

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra anorganické chemie



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Přínos 2D NMR spektroskopie při interpretaci  
1H, 13C a 15N signálů v NMR spektrech  
vybraných aromatických dusíkatých  
heterocyklů**

Vypracoval:

Alexandr Popa

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Radka Novotná

Studijní obor:

Chemie

Studijní program:

Chemie

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci psal zcela samostatně pod odborným vedením  
Mgr. Radky Novotné za použití pramenů uvedených v seznamu literatury.

Olomouc 2.4. 2012

.....

Chtěl bych tímto upřímně poděkovat vedoucí bakalářské práce Mgr. Radce Novotné za pomoc při zpracování této práce a Mgr. Igoru Popovi, CSc. za pomoc při interpretaci NMR spekter.

## OBSAH

1. Úvod	5
2. Teoretická část	7
2.1. Deriváty 7-azaindolu	8
2.2. 2D-NMR spektroskopie	10
2.2.1. Úvod do NMR spektroskopie	10
2.2.2. Základy 2D-NMR spektroskopie	11
2.2.3. Homonukleární korelační experimenty	13
2.2.4. Heteronukleární korelační experimenty	14
2.2.5. Jednovazebné a vícevazebné experimenty s nepřímou detekcí	16
2.2.6. NOE experimenty	17
2.2.7. Kombinované experimenty	18
2.2.8. Experimenty s gradientovou úpravou	19
2.2.9. $^{15}\text{N}$ 2D-NMR experimenty	19
3. Experimentální část	21
3.1. Použité chemikálie a metody	22
3.1.1. Příprava vzorků	22
3.1.2. Akviziční parametry provedených 2D experimentů	22
3.1.3. Pulsní sekvence některých experimentů	23
3.2. Charakteristika a vybavení NMR spektrometru	25
3.2.1. Charakteristika spektrometru Varian 400 MR	25
3.2.2. Měřicí sondy	26
4. Výsledky a diskuze	28
4.1. NMR studium derivátů 7-azaindolu	29
4.1.1. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 7-azaindolu	29
4.1.2. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 3-chlor-7-azaindolu	35
4.1.3. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 3-jod-7-azaindolu	40
4.1.4. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 5-brom-7-azaindolu	45
4.1.5. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 7-azaindol-3-karbonitrilu	49
4.2. Shrnutí výsledků	53
4.2.1. Výsledky 1D NMR studia derivátů 7-azaindolu	53
4.2.2. Přínos 2D spektroskopie v interpretaci $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů u derivátů 7-azaindolu	54
5. Závěr	56
6. Symboly a zkratky	57
7. Literatura	60

## 1. ÚVOD

Aromatické dusíkaté heterocykly jsou rozsáhlou skupinou organických sloučenin. Mezi ně patří deriváty 7-azaindolu, produkty kondenzace šesti- a pětičlenných dusíkatých heterocyklů. Deriváty 7-azaindolu jsou zajímavé především svojí protinádorovou aktivitou, jako inhibitory cyklin dependentních kináz (CDK, mají důležitou funkci při regulaci buněčného cyklu). V poslední době jsou středem velkého zájmu 3-substituované deriváty 7-azaindolu, jako ligandy „titanocenových“ komplexů s vysokou protinádorovou aktivitou<sup>[1,2]</sup>. Nejmodernější výzkum je zaměřen na získávání komplexů Pt s protinádorovou aktivitou. Je směřován na přípravu ve vodě dobře rozpustných komplexů s různě substituovanými deriváty 7-azaindolu<sup>[3]</sup>.

Schopnost interpretace dat o struktuře sloučenin je nezbytnou součástí nejen chemických věd. Prokázání struktury vede k jednoznačné identifikaci nově získaných látek, pochopení jejich chemických vlastností nebo dokonce k možnosti přípravy přírodních látek syntetickými metodami. Významnou úlohu v identifikaci struktury organických, koordinačních, přírodních a syntetických sloučenin má nukleární magnetická rezonance vysokého rozlišení v roztoku (= stav maximálně přiblížený biochemickým, „fyziologickým“, podmínkám). Využívá se k analýze chemických individuů, ale i směsí či malých molekul až biomakromolekul<sup>[4,5]</sup>. Tato metoda byla objevena Edwardem Purcellem a Felixem Blochem (v roce 1952 byli oceněni Nobelovou cenou za fyziku)<sup>[6]</sup>.

Při zkoumání struktury a chování koordinačních sloučenin v roztoku hraje roztoková NMR spektroskopie významnou a často rozhodující roli. Zvláště pak při určování způsobu koordinace ligandů v komplexech pomocí výpočtu koordinačních chemických posunů ( $\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$ ). Nezaměnitelnými jsou v tomto případě experimenty s měřením jader (například -  $^{15}\text{N}$ ), které se přímo zúčastňují koordinační vazby. Nejvhodnějším způsobem zkoumání způsobu koordinace jsou 2D heteronukleární experimenty s nepřímou detekcí a jednovazebnou nebo vícevazebnou korelací:  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMQC a  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMBC.

K přesné identifikaci sloučenin slouží série 2D NMR spekter. Jedná se o přiřazení konkrétních signálů v mém případě derivátů 7-azaindolu v NMR spektrech. Měření 2D NMR spekter těchto organických sloučenin je nezbytně nutné. Vzniklé chyby vyplývající z interpretace 1D NMR experimentů totiž často vedou k nesprávným závěrům nejen o způsobu koordinace ligandů, ale i o strukturním typu komplexů.

Cílem bakalářské práce je prokázání přínosu 2D NMR spektroskopie při interpretaci vodíkových, uhlíkových a dusíkových signálů v NMR spektrech. Zkoumány byly deriváty 7-azaindolu, jakožto vybrané potenciální ligandy řady komplexů.

Bakalářská práce se skládá ze tří částí. V první části uvádím stručný přehled derivátů 7-azaindolu. V druhé části se věnuji principům nukleární magnetické rezonanční spektroskopie s důrazem na dvojdimenzionální korelační spektroskopii. Ve třetí části provádím interpretaci samotné experimentální výsledky NMR studia derivátů 7-azaindolu.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST.**

## 2.1. Deriváty 7-azaindolu.

Středem velkého zájmu jsou deriváty 7-azaindolu (7-azaindol, 1H-pyrol[2,3- $\beta$ ]pyridin, C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>), jež jsou součástí alkaloidu mořského původu, konkrétně  $\alpha$ -azido- $\beta$ -(4-methoxy-7-azaindol-3-yl)akrylátu (variolin B) s inhibicí cyklin dependetní kinazy (CDK1)<sup>[1]</sup>.

7-Azaindolové analogy - tetrahydropyridoindoliziny účinkují jako buněčné metabolity prostaglandinových D-2 receptorů<sup>[14]</sup>.

S pomocí SAR (vztah struktura-aktivita) bylo zjištěno, že 7-azaindol-3-karboxamid hydroxyethylamin účinkuje proti Alzheimerově nemoci (funguje jako amyloidní proteinový prekurzor)<sup>[15]</sup>.

[3,5-d]-7-Azaindolové analogy inhibují  $\alpha$ -fosfatidyl-3-kinázu (PI3K), která je důležitým faktorem u mnoha nádorů. Výměnou různých skupin v 3,5-pozici 7-azaindolu za pomoci SAR byla vyvinuta řada silných inhibitorů  $\alpha$ -PI3K<sup>[16]</sup>. Takzvané azaindolové hydroxamové kyseliny inhibují HIV-1 integrázu, která je jedním ze tří kódovaných enzymů genomu HIV, a je nezbytná pro replikaci viru<sup>[17]</sup>.

