample Name:

Data Collected on:

vmnr550-vmnr5500

Archive directory:

Sample directory:

FidFile: HA2_Het

Pulse Sequence: gHSQC

Solvent: cdcl3

Data collected on: Aug 5 2013

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vmnr1

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 8012.8 Hz

2D Width 21367.5 Hz

32 repetitions

2 x 512 increments

OBSERVE H1, 499.863213 MHz

DECOUPLE C13, 125.7001318 MHz

Power 37 dB

on during acquisition

off during delay

W40 OneNMR_W018 modulated

DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

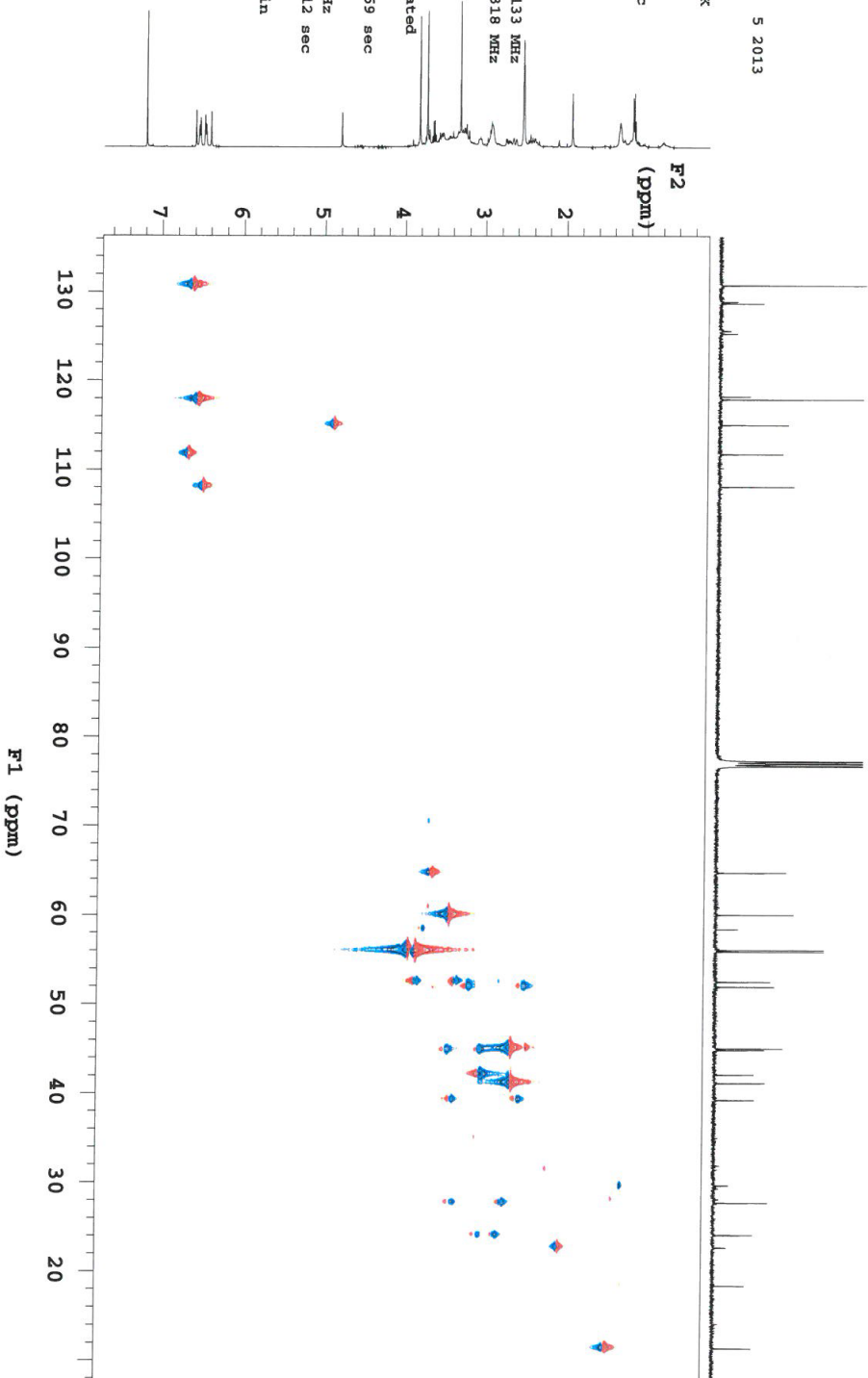
Line broadening 45.5 Hz

Gauss apodization 0.012 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 10 hr, 55 min

gHSQC



HA2

Sample Name:
Data Collected on:
vnmrs500-vnmrs500
Archive directory:

