

Studium reaktivity 4-hydroxykumarinů a jejich derivátů

Ing. Michaela Kurková

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ing. Michaela Kurková**
Osobní číslo: **T20095**
Studijní program: **N0721A210005 Chemie potravin a bioaktivních látek**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Studium reaktivity 4-hydroxykumarinů a jejich derivátů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na reaktivitu 4-hydroxykumarinů s běžnými reagenty.
2. Z dostupných zdrojů vyhledat a do textu zpracovat např. biologické účinky analogů k připraveným derivátům v rámci DP, případně jejich dalších potenciální využití.

II. Praktická část

1. Vhodnou metodou připravit alespoň jeden derivát 4-hydroxykumarinu v dostatečném množství pro následné reakce.
2. Provéřit stabilitu kumarinového skeletu v kyselém a bazickém prostředí.
3. Vystavit 4-hydroxykumariny podmínkám halogenačních a oxidačních reakcí.
4. Izolované produkty charakterizovat dostupnými metodami instrumentální analýzy.
5. Vyhodnotit výsledky experimentů a sepsat diplomovou práci.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

[1] McMURRY, J.: Organická chemie. 2007, VUTIUM Brno.

[2] MUSA, M. A., COOPERWOOD, J. S., KHAN, M. O. F.: A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry* 2008, 15, 2664-2679.

[3] STEFANACHI, A., LEONETTI, F., PISANI, L., CATTO, M., CAROTTI, A.: Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules* 2018, 23, 250.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 28. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Předmětem diplomové práce je syntéza kumarinových derivátů, jejichž vlastnosti a příprava jsou nastíněny v teoretické části. Praktická část je věnována pokusům o přípravu 3-substituovaných 4-hydroxykumarinů. Experimentální část obsahuje popis syntézy 3-fenyl-4-hydroxykumarinu z fenolu a derivátů kyseliny malonové. Také jsou popisovány pokusy o přípravu těchto derivátů z chlorované kyseliny 2-fenylmalonové.

Klíčová slova: kumarin, 4-hydroxykumarin, 3-fenyl-4-hydroxykumarin, syntéza

ABSTRACT

The subject of the diploma thesis is the synthesis of coumarin derivatives, its properties and preparation that are outlined in the theoretical part. The practical part is devoted to attempts to prepare 3-substituted 4-hydroxycoumarins. The experimental part contains a description of the synthesis of 3-phenyl-4-hydroxycoumarin from phenol and malonic acid derivatives. Attempts to prepare these derivatives from chlorinated 2-phenylmalonic acid are also described.

Keywords: coumarin, 4-hydroxycoumarin, 3-phenyl-4-hydroxycoumarin, synthesis

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Ing. Romanu Kimmelovi, Ph.D. za vedení práce, cenné rady, podporu, pomoc a věnovaný čas při práci v laboratoři. Dále děkuji paní laborantce Haně Geržové, panu Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za pomoc při měření ESI-MS spekter a doc. Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. za pomoc při měření NMR spekter. Děkuji doktorandům z Ústavu chemie za všechny jejich rady a poskytnutí pomoci během provádění experimentů v laboratoři.