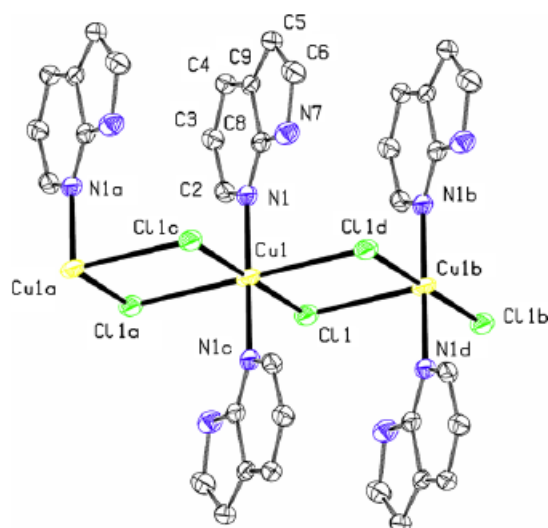
Vypočet struktury pomocí NMR spektroskopie 2–7-substituovaných azaindolových derivátů vázaných na proteinovou tyrosinkinázu sleziny, je považován za atraktivní cíl pro přípravu léčiv alergických autoimunitních onemocnění<sup>[21]</sup>.

V posledních desetiletích je o 7-azaindol velký zájem, a to z hlediska experimentální i teoretické chemie. 7-Azaindolový dimer slouží jako modelový systém procesu přenosu protonů v DNA<sup>[7-9]</sup>. Kromě toho je rovněž chromoforem analogového 7-azatryptofanu, který je používán jako náhrada tryptofanu v měření optických vlastností bílkovin<sup>[10]</sup>. 7-Azaindol je navíc zajímavý jako ligand schopný tvořit koordinační sloučeniny různými způsoby. Přítomnost dvou nerovnocenných donorových atomů dusíku, jež jsou součástí pěti- a šestičlenného cyklu má za následek zajímavé koordinační vlastnosti. Například je schopen tvořit lineární komplexy Cu(II) polymerového typu [Cu(7-azaindol)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (obrázek 1)<sup>[11]</sup>.

1H-Pyrrolo(2,3-*b*)pyridin-7-azaindolový derivát je v poslední době zkoumán jako jeden z ligandů tzn. „titanocenových“ komplexů s vysokou protinádorovou aktivitou (IC<sub>50</sub> = 3,3  $\mu$ M) na LLC-PK epiteliální buněčné linii prasečí ledviny<sup>[2]</sup>.

Výzkumy 7-azaindolu a jeho derivátů s koordinující se na platinu se však prozatím omezují pouze na desítku článků (podle Web of Science k datu 18.3. 2012), které jsou ve většině zaměřeny na cytotoxickou biologickou aktivitu.





**Obrázek 1.** Část polymerní struktury komplexu  $[\text{Cu}(\text{7-azaindol})_2\text{Cl}_2]_n$  <sup>[11]</sup>.

Nejmodernější výzkum derivátů 7-azaindolu je směřován na přípravu různě substituovaných derivátů a komplexů Pt s protinádorovou aktivitou. Příkladem mohou posloužit komplexy Pt(II) a Pt(IV) s 1,2,4,5-tetrakis(5-(*p*-C-*tau*-H<sub>15</sub>Ph)-7-azaindol-1-yl)benzenem. Výsledná molekula je dobře rozpustná v běžných rozpouštědlech. To umožňuje studovat reakce s různými oxidanty, redukční přechody komplexů Pt(IV) na komplexy Pt(II) a naopak. Produkty těchto reakcí se ověřují pomocí NMR spektroskopie a rentgenostrukturní (*X-ray*) analýzy<sup>[3]</sup>. Další deriváty: bis(7-azaindol-1-yl)metyl<sup>[12]</sup> a bis(7-azaindol-1-yl)fenyl<sup>[13]</sup> byly použity v přípravě sérií komplexů Pt(II) a Pt(IV).

Relativně nedávno byla připravena série 7-azaindolylyl komplexů typu  $[\text{NBu}_4][\text{M}(\text{C}_6\text{F}_5)_2(\text{Haza-N7})(\text{aza-N1})]$ , kde M = Pd(IV), Pt(IV), aza = (1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridinát)]-7-azaindolát s protinádorovou aktivitou na buněčných liniích A2780 (rakovina vaječníků) a T47D (rakovina prsní žlázy) ( $\text{IC}_{50} = 0,34$  a  $0,53 \mu\text{M}$ )<sup>[19]</sup>.

7-Azaindolové deriváty a jejich komplexy s Pt(II) mají také luminiscenční vlastnosti<sup>[18]</sup>. Zmíněné luminiscenční vlastnosti 7-azaindolu, přesněji – fluorescenční, byly použity pro získání fluoreskujících komplexů Pt(II), které jsou analogy *cis*- a *trans*-platiny. U *cis*- a *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{aromatický amin})(\text{NH}_3)]$  komplexů je aromatický amin vyměňován za 7-azaindol. Za zmínku stojí také *cis*- a *trans*- $[\text{PtCl}_2(7\text{-azaindol})(\text{NH}_3)]$  komplexy, které jsou vynikajícími modely analogů cytotoxických *cis*- a *trans*-komplexů, které mohou být použity ke studiu metabolismu v nádorových buňkách<sup>[20]</sup>.

## 2.2. 2D-NMR spektroskopie.

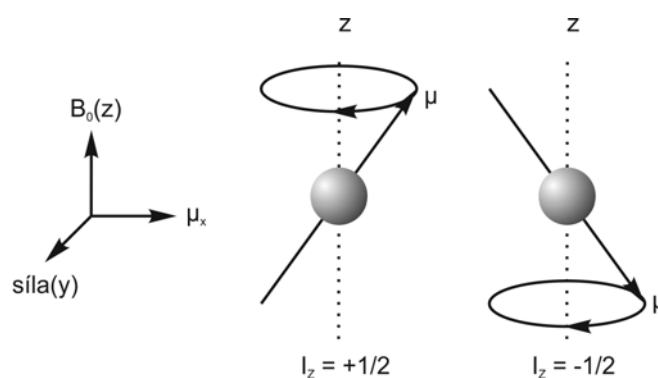
### 2.2.1. Úvod do NMR spektroskopie.

NMR, jak již název napovídá, využívá rezonančních vlastností jader v silném homogenním magnetickém poli. Tato jádra v rezonančním stavu absorbují energii v podobě radiofrekvenčního záření a přechází do excitovaného stavu. Výsledkem měření je spektrum, které určuje závislost mezi intenzitou absorbovaného záření a jeho frekvencí.

NMR využívá pouze jádra s lichým počtem neutronů, protonů, nebo obojího. Jádra se sudým počtem neutronů i protonů magnetický moment nemají. Magnetický moment  $[\mu]$  je vektorová veličina, která je vyjádřena jako součin gyromagnetického poměru  $[\gamma]$  (charakteristická veličina jádra) a momentu hybnosti  $[J]$   $\mu = \gamma \cdot J$ <sup>[22,23]</sup>.

Po vložení jádra do silného homogenního magnetického pole dochází k uspořádání magnetických momentů ve směru magnetického pole. Mírně převažují kladná spinová uspořádání před zápornými. Spiny se rozdělí do dvou energetických skupin. Jedná se o Zeemanův jev. Magnetický moment vykonává tzv. precesní pohyb, což znamená, že opisuje kružnici (obrázek 2)<sup>[24]</sup>.

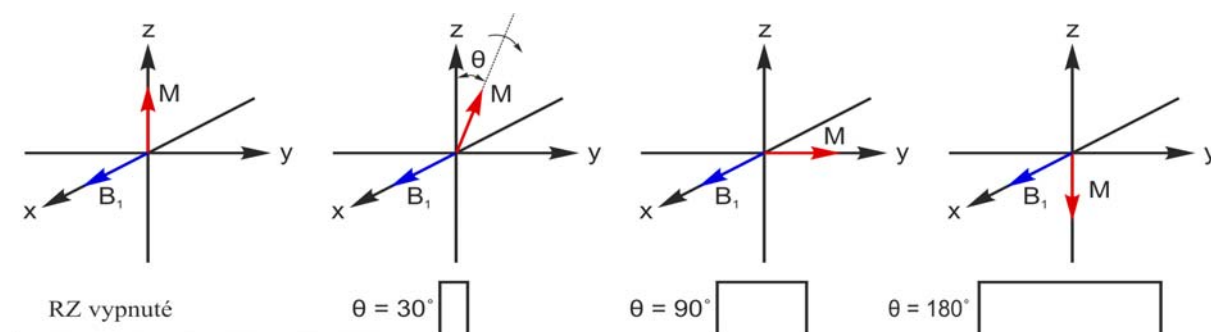
Vzorek je poté na krátkou dobu ozářen impulsem o frekvenci (Larmorova frekvence), která je přibližně stejná jako rezonanční frekvence jader ve vzorku. Čím déle působí impuls na jádro, tím více se vektor magnetického momentu vychyluje ze své polohy (zvětšuje se sklápěcí úhel, obrázek 3). Dále následuje relaxace (podélná a příčná) - proces navrácení spinového systému do rovnováhy.