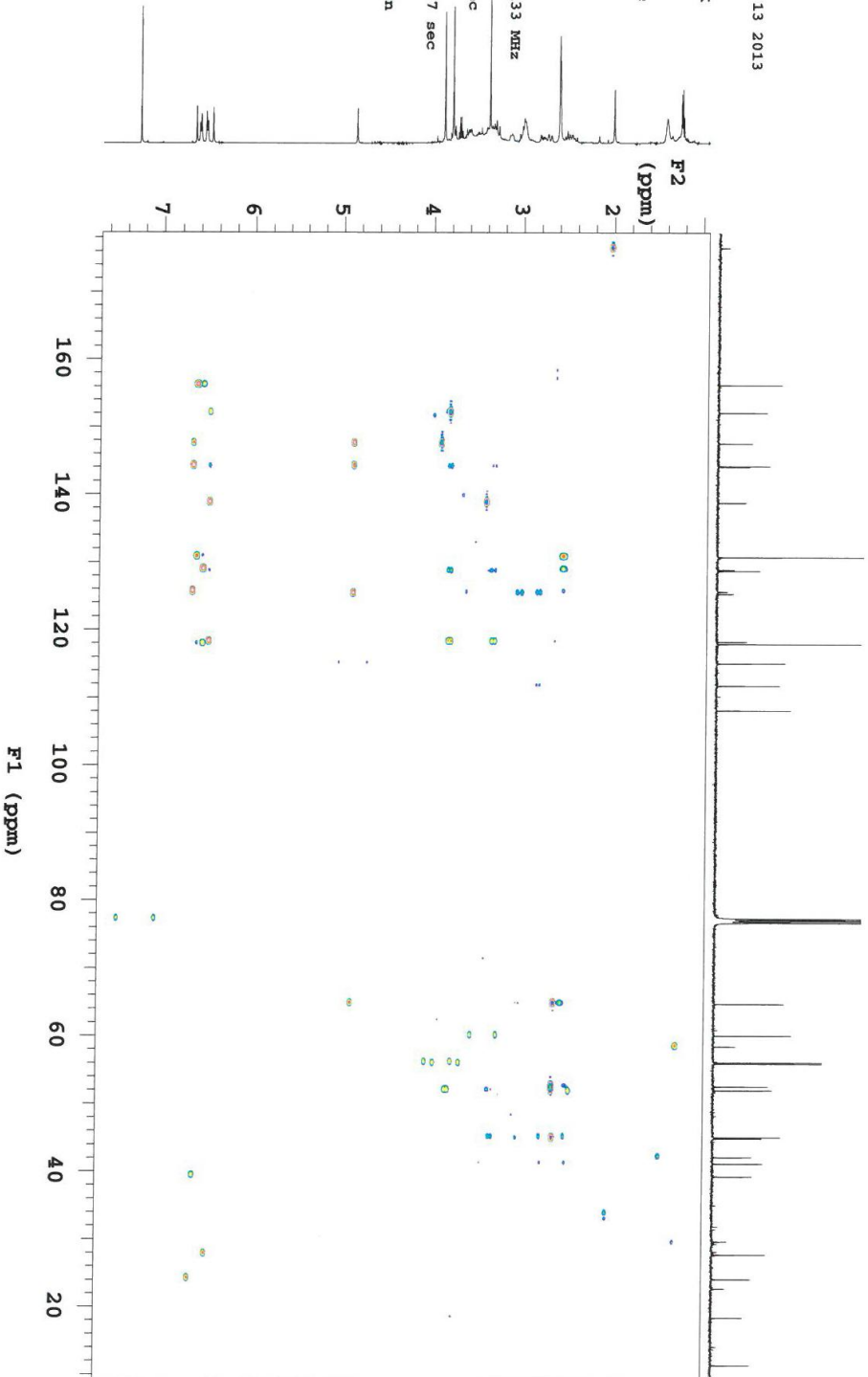
Sample directory:

Fidfile: HA2_IR

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: cdcl3
Data collected on: Aug 13 2013

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.321 sec
Width 3742.5 Hz
2D Width 30165.9 Hz
64 repetitions
2 x 512 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Sd. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.007 sec
Ft size 4096 x 4096
Total time 25 hr, 41 min

gHMBC



HA2

Sample Name:

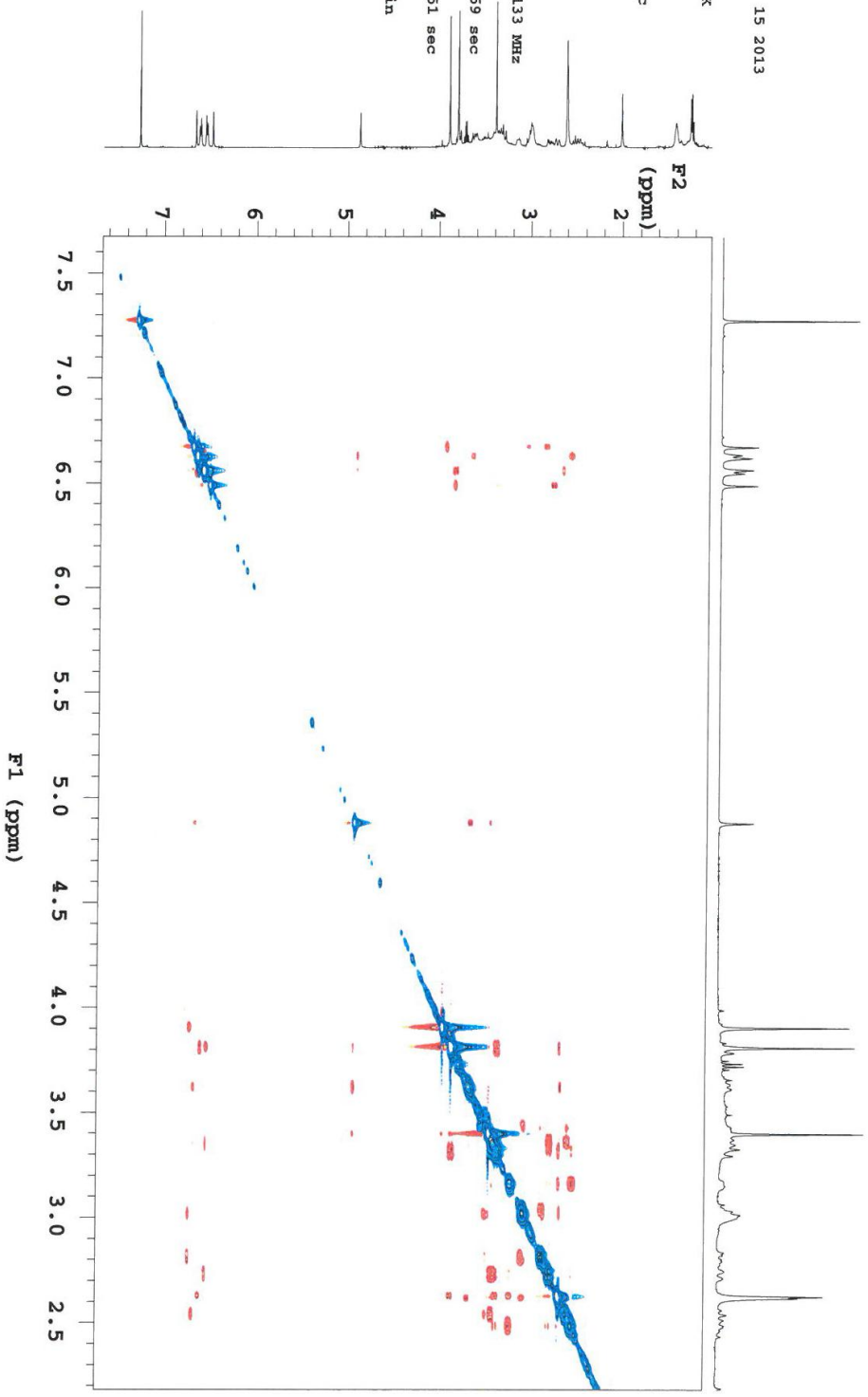
Data Collected on:
vnmrs500-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

Filefile: HA2_NOESY

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Aug 15 2013

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3742.5 Hz
2D Width 3742.5 Hz
64 repetitions
2 x 512 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.051 sec
F1 size 4096 x 4096
Total time 31 hr, 22 min



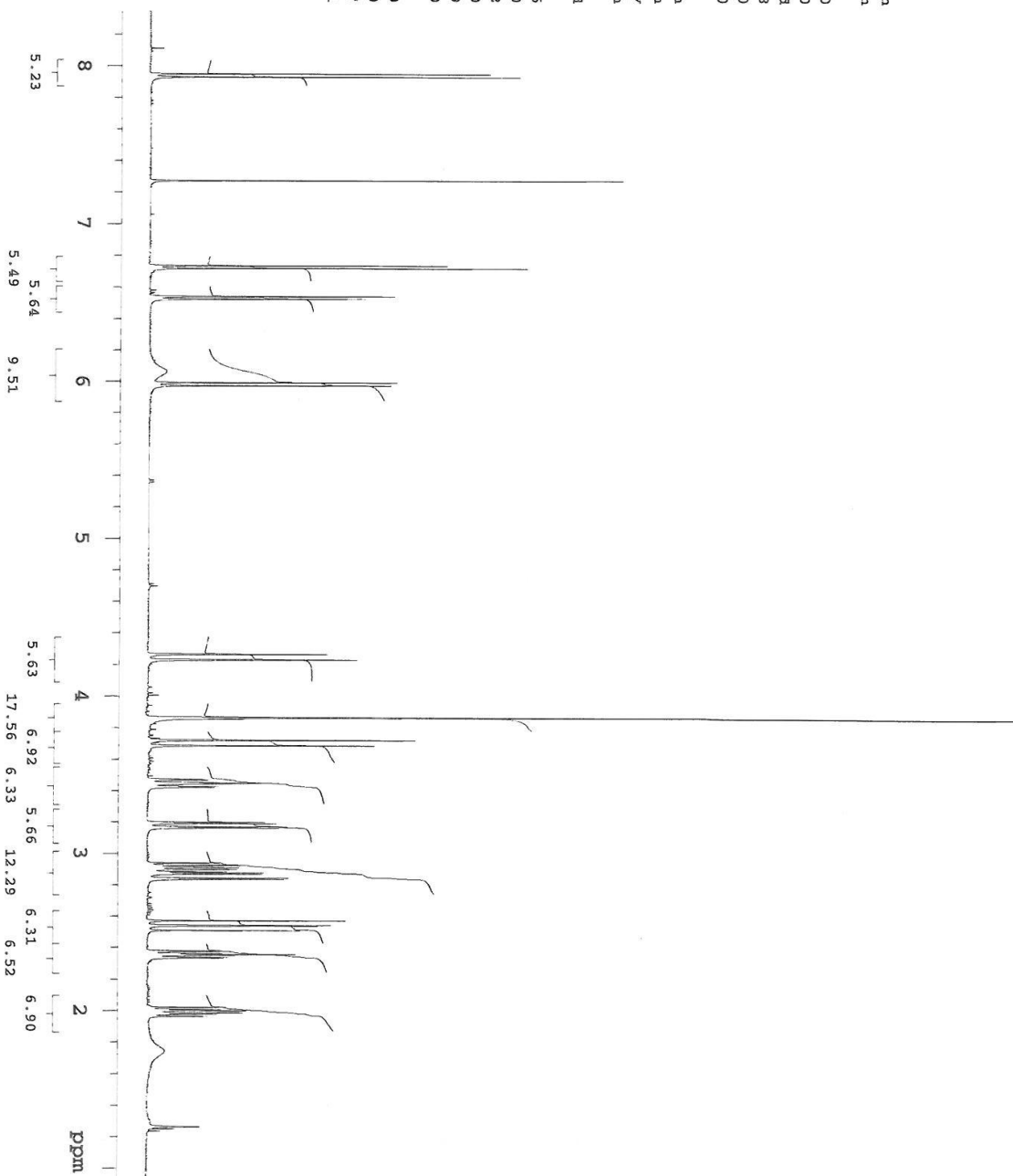
NOESY

NMR spektra sloučeniny NP-D-4/3

¹H - NMR

NP-D-4-3
exp240 PROTON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Jun 21 2015	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	n
ACQUISITION			
sw	8012.8	temp	25.0
at	2.045	spin	not used
mp	32768	hst	0.008
fb	4000	pw90	9.100
bs	32	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	8	i1	n
ct	8	in	n
tn	TRANSMITTER	dp	y
strq	499.866	hs	nm
tof	499.9	fn	not used
tpwr	60	DISPLAY	
pw	4.550	sp	459.5
DECOUPLER			
dn	C13	wp	3712.0
doe	0	rfl	1007.2
dm	nm	rfg	0
decwave	W40_OrbNMR-1p	tp	-78.9
decwave	W018	PLOR	0
dpwr	37	wc	200
dmf	32258	sc	0
		vs	347
		th	11
		ai	cdc
		ph	