**Obrázek 2.** Interakce mezi vnějším magnetickým polem a spinovým momentem jader<sup>[23]</sup>.

Hlavním identifikačním vodítkem jader je chemický posun  $[\delta]$ . Každé jádro má specifické elektronové okolí, které zčásti stíní vnější magnetické pole. Tato změna magnetického pole se

nazývá stínění  $[\sigma]$ . Pokles stínění vede k nárůstu rezonanční frekvence, tato frekvence narůstá ve spektru zprava doleva. Kvůli četným potížím se frekvenční jednotky ve spektrech nepoužívají. Pro každé jádro byly zavedeny standardy, jejichž relativní frekvence se rovnají nule, např. pro vodík a uhlík je to tetramethylsilan (TMS).



**Obrázek 3.** Závislost mezi vektorem magnetického momentu jádra a časovým působením pulzu ( $B_1$  - vektor vnějšího magnet. pole,  $M$  - magnetický moment jádra,  $\theta$  - sklápěcí úhel)<sup>[23]</sup>.

Všechny moderní NMR přístroje pracují s Fourierovou transformací (FT). Jde o matematickou operaci, která se aplikuje na FID (záznam závislosti odezvy vzorku na čase) a převádí informaci z časové domény do frekvenční.

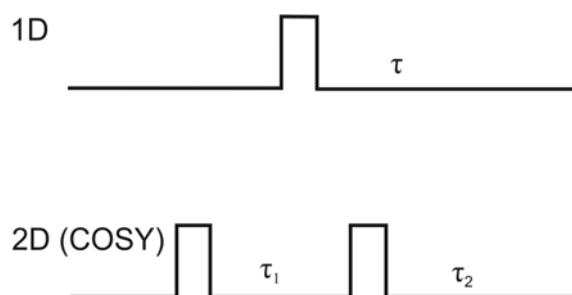
Nachází-li se v okolí jádra další magneticky aktivní jádro, dojde mezi nimi k interakci, která se projeví štěpením signálu ve spektru. Chemicky ekvivalentní jádra neštěpí signály. Mezi nejčastěji studovaná jádra patří:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ . Důležitými faktory jsou: přirozené zastoupení jader s vhodným spinem (nejvhodnější spin je  $\frac{1}{2}$ ) a receptivita (udává se vůči  $^{13}\text{C} = 1$  a je dána přirozenou citlivostí a přirozeným zastoupením izotopů)<sup>[23]</sup>.

### 2.2.2. Základy 2D-NMR spektroskopie.

Jednodimenzionální (1D) NMR spektroskopie představuje základní zdroj při získávání informací o složení a identifikaci sloučenin. Dvojdimenzionální (2D) NMR spektroskopie hraje zásadní roli v navyšování informací o struktuře sloučenin, kterou na rozdíl od 1D spektroskopie umožňuje jednoznačně prokázat<sup>[24]</sup>.

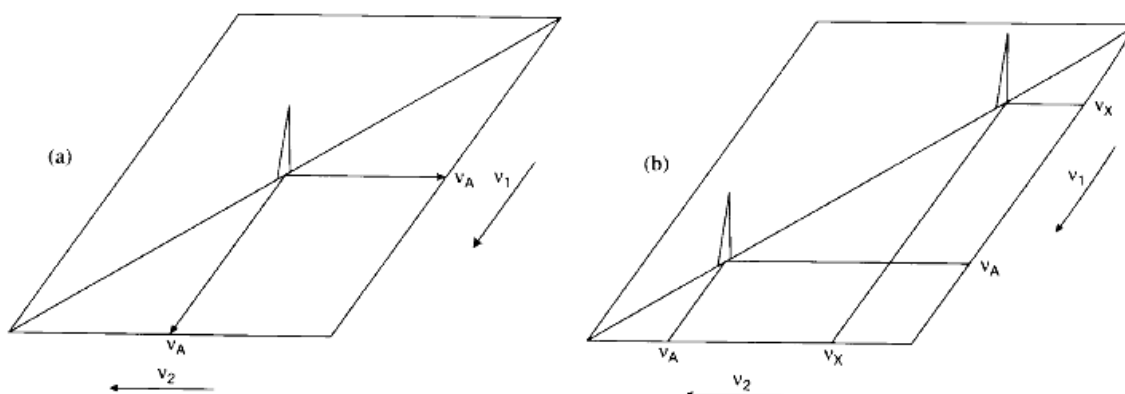
Tato metoda byla poprvé navržena v 1971 Jeenerem a do praxe vešla teprve ve druhé polovině osmdesátých let. Na rozdíl od 1D NMR, jež využívá osu frekvence a intenzity, má 2D NMR dvě osy frekvence. U 2D NMR tedy uvažujeme magnetické interakce mezi jádry prostřednictvím strukturální konektivity, tzn. přes vazbu. Místo jednoho  $90^\circ$  pulsu používá dvou

pulsů, které jsou oddělené intervalem  $t_1$ . Během této doby se vyvine vztah mezi spiny. FID je snímán po dobu akvizice  $t_2$  (obrázek 4).



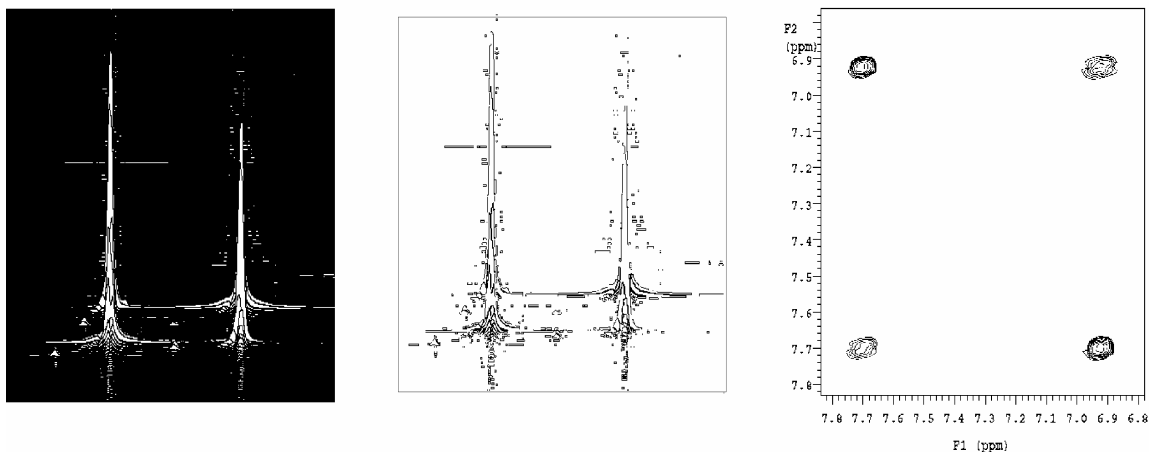
**Obrázek 4.** Schéma pulsní sekvence jednoho cyklu v 1D a 2D spektroskopii.

Při relativně krátké eluční době je pík nízký. Intenzita signálu roste s rostoucí eluční dobou. V průběhu měření se kontinuálně mění doba mezi dvěma pulsy a postupně tak získáváme sérii spekter.



**Obrázek 5.** Výsledek COSY experimentu po dvojitě FT izolovaného jádra (a) a dvou neinteragujících jader (b)<sup>[23]</sup>.

Výška píku postupně roste, až dosáhne maxima. Po jeho dosažení opět klesá k nule, čímž za určitý časový úsek opíše sinusoidu. V praxi na výšku maxima působí  $t_2$  tak, že ho snižuje. Pomocí 2D NMR ze signálu získáváme dva FIDy. Každý signál obsahuje dvě souřadnice  $\nu_A, \nu_X$  (obrázek 5, a). V případě přítomnosti dvou neinteragujících jader získáváme 2 diagonální signály (obrázek 4, b) a v případě interakce mezi jádry i 2 mimodiagonální signály (krospíky, obrázek 6)<sup>[22,25]</sup>.