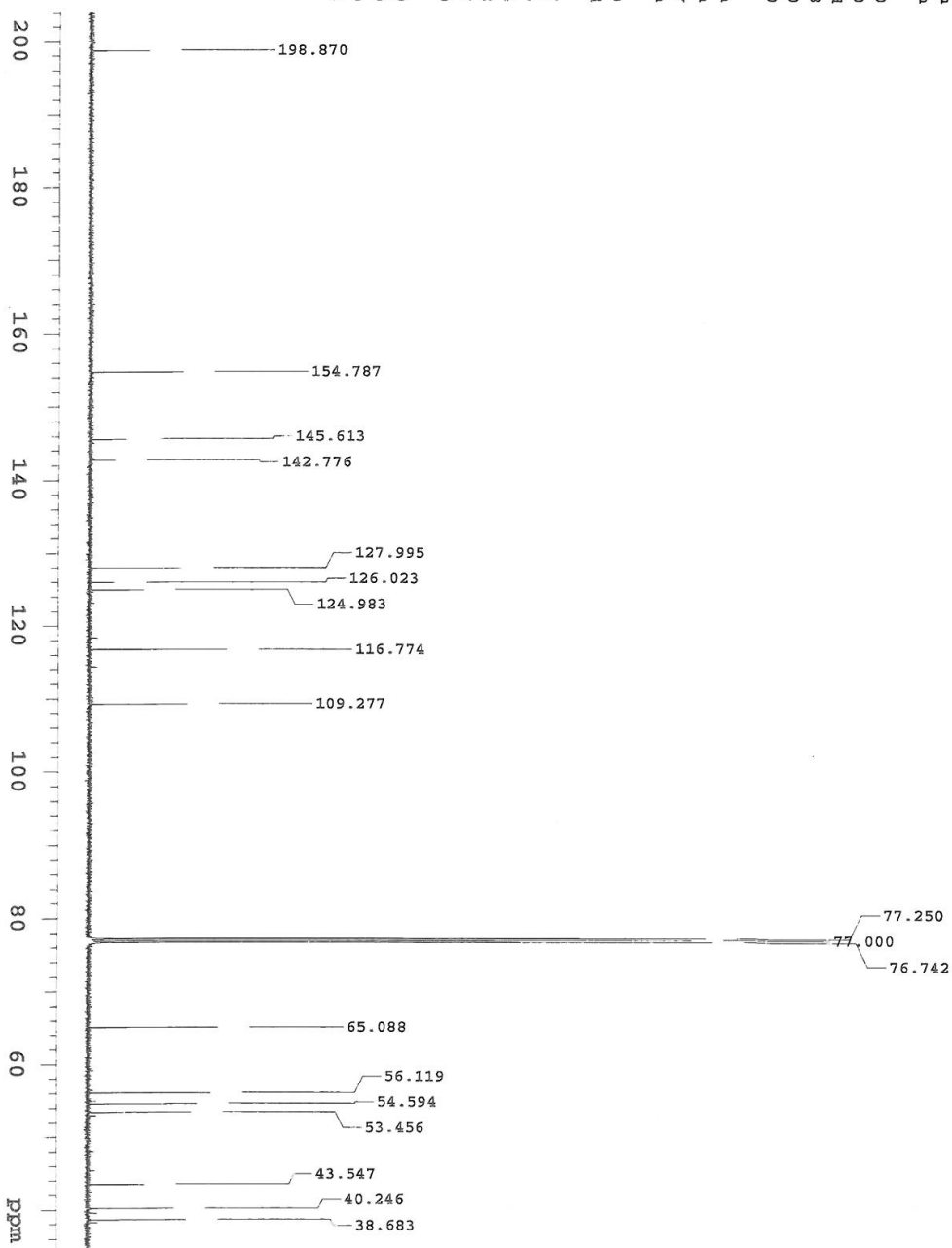


¹³C - NMR

NP-D-4-3

exp707 CARBON

SAMPLE	date	Jun 21 2015	PRESSATURATION	satmode	n
solvent	cdcl3		wet		n
file	exp		SPECIAL		n
ACQUISITION	sw	31250.0	temp	25.0	
	at	1.049	spin	30	
	np	65536	hst	not used	
	fb	17000	pw90	11.300	
	bs	1	alfa	10.000	
	d1	2.000	FLAGS		
	nt	1500	il	n	
	ct	1500	in	n	
TRANSMITTER	dp		dp	y	
tn	C13	hs	hs	m	
sfrq	125.705	PROCESSING			
tof	1913.9	lb	0.50		
tpwr	55	fn	not used		
pw	5.650	DISPLAY			
DECOUPLER	sp	4315.7			
dn	H1	wp	21342.3		
dof	0	rfl	11479.4		
dm	yyy	rfp	9678.2		
decwave	w	ip	-47.7		
dpwr	41	lp	0		
dmf	12346	PILOT			
	wc	200			
	sc	0			
	vs	100			
	ch	3			
	nm	cdc	ph		



NP-D-4-3

Sample Name:

Data Collected on:
vnmrs500-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