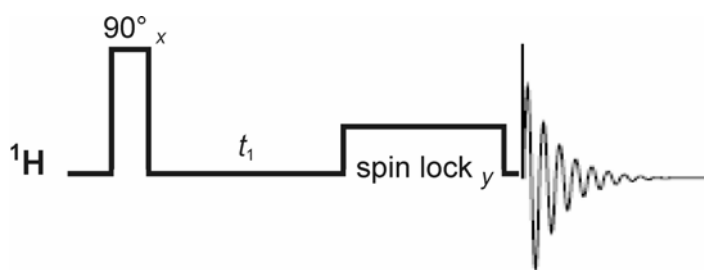
**Obrázek 6.** Různé možnosti zobrazení H,H-COSY spektra dvou interagujících jader v *stacked* (vlevo a uprostřed) a *countur plot* (vpravo) reprezentaci 6-(4-hydroxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-ribofuranosidopurinu v DMSO- $d_6$  (detail).

### 2.2.3. Homonukleární korelační experimenty.

Na uvedeném principu pracuje základní 2D experiment COSY. Využívá se hlavně při analýze složitého vodíkového spektra a k prokázání struktury molekuly. Můžeme sledovat interakce vodíkových jader přes dvě až tři vazby. Pomocí přechodu z jednoho diagonálního píku přes krosník na další diagonální pík, můžeme přiřazovat jednotlivé signály a následně popsat celou strukturu. Existují 4 nejpodstatnější faktory negativně ovlivňující COSY experiment. Hlavní z nich je neschopnost rozlišení mezi periodami  $t_1$  a  $t_2$ , což je způsobeno symetrií. Další dva faktory, které způsobují falešné krosníky, jsou nesprávné délky pulsů a neúplná příčná relaxace. Poslední příčina, která vyvolává šum, je vliv podélné relaxace. Těmto nežádoucím faktorům lze zamezit pomocí symetrizací spektra, cyklování fází a úpravou relaxační doby.

Existuje více poddruhů COSY experimentu, které jsou určeny pro získání nových informací [26,27]. Využívají pulsy pod jiným úhlem, kvůli zabránění překrytí diagonálních a korelačních signálů (COSY 45). Například LRCOSY experiment se zaměřuje na interakce přes čtyři a více vazeb. Pracuje pomocí vložení fixní doby do pulsní sekvence, což zvyšuje přenos magnetizace z malých interakčních konstant. Velké interakční konstanty jsou zanedbatelné. Pomocí metody fázově-citlivé COSY odlišíme diagonální signály od krosníků. Spektrum má lepší rozlišení a nedochází k překryvům signálů. Oceníme to zejména u velkých molekul. K potlačení intenzivních singletů, odpovídajících jednokvantovým koherencím, použijeme

multikvantovou filtraci v COSY. Vložíme-li další  $90^\circ$  puls, který následuje po prvním pulsu (DQF-COSY), singlety vedoucí podél diagonály se potlačí. Odstranění singletů a kvartetů probíhá pomocí TQF-COSY. Tyto metody nám na jedné straně zjednodušují interpretaci a na straně druhé snižují citlivost experimentu. TOCSY využívá speciální impuls, který uzavře magnetizaci kolem osy a všechny protony tak získají frekvenci spinového locku (obrázek 7). To nám umožňuje určení konektivity celého spinového systému. Během druhého COSY impulsu jsou všechny chemické posuny převedeny do rovnovážného stavu. Díky tomuto procesu získáme velmi blízké interagující spiny. Magnetizace je přenášena z jednoho spinu na ostatní. Tento efekt snižuje citlivost, proto musíme použít více skenů. Hlavně se používá při identifikaci aminokyselinových, nebo nukleotidových residuí<sup>[28]</sup>. Více specializovaná odnož TOCSY je Relayed Coherence Transfer COSY (RCT), jež zjišťuje vzdálené konektivity.

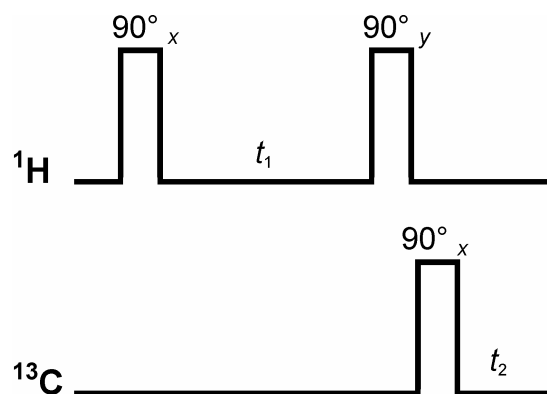


**Obrázek 7.** Schematické znázornění  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ -TOCSY pulsní sekvence<sup>[23]</sup>.

Pro jiná jádra při COSY experimentu musí být splněny tyto podmínky. Měří se jádra s  $1/2$  spinem a přibližně se stoprocentním zastoupením. Z organofluorových sloučenin je to  $^{19}\text{F}-^{19}\text{F}$  COSY a z organofosforových sloučenin se používá  $^{31}\text{P}-^{31}\text{P}$  COSY.

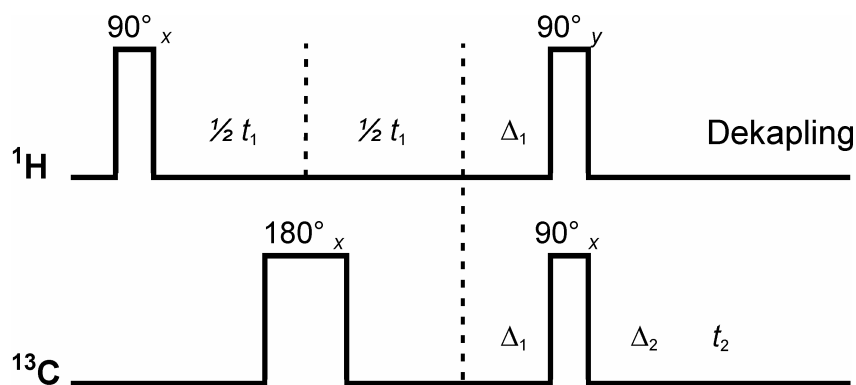
#### 2.2.4. Heteronukleární korelační experimenty.

Heteronukleární korelace je přenos magnetizace pomocí nepřímých skalárních interakcí mezi různými nuklidy. Nejběžněji je využívána při studiu korelace mezi  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , za podmínek použití několika pulsních sekvencí. Z korelačních signálů jsme schopni určit, na kterých uhlících jsou navázané určité vodíky. Pokročilejším experiment v heteronukleární korelaci je tzv. HETCOR, jedná se o jednoduchou pulsní sekvenci (obrázek 8).



**Obrázek 8.** Schematické znázornění pulsní sekvence HETCOR experimentu<sup>[23]</sup>.

Během doby mezi dvěma pulsy se vyvine tzv. protonová magnetizace podle Larmorovy frekvence. Uhlíkový FID je snímán během  $t_2$ . Vodíkové rezonance ve spektru odpovídají  $^{13}\text{C}$  satelitům v  $^1\text{H}$  spektru. Signály jsou v antifázi a dekaplingem (současné ozařování protonů) by nevznikl pozorovatelný signál. Avšak v případě dekaplingu je nutno použít složitější pulsní sekvenci (obrázek 9). Během doby  $t_1$  umožňuje první puls vývin chemického posunu a interakční konstanty. Uhlíkovo-vodíkové interakční konstanty jsou refokusovány pomocí  $180^\circ$  uhlíkového pulsu v  $^1\text{H}$  dimenzi. Vodíkové vektory dosáhnou antifáze během doby  $\Delta_1$ , která odpovídá třetině doby mezi pulsy v dekaplovaném vodíkovém spektru a polovině doby v akvizčním uhlíkovém spektru. Druhý vodíkový puls přetočí vodíkové vektory v antifázi do osy z a umožní přenos polarizace na uhlík, který je také v antifázi. Během doby  $\Delta_2$  dochází k obnovení postavení fází a je nám umožněno provést vodíkový dekapling. U HETCORu se jedná o druh spektra obsahující pouze korelační signály. Nevyskytuje se však zde zrcadlová symetrie podél diagonály. Vodíkové posuny se nacházejí na vertikální ose, uhlíkové posuny na horizontální ose. V HETCOR spektru nepozorujeme signály kvartérních uhlíků. Podle tohoto spektra můžeme snadno přiřadit dříve identifikované vodíkové, nebo uhlíkové signály. HETCOR spektrum nám dovoluje rozlišit geminální protony od vicinálních. Pro přiřazení  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spekter je HETCOR experiment nepostradatelný.



**Obrázek 9.** Schematické znázornění pulsní sekvence HETCOR s dekaplingem<sup>[23]</sup>.

### 2.2.5. Jednovazebné a vícevazebné experimenty s nepřímou detekcí.

HMQC experimentem nejsou detekována jádra  $^{13}\text{C}$  přímo, ale identifikace probíhá pomocí protonů. Po dobu akvizice dochází k uhlíkovému dekaplingu, zatímco signály jsou štěpeny v  $^1\text{H}$  dimenzi. Tento experiment vykazuje vysokou citlivost<sup>[29]</sup>.

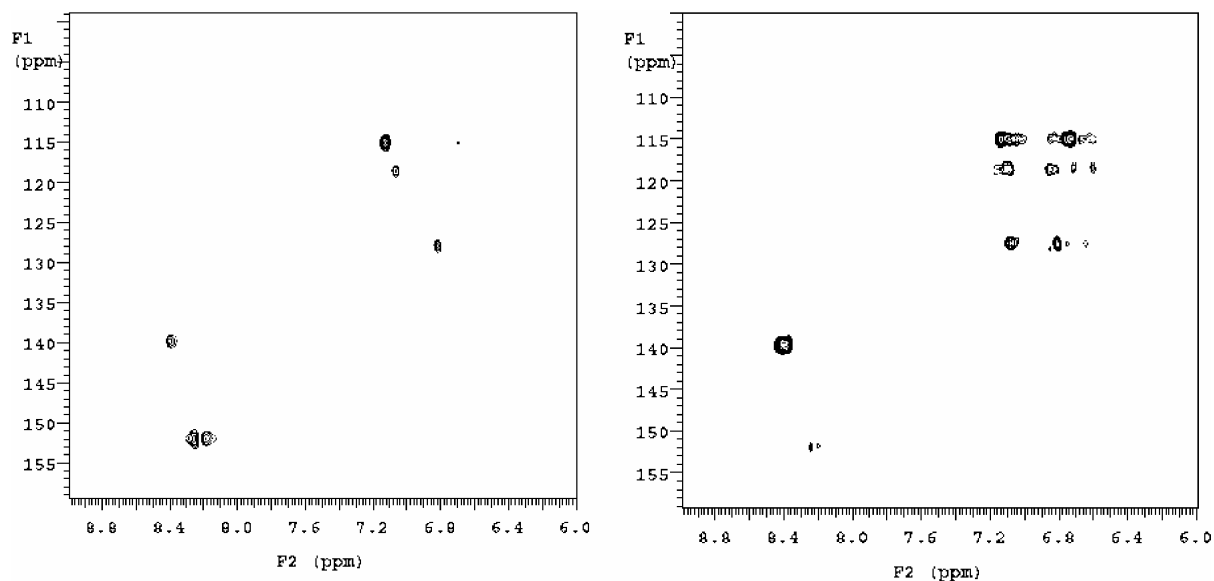
BIRD-HMQC experiment využívá rozdíl vlastností protonů navázaných na  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$ . Upřednostňovány jsou protony připojené k  $^{13}\text{C}$ . Vodík navázaný na  $^{13}\text{C}$  se štěpí na 2 složky. Vodíky, navázané na  $^{12}\text{C}$ , štěpené nejsou.

HSQC je podobný experimentu HMQC. Obsahuje dvojnásobný počet pulsů ve srovnání s HMQC. Pulsní sekvence je komplikovaná. Interakce  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  nejsou obsaženy v uhlíkové dimenzi, tím pádem jsou korelační signály lépe rozpoznatelné než v HMQC (obrázek 10). Nevýhodou HSQC experimentu je zejména problematické naladění sondy a nastavení akvizičních parametrů. Před tímto experimentem je upřednostňován HMQC experiment, kvůli jednodušší instrumentaci. Interpretace je v obou experimentech shodná.

Rozdíl mezi jednovazebnými a vícevazebnými experimenty spočívá zejména v tom, že jednovazebné neposkytují odezvy kvartérních uhlíků, kdežto vícevazebné ano. Ty rovněž umožňují sledovat interakce přes heteroatomy a karbonylové uhlíky. Experimenty využívající přímou detekci vykazují horší citlivost než experimenty s inverzní detekcí.

HMBC pulsní sekvence je nastavována podobně jako u HMQC experimentu. HMBC pracuje s kratší dobou odezvy, tím pádem je dosahováno lepší citlivostí. Nejlépe jsou pozorovány methylové skupiny, kvůli trojnásobnému zastoupení vodíku. HMBC řadíme k experimentům s inverzní detekcí. Můžeme pozorovat interakce přes několik vazeb a při vhodné stereochemii - až přes pět vazeb.



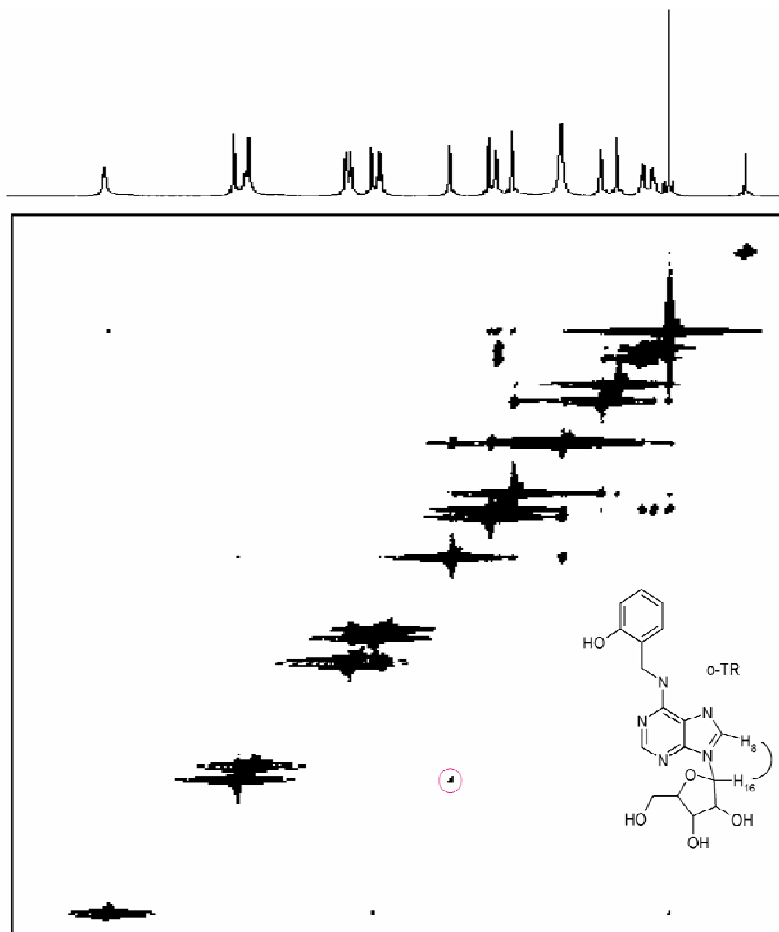


**Obrázek 10.** Fragментy HMQC (vlevo) a HSQC (vpravo) spekter 6-(2-hydroxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-ribofuranosidopurinu (o-TR) v DMSO- $d_6$ .