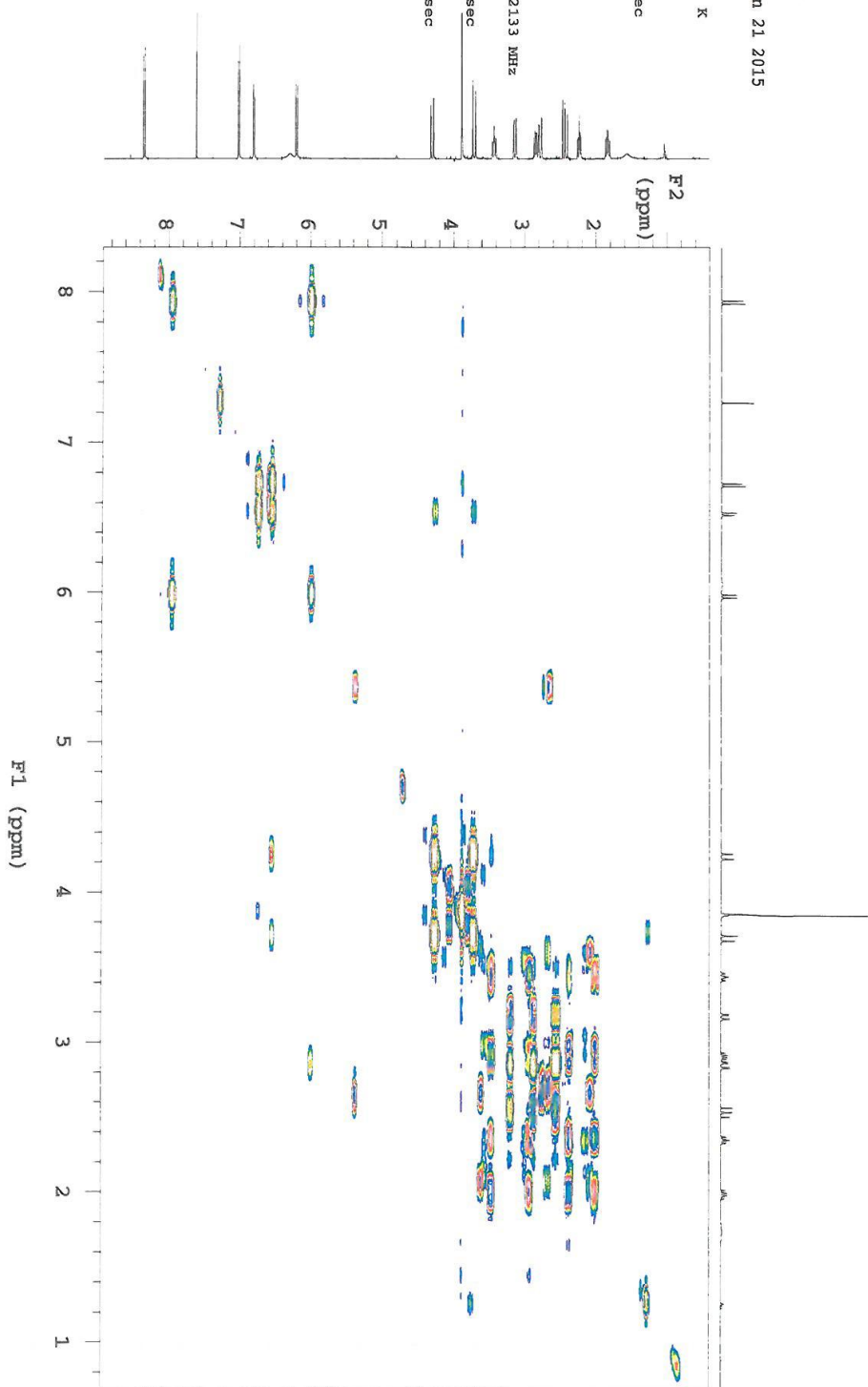
Fidfile: gCOSY

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: cdcl3

Data collected on: Jun 21 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 8012.8 Hz
2D Width 8012.8 Hz
8 repetitions
256 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.016 sec
Fw size 4096 x 4096
Total time 41 min



NP-D-4-3

Sample Name :

Data Collected on:
vnmrs500-vnmrs500
Archive directory:

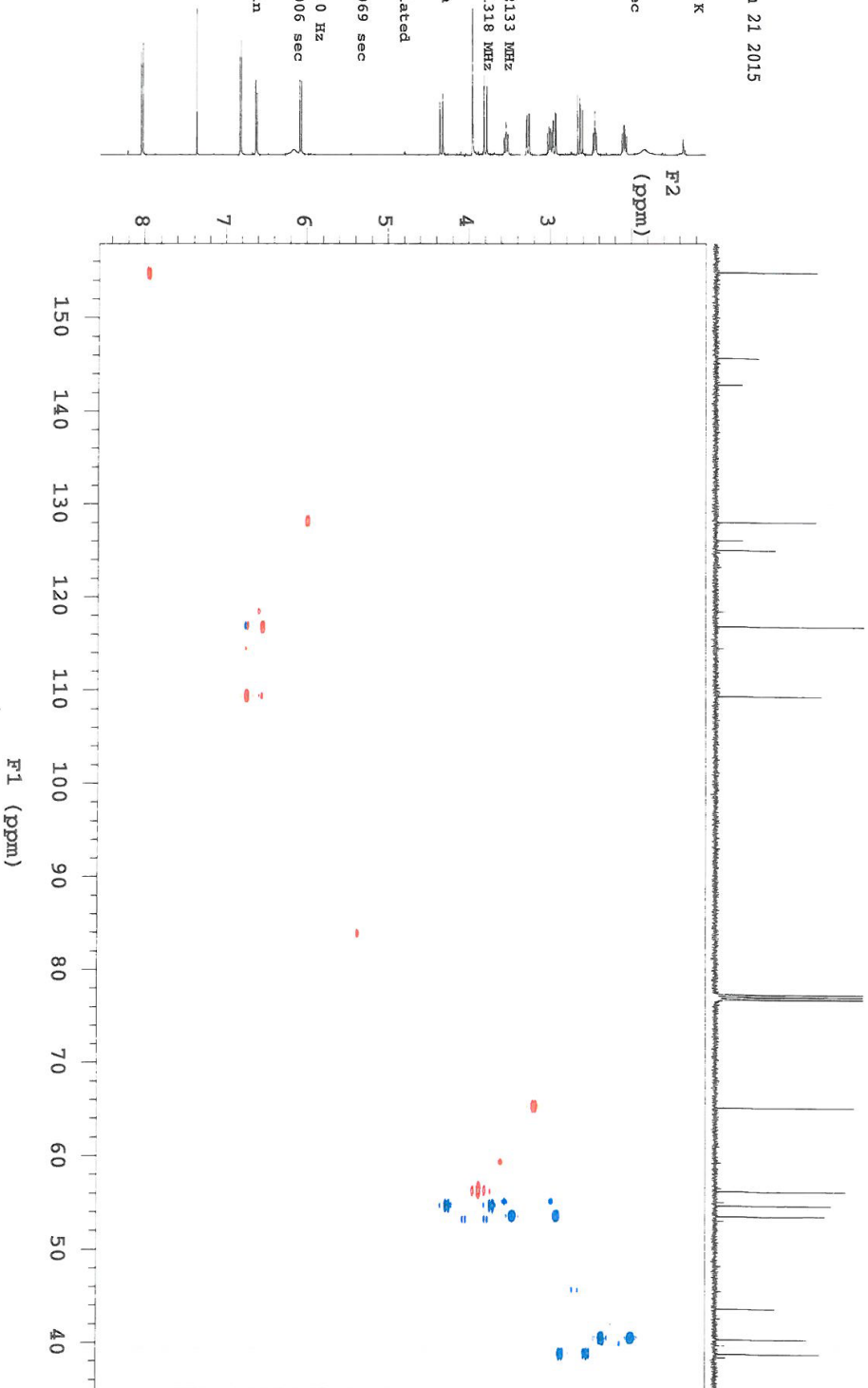
Sample directory:

FidFile: gHSQC

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jun 21 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 8012.8 Hz
2D Width 21367.5 Hz
16 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DECOUPLE C13, 125.7001318 MHz
Power 37 dB
on during acquisition
off during delay
W40 OneNMR W018 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Resol. enhancement 0.0 Hz
Gauss apodization 0.006 sec
F1 size 4096 x 2048
Total time 2 hr, 43 min



gHSQC



NP-D-4-3

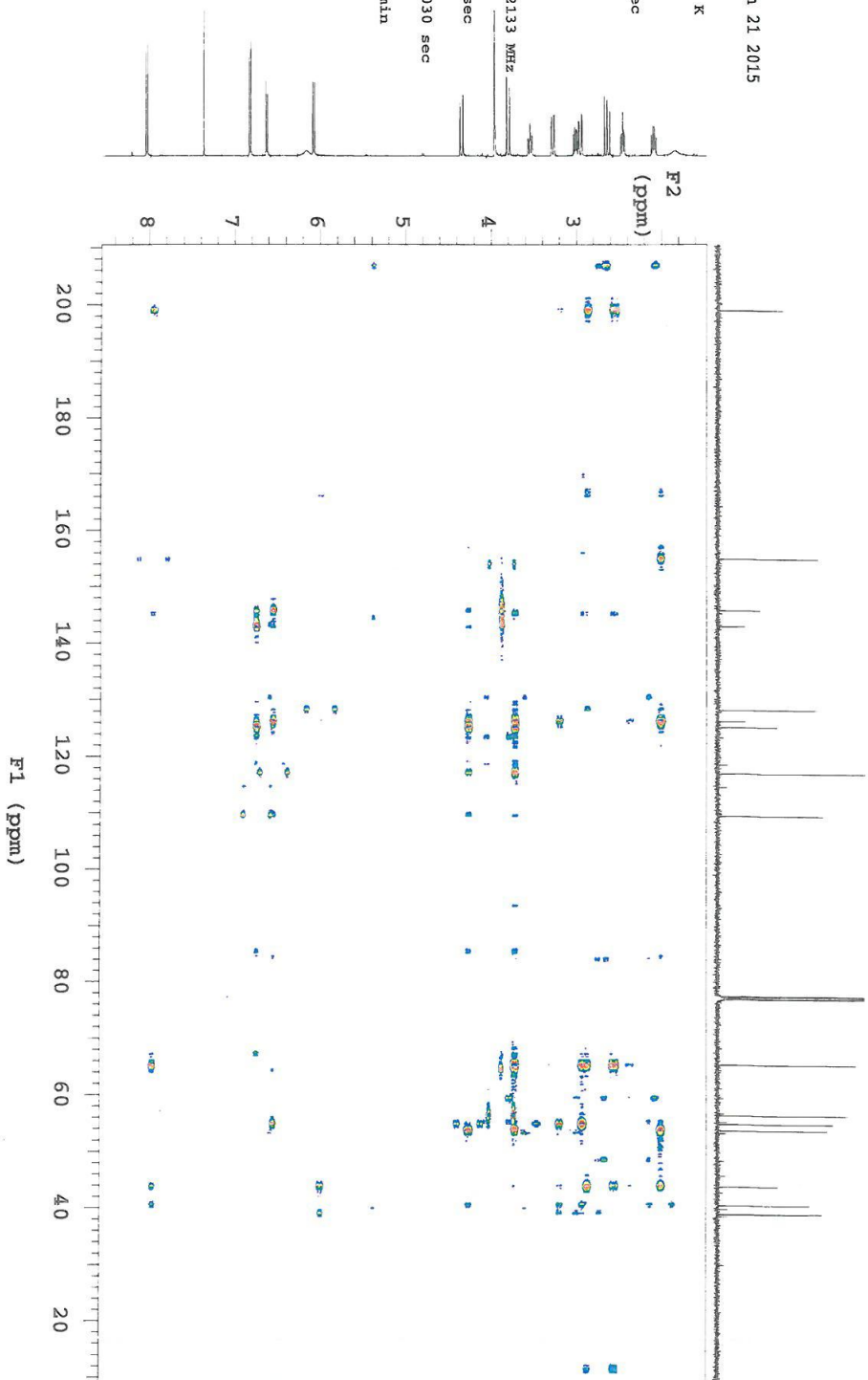
Sample Name:
Data Collected on:
vmmr500-vmmr500
Archive directory:

Sample directory:

F1File: gHMBC

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jun 21 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vmmr1
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 8012.8 Hz
2D Width 30165.9 Hz
32 repetitions
2 x 1024 increments
OBSERVE H1, 499.8632133 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
F1 size 4096 x 2048
Total time 22 hr, 44 min



NP-D-4-3

Sample Name:

Data Collected on:
vnmr500-vnmr500

Archive directory:

Sample directory:

File: NOESY

Pulse Sequence: NOESY

Solvent: cdcl3

Data collected on: Jun 23 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 3858.0 Hz

2D Width 3858.0 Hz

8 repetitions

2 x 512 increments

OBSERVE H1, 499.8632133 MHz

DATA PROCESSING

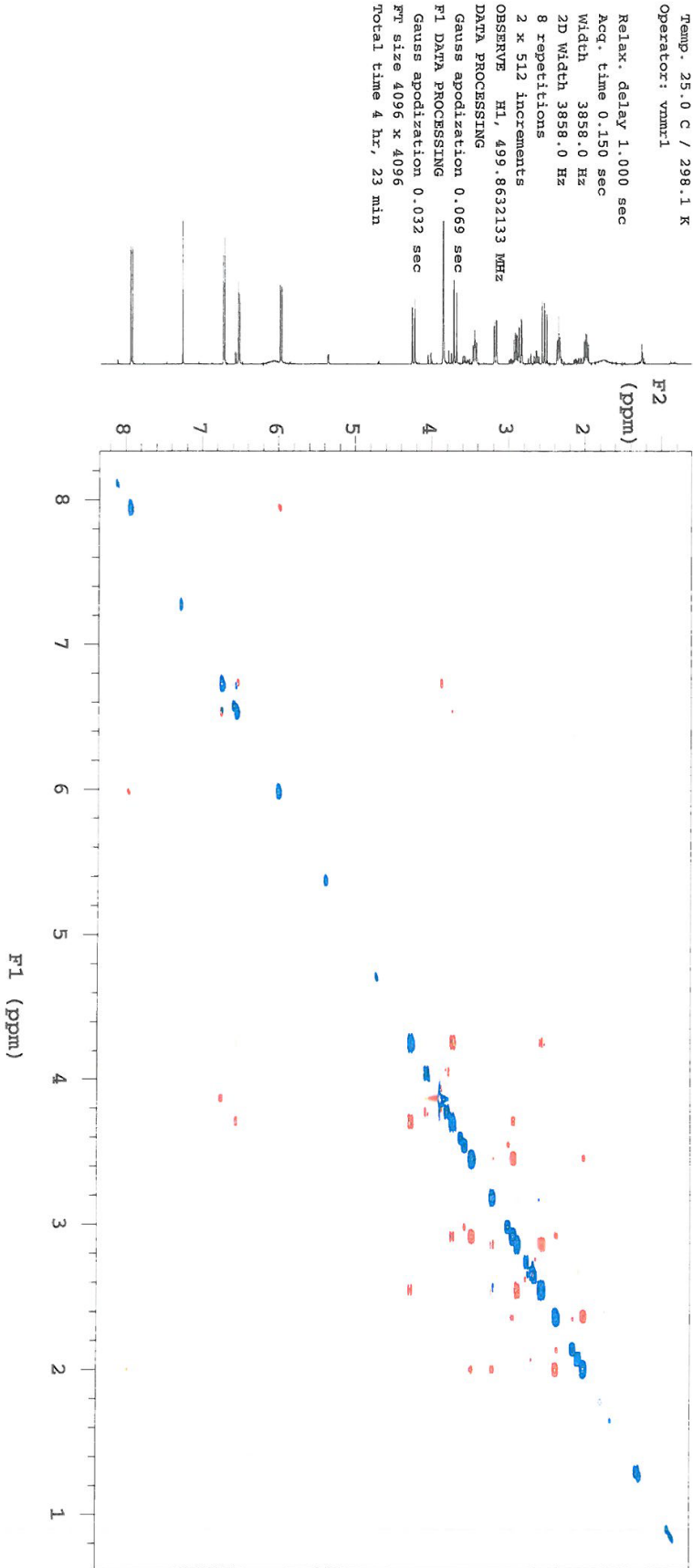
Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.032 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 4 hr, 23 min



NOESY