### 2.2.6. NOE experimenty.

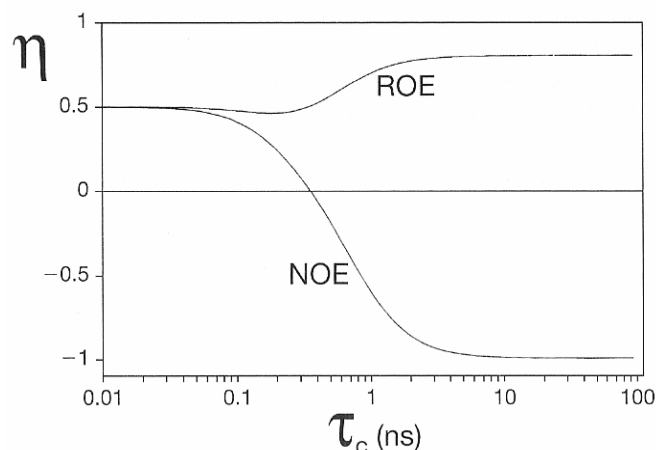
NOE (Jaderný Overhauserův efekt) využívá dipól-dipólovou relaxaci a vícenásobnou resonanci jader ležících blízko sebe. Při ozařování jednoho jádra dojde ke změně distribuce Boltzmannovy populace druhého jádra  $\Rightarrow$  změna intenzity rezonance.

NOESY experiment poskytuje cennou informaci o vzdálenosti dvou jader v jedné molekule. Může nabídnout informace o struktuře a konformaci. Pozorovatelné korelační signály  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  jsou do vzdálenosti 6 Å (obrázek 11). Při interpretaci NOESY spekter, mohou nastat určité komplikace vyvolané například velikostí molekul. U malých molekul se signály vytvářejí pomalu a dosahují pouze 50% maxima. Pro středně velké molekuly není NOESY vhodné. V případě velkých molekul jako jsou proteiny, nebo polynukleotidy se NOE ustaví rychle a dosahuje záporného maxima. Další faktor, který může ovlivnit interpretaci je spinová difuze. Vzniká při přenosu magnetizace pomocí NOE z jednoho spinu na druhý a následně z druhého na třetí. Tento víceřádkový přenos produkuje signály mezi protony, které nejsou blízko sebe.



**Obrázek 11.**  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ -NOESY spektrum 6-(2-hydroxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-ribofuranosidopurinu (o-TR) v  $\text{DMSO}-d_6$  (krospík 8,40/5,90  $\text{H}_8/\text{H}_{16}$  je označen červeně).

ROESY je obdobný experiment jako TOCSY. Narozdíl od NOE experimentu je maximum konstantní, v některých případech vzrůstající (obrázek 12)<sup>[30]</sup>. Dochází k potlačení spinové difuze.



**Obrázek 12.** Faktor zvětšení ( $\eta$ ) jako funkce efektivního korelačního času ( $\tau_c$ ) u NOE a rotating-coordinate (ROE) experimentu<sup>[30]</sup>.

### 2.2.7. Kombinované experimenty.

V nedávné historii byly vyvinuty techniky, které kombinují několik základních experimentů. Využívají základních částí obou sekvencí. Například jako HSQC-TOCSY experiment, který nám poskytuje stejné informace jako TOCSY experiment s rozdílem nesnižování intenzity signálu vlivem přenášení magnetizace přes spiny. V případě velkých překryvů ve vodíkovém spektru nebude mít TOCSY experiment velký přínos. Větší disperze chemických posunů je výhodou pro jádra  $^{13}\text{C}$ . Kvůli menším překryvům  $^{13}\text{C}$  jader,  $^1\text{H}$  signály jsou korelovány s chemickým posunem připojených jader. Hlavním omezujícím faktorem je neprojevení kvartérních uhlíků. Další z kombinačních technik je DEPT-HSQC. V tomto experimentu můžeme pozorovat rozdělení signálu jako v APT (*attached proton test* - rozlišení uhlíků podle počtu připojených vodíků) experimentu. CH a  $\text{CH}_3$  se objevují v kladné poloose a  $\text{CH}_2$  - v záporné.

### 2.2.8. Experimenty s gradientovou úpravou.

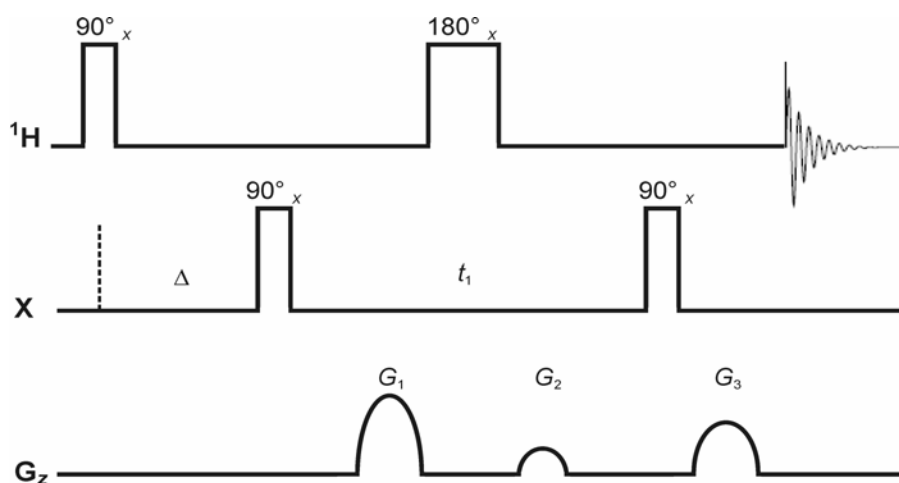
V dnešní době všechny spektrometry provádějí gradientovou úpravu. Jedná se o vkládání dalších pulsů, které eliminují nežádoucí efekty magnetizace magnetického pole. Dochází například k potlačování příčné magnetizace po předchozích pulsech. Pomocí této úpravy nedochází k výskytu falešných korelačních signálů. Použití gradientu se uplatňuje i při výběru

koherence. Můžeme například měřit multikvantové koherence v jednom scanu. Bohužel při použití gradientu dochází ke snížení citlivosti, což někdy brání měření zředěných vzorků.

Abychom potlačili výskyt signálu rozpouštědla zavádíme přídavný puls S, který invertuje všechny rezonance. Jen signál rozpouštědla je zanechán v nulové magnetizaci. Tato metoda se nazývá WATERGATE.

### 2.2.9. $^{15}\text{N}$ 2D NMR experimenty.

Dusík je významným prvkem v organické, anorganické chemii a v biochemii. Experimenty s měřením  $^{15}\text{N}$  jsou nezaměnitelné pro prokázání způsobu koordinace dusíkatých heterocyklických ligandů.  $^{15}\text{N}$  NMR spektroskopie má přirozeně nižší citlivost než  $^{13}\text{C}$ . V současné době je používanou technikou více-vazebná heteronukleární korelace ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  - HMBC) s použitím nízkopásmového filtru pro potlačení jednovazebných  $J$  (mezijaderná spin-spinová nepřímá interakční konstanta) interakcí<sup>[31]</sup>. Gradientová verze HMBC (GHMBC nebo  $g_s$ -HMBC), která se objevila později<sup>[32]</sup> je nyní běžně používaná ke stanovení konektivit a určení parametrů signálů neprotonovaných heteroatomů, včetně  $^{15}\text{N}$  (obrázek 13)<sup>[33]</sup>.



**Obrázek 13.** Schematické znázornění GHMBC pulsní sekvence<sup>[33]</sup>.

Při analýze organických molekul (například u alkaloidů)<sup>[34]</sup>, kde jsou atomy dusíku převážně v terciární nebo kvartérní formě  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  má  $g_s$ HMBC velký význam. Začlenění nízkopásmového  $J$  filtru (snižuje citlivost) je obecně vynecháno při analýze látek, u nichž jsou  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  korelace signálů relativně dobře odděleny ve spektrech<sup>[35-37]</sup>. Tento typ experimentů, optimalizovaných pro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  korelace, se stal známým pod zkratkou GHNMQC<sup>[38]</sup>. Zbytkové

dublety kvůli  $^1J_{\text{H,N}}$  se často objevují ve spektrech. Z praktického hlediska je to výhodné pro malé molekuly, protože v jednom experimentu se srovnávací krospektry objeví jak pro jednovazebné, tak pro vícevazebné interakce. Další varianty a modifikace této pulsní sekvence se objevily v literatuře pro různé typy molekul s odlišnou relaxací a s různým poměrem S/N<sup>[39,40]</sup>. V roce 1998 Furihata a Seto uvedli verze HMBC s konstantním časem<sup>[41]</sup> za účelem měnit (modulovat)  $J_{(1\text{H}-1\text{H})}$  během  $t_1$ , která podle Wagnera a Bergera<sup>[42]</sup> odstartovala vývoj experimentů, založených na HMBC a principu použití DT (relaxační doba), které jsou běžně používány v moderní  $^{15}\text{N}$  2D NMR spektroskopii<sup>[43-47]</sup>.

Měření a zvláště interpretace 1D a 2D spekter sloučenin, které budou dále uvedeny (v experimentální části a v části výsledky a diskuse) jsem prováděl pomocí manuálů pro praktická cvičení, přednášek (elektronické verze na internetu) a dalších zdrojů uvedených v seznamu literatury<sup>[48-52]</sup>.

### **3. EXPERIMENTALNÍ ČÁST.**

### **3.1. Použité chemikálie a metody.**

#### **3.1.1. Příprava vzorků.**

**Obrázek 14.** Studované deriváty 7-azaindolu.

#### **3.1.2. Akviziční parametry provedených 2D experimentů.**

### 3.1.3. Použité pulsní sekvence některých experimentů spektrometru Varian 400 MR.

**Schéma 1.** Pulsní sekvence gCOSY.

**Schéma 2.** Pulsní sekvence ROESY.



**Schéma 3.** Pulsní sekvence  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMQC bez dekaplingu.

**Schéma 4.** Pulsní sekvence  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMBC.

**Schéma 5.** Pulsní sekvence  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMQC s dekaplingem.

**Schéma 6.** Pulsní sekvence  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMBC.

### **3.2. Charakteristika a vybavení NMR spektrometru.**

#### **3.2.1. Charakteristika spektrometru Varian 400 MR.**

### **3.2.2. Měřicí sondy.**

#### **4. VÝSLEDKY A DISKUZE.**

#### 4.1. NMR studium derivátů 7-azaindolu.

##### 4.1.1. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 7-azaindolu.

**Obrázek 15.**  $^1\text{H}$ -spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, standard TMS, při 25 °C.

**Obrázek 16.**  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ -gCOSY spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, standard TMS, při 25 °C.

**Obrázek 17.**  $^{13}\text{C}$ -spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.



**Obrázek 18.**  $^{13}\text{C}$ -APT-spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, standard TMS, při 25 °C.

**Obrázek 19.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMQC spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 20.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMBC spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 21.**  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMBC spektrum 7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně DMFA, při 25 °C.

#### 4.1.2. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 3-chlor-7-azaindolu.

**Obrázek 22.**  $^1\text{H}$ -spektrum 3-chlor-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 23.**  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$  *gCOSY* spektrum 3-chlor-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 24.**  $^{13}\text{C}$ -APT-spektrum 3-chlor-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 25.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$  gHMQC spektrum 3-chlor-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 26.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMBC spektrum 3-chlor-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 27.**  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$  gHMBC spektrum 3-chloro-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně DMFA, při 25 °C.

#### 4.1.3. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 3-jod-7-azaindolu.



**Obrázek 28.**  $^1\text{H}$ -spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 29.**  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ -gCOSY spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 30.**  $^{13}\text{C}$ -spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 31.**  $^{13}\text{C}$ -APT-spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 32.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMQC spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 33.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMBC spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMS relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 34.**  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$  gHMBC spektrum 3-jod-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, standard DMFA, při 25 °C.

#### 4.1.4. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 5-brom-7-azaindolu.

**Obrázek 35.**  $^1\text{H}$ -spektrum 5-brom-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 36.**  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$  gCOSY spektrum 5-brom-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 37.**  $^{13}\text{C}$ -APT spektrum 5-brom -7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, standard TMS, při 25 °C.



**Obrázek 38.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMQC spektrum 5-bromo-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, TMS, při 25 °C (detail)

**Obrázek 39.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMBC spektrum 5-bromo-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 40.**  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMBC spektrum 5-bromo-7-azaindolu v  $d_7$ -DMFA, relativně DMFA, při 25 °C.

#### 4.1.5. Interpretace $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a $^{15}\text{N}$ signálů 7-azaindol-3-karbonitrilu.

**Obrázek 41.**  $^1\text{H}$ -spektrum 7-azaindolu-3-karbonitrylu v  $d_7$ -DMFA, relativně TMS, při 25 °C.

**Obrázek 42.**  $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ -gCOSY spektrum 7-azaindol-3-karbonitrylu v  $d_7$ -DMFA, TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 43.**  $^{13}\text{C}$ -APT-spektrum 7-azaindolu-3-karbonitrylu v  $d_7$ -DMFA, TMS, při 25 °C.

**Obrázek 44.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMQC spektrum 7-azaindol-3-karbonitrylu v  $d_7$ -DMFA, TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 45.**  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -gHMBC spektrum 7-azaindolu-3-karbonitrylu, v  $d_7$ -DMFA, TMS, při 25 °C (detail).

**Obrázek 46.**  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -gHMBC spektrum 7-azaindol-3-karbonitrylu v  $d_7$ -DMFA, DMFA, při 25 °C.

## **4.2. Shrnutí výsledků.**

### **4.2.1. Výsledky 1D NMR studia derivátů 7-azaindolu.**

**4.2.2. Přínos 2D NMR spektroskopie pro interpretaci  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  signálů u derivátů 7-azaindolu.**

## **5. ZÁVĚR.**





## 6. SYMBOLY A ZKRATKY

### Symbols

$B_0$  hlavní magnetické pole

$B_1$  magnetické pole vzhledem k vysílači

$B_2$  magnetické pole ve dvou-rezonančních experimentech

$Hz$  hertz, jednotka frekvence

$I$  bezrozměrný spin

$I_z$  spinové kvantové číslo ve směru osy  $z$

$J$  nepřímá spin-spinová interakční konstanta

$M$  magnetizace

$p$  koherence

$T$  tesla, jednotka magnetické indukce

$T_1$  spin-mřížkový, podélný relaxační čas

$T_{1p}$  spin-mřížkový relaxační čas při spinovém zámku v rámci rotačního systému koordinát

$T_2$  spin-spinový, příčný relaxační čas

$T_2^*$  efektivní spin-spinový relaxační čas vlivem nehomogenity magnetického pole u magnetizaci v  $xy$

$T_c$  teplota koalescence

$t_a$  akviziční čas

$t_p$  trvání pulsu vysílače nebo délka pulsu v  $\mu s$

$t_1$  dvou-dimenzionální 2D čas  $t_1$

$t_2$  dvou-dimenzionální 2D akviziční čas

$W$  označení možného relaxačního energetického přechodu v jednotkách rychlostní konstanty

$\alpha$  rotační uhel

$\gamma$  gyromagnetická nebo magnetogyrická konstanta

$\gamma B_0$  rezonanční frekvence nebo Larmorová frekvence

$\gamma B_2$  intenzita dekaplovaného pole

$\delta$  chemický posun

$\eta$  Overhauserovo zvětšení

$\mu$  magnetický moment

$\nu$  lineární frekvence

$\sigma$  magnetické stínění

$\tau$  čas zpoždění

$\tau_c$  efektivní korelační čas

$\tau_m$  směšovací doba

$\omega$  úhlová frekvence

## Zkratky

- APT attached proton test (test připojených protonů)
- BIRD bilinear rotation decoupling (bilineární rotační dekapling)
- $\text{CDCl}_3$  chloroform deuterovaný
- COSY correlation spectroscopy (korelační spektroskopie)
- DEPT distortionless enhancement by polarization transfer (distorční změny probíhající přenosem polarizace)
- DT relaxation delay time (relaxační časový interval)
- $d_7$ -DMFA dimethylformamid deuterovaný
- $d_6$ -DMSO dimethylsulfoxid deuterovaný
- FID free-induction decay (fid)
- FT Fourier transform or transformations (Fourierova transformace)
- HETCOR heteronuclear chemical-shift correlation (heteronukleární korelační spektroskopie chemického posunu)
- HMBC heteronuclear multiple bond correlation (heteronukleární vícevazebná korelační spektroskopie)
- HMQC heteronuclear multiple quantum correlation (heteronukleární vícekvantová korelační spektroskopie)
- HSQC heteronuclear single quantum correlation (heteronukleární jednokvantová korelační spektroskopie)
- LR long range (dlouhý dosah)
- MQC multiple quantum coherence (více kvantová koherence)
- MeOD methanol deuterovaný
- $n_i$  number of time increments (číslo časových intervalů)
- NMR nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
- NOE nuclear Overhauser effect or enhancement (nukleární Overhauserův efekt)
- NOESY NOE spectroscopy (NOE spektroskopie)
- np number of data points (počet datových bodů)
- ns number of scans (počet skenů)
- ns/i number of scans per time increments (počet skenů za časový interval)
- PFG pulsed field gradient (pulzní gradient magnetického pole)
- ppm parts per million (ppm jednotka chemického posunu)
- RCT related coherence transfer (odpovídající koherenční přenos)
- ROESY rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (nukleární Overhauserova spektroskopie s rotačním systémem ordinát)
- RT repetition time,  $\text{DT} + t_a$  (opakovací čas)

S/N signal- to-noise ratio (poměr signál-šum)

sw spectral width (spektrální šířka)

TMS tetramethylsilane (tetramethylsilan)

TOCSY total correlation spectroscopy (totální korelační spektroskopie)

WATERGATE water suppression by gradient tailored excitation (eliminace signálu vody pomocí gradientové presaturace)

*s* singlet

*bs* široký singlet

*d* dublet

*t* triplet

*q* kvartet

*qui* kvintet

*sxt* sextet

*sep* septet

*m* multiplet

## 7. LITERATURA.

1. Huang S. L., Li R. H., Connoily P. J., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 4818 (2006).
2. Hogan M., Cotter J., Claffey J., et al. *Helv. Chim. Acta* **91**: 1787 (2008).
3. Zhao S. B., Cui Q., Wang S. *Organometallics* **29**: 998 (2010).
4. Prosser V. a kol. *Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha* **1**: (1989).
5. Ning Yong-Cheng: Structural identification of organic compounds with spectroscopic techniques, with a foreword by Richard R. Ernst Nobel prize winner 1991, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (1991).
6. Freeman R. *Chem. Heterocycl. Compd. (A Short History of NMR)* **31**: 9 (1995).
7. Folmer D. E., Wisniewski E. S., Castleman A. W. Jr., *Chem. Phys. Lett.* **318**: 637 (2000).
8. Schmidt M., Ratzer C., Kleinermanns K. et al. *Mol. Phys.* **102**: 1605 (2004).
9. Chen H-Y., Chao I. *Chem. Phys. Chem* **5**: 1855 (2004).
10. Smirnov A.V., English D.S., Rich R.L., et al. *J. Phys. Chem. B* **101**: 2758 (1997).
11. Albada G. A., Tarase S., Mutikainen I., et al. *Inorg. Chim. Acta* **361**: 1463 (2008).
12. Zhao S. B., Wang R. Y., Wang S. N. *Organometallics* **28**: 2572 (2009).
13. Zhao S. B., Liu G. H., Song D., Wang S. *Dalton Trans.* **48**: 6953 (2008).
14. Simard D., Leblanc Y., Berthelette C., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**: 841 (2011).
15. Marcin L. R., Higgins M. A., Zusi F. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**: 537 (2011).
16. Hong S., Lee S., Kim B., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 7212 (2010).
17. Tanis S. P., Plewe M. B., Johnson T. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 7429 (2010).
18. Zhao S. B., Wang S. N. *Chem. Soc. Rev.* **39**: 3142 (2010).
19. Ruiz J., Rodriguez V., de Haro C., et al. *Dalt. Transactions* **39**: 3290 (2010).
20. New E. J., Roche C., Madawala R., et al. *J. Inorg. Biochem.* **103**: 1120 (2009).
21. Villasenor A. G., Kondru R., Ho H., et al. *Chem. Biol. Drug Des.* **73**: 466 (2009).
22. Budyšínský, J. Pelnař J. *Fyzikálně-chemické metody. ÚOCHB AV ČR Praha* (2000).
23. Lambert J. B., Mazzola E. P., et al.: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods.* Pearson Education, New Jersey, USA (2004).
24. Holík M. *Čtyři lekce z NMR spektroskopie. PřF MU Brno* (1983).
25. Friebolin H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy.* Wiley VCH, Weinheim, Germany (1998).

26. Derome A. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, Oxford, UK (1987).
27. Ernst R. R., Bodenhausen G., Wokaun A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford (1971).
28. Evans J. N. S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, UK, (1995).
29. Sanders J. K. M. and Hunter B. K. *Modern NMR Spectroscopy*, 2d ed., Oxford University Press, Oxford, UK (1993).
30. Van de Ven F. J. M. *Multidimensional NMR in Liquids*, VCH, New York (1995).
31. Bax A., Summers M.F. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 2083 (1986).
32. Hurd R.E., John B.K. *J. Magn. Reson.* **91**: 648 (1991).
33. Marek R., Lyčka A. *Curr. Org. Chem.* **6**: 35 (2002).
34. Marek R., Humpa O., Dostál J., et al.: *Magn. Reson. Chem.* **37**: 195 (1999).
35. Burger R., Schorn C., Bigler P. *Magn. Reson. Chem.* **38**: 963 (2000).
36. Martin G.E., Crouch R.C., Sharaf, M. H. M., et al. *J. Nat. Prod.* **59**: 2 (1996).
37. Marek R., Dostál J., Slavík J., et al. *Molecules* **1**: 166 (1996).
38. Farley K. A., Walker G. S., Martin G.E. *Magn. Reson. Chem.* **35**: 671 (1997).
39. Bermel W., Wagner K., Griesinger C. *J. Magn. Reson.* **83**: 223 (1989).
40. Furihata K., Seto H. *Tetrahedron Lett.* **36**: 2817 (1995).
41. Furihata K., Seto H. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7337 (1998).
42. Wagner R., Berger S. *Magn. Reson. Chem.* **36**: S44 (1998).
43. Hadden C.E., Martin G.E., Krishnamurthy V.V. *J. Magn. Reson.* **140**: 274 (1999).
44. Hadden C.E., Martin G.E., Krishnamurthy V.V. *Magn. Reson. Chem.* **38**: 143 (2000).
45. Martin G.E., Hadden C.E. *Magn. Reson. Chem.* **38**: 251 (2000).
46. Meissner A., Sørensen O.W. *Magn. Reson. Chem.* **38**: 981 (2000).
47. Breitmaier E. *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical guide*. John Wiley & Sons, Chichester, England (2002).
48. Braun S., Kalinowski H. O., Berger S. *150 and more basic NMR experiments: a practical course*. Wiley VCH, Weinheim, Germany (1998).
49. Internet: elektronické kurzy a přednášky (VŠCHT Praha)  
<http://www.vscht.cz/nmr/predmet/predmet.html>, reklamní materiály výrobců spektrometrů (Varian, Bruker).
50. VnmrJ Liquids NMR User Guide, Varian NMR Systems with Vnmr Software. Pub. No 01-999313-00 Rev. B 0706.

51. NMR Spectroscopy, User Guide. Pub. № 01-999343-00 Rev. B 1207.
52. Bober F. A., Hood F. P., E. W. Anderson, E. W., et al. *J. Chem. Phys.* **41**: 2042 (1964).
53. Wehrli F. W., Marchand A. P. and Wehrli S. *Interpretation of Carbon-13 NMR spectra*, 2d ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. (1988).
54. Lambert J. B. and Riddel F. G. *The multinuclear approach to NMR spektroskopy*, Durdrecht: D. Seidel (1983).
55. Popa A., Mrňka M. Sborník abstraktů První studentské konference mladých přírodovědců PŘF a PF UP, 12 (2007).
56. Doležal K., Popa I., Hauserová, E., et al. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 3737 (2007).
57. Popa A. Sborník abstraktů Druhé studentské konference mladých přírodovědců PŘF a PF UP, 62 (2008).
58. Popa, A.; Popa, I. *Chem. Listy* **102**, 4P-14, 724 (2008).