Děkuji své rodině za podporu a toleranci během studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KUMARINY	11
1.1 PŘÍRODNÍ KUMARINY	11
1.2 SYNTÉZA KUMARINŮ.....	13
1.2.1 Perkinova reakce	13
1.2.2 Pechmannova reakce	14
1.2.3 Knoevenagelova reakce	15
1.2.4 Wittigova reakce	16
1.2.5 Kostaneckiova-Robinsonova reakce	17
1.2.6 Reformatskyho reakce.....	17
1.3 REAKTIVITA KUMARINŮ	18
2 4-HYDROXYKUMARINY	19
2.1 ANTIKOAGULAČNÍ 4-HYDROXYKUMARINY	19
2.2 FOTOCHEMICKÉ VLASTNOSTI	21
2.3 LÉČEBNÉ ÚČINKY PROTI HIV	21
2.4 REAKTIVITA	22
2.5 SYNTÉZA NESUBSTITUOVANÝCH 4-HYDROXYKUMARINŮ.....	23
2.5.1 Syntéza za použití 2-hydroxyacetofenonu	24
2.5.2 Syntéza za použití fenolu	25
2.6 SYNTÉZA 3-SUBSTITUOVANÝCH 4-HYDROXYKUMARINŮ.....	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	29
3.1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY	29
3.2 SYNTÉZA 4-HYDROXYKUMARINU Z DIESTERU KYSELINY MALONOVÉ	29
3.3 SYNTÉZA 4-HYDROXYKUMARINU PŘES 2-FENYLMALONOVOU KYSELINU.....	31
3.3.1 Syntéza 2-fenylmalonové kyseliny	31
3.3.2 Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu	32
3.4 SYNTÉZA 3-FENYL-4-HYDROXYKUMARINU PŘES DICHLORID KYSELINY 2-FENYLMALONOVÉ.....	33
3.4.1 Chlorace kyseliny 2-fenylmalonové	33
3.4.2 Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu	34
3.5 SYNTÉZA 2-METHYLMALONOVÉ KYSELINY	36
3.5.1 Syntéza 2-methylmalonové kyseliny	36
4 POPIS PŘÍSTROJOVÉ VÝBAVY A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD	37
5 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	39

5.1	PŘÍPRAVA 3-FENYL-4-HYDROXYKUMARINU.....	39
5.2	PŘÍPRAVA 2-FENYLMALONOVÉ KYSELINY.....	40
5.3	PŘÍPRAVA 3-FENYL-4-HYDROXYKUMARINU PŘES KYSELINU 2-FENYLMALONOVOU.....	41
5.3.1	Použití POCl_3	41
5.3.2	Použití SOCl_2 – nezdařený pokus.....	42
5.4	CHLORACE KYSELINY 2-FENYLMALONOVÉ.....	42
5.5	NEÚSPĚŠNÁ PŘÍPRAVA 3-FENYL-4-HYDROXYKUMARINU PŘES DICHLORID 2-FENYLMALONOVÉ KYSELINY.....	43
5.5.1	Použití THF.....	43
5.5.2	Použití DMF.....	43
5.6	PŘÍPRAVA 2-METHYLMALONOVÉ KYSELINY.....	44
ZÁVĚR.....		45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		46
1SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		48
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		49
SEZNAM SCHÉMÁT.....		50

ÚVOD

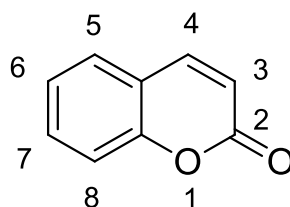
Předmětem diplomové práce bylo syntetizovat 4-hydroxykumariny substituované v poloze 3 fenolem nebo methylem. Teoretická část je věnována popisu kumarinů, přírodních i syntetických, jejich struktuře, syntéze a vlastnostem. Další kapitola je zaměřena na 4-hydroxykumariny, jejich významné deriváty převážně s využitím ve farmakologii s důležitou antikoagulační funkcí a jejíž mechanismus je popsán. Dále jsou popsány některé metody syntézy 4-hydroxykumarinů a k tomu i syntézy 3-substituovaných analogů, kterých bylo dosaženo.

V praktické části a diskusní části jsou popsány experimenty formou diskuze a přesné popisy metod syntézy 3-fenyl-4-hydroxykumarinu a výchozích látek pro možné pozdější využití v syntéze 3-methyl-4-hydroxykumarinu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KUMARINY

Kumariny (2*H*-1-benzopyran-2-ony, 2*H*-chromen-2-ony) jsou organické sloučeniny tvořené benzenovým kruhem přikondenzovaným do poloh 5 a 6 pyran-2-onového kruhu. Tyto benzo- α -pyrony jsou v podstatě elektronově bohaté konjugované laktony, s dobrou vlastností pro přenos náboje. Strukturně lze kumariny považovat také za deriváty *o*-hydroxyskořicové kyseliny. Obecně jsou to sloučeniny vyskytující se v přírodě převážně jako sekundární metabolity rostlin, které chrání před mnoha nežádoucími biologickými reakcemi. Z fyzikálně-chemického hlediska to jsou molekuly nízké hmotnosti s jednoduchou strukturou, dobrou rozpustností ve většině organických rozpouštědel a s malou toxicitou.^{1, 2, 3, 4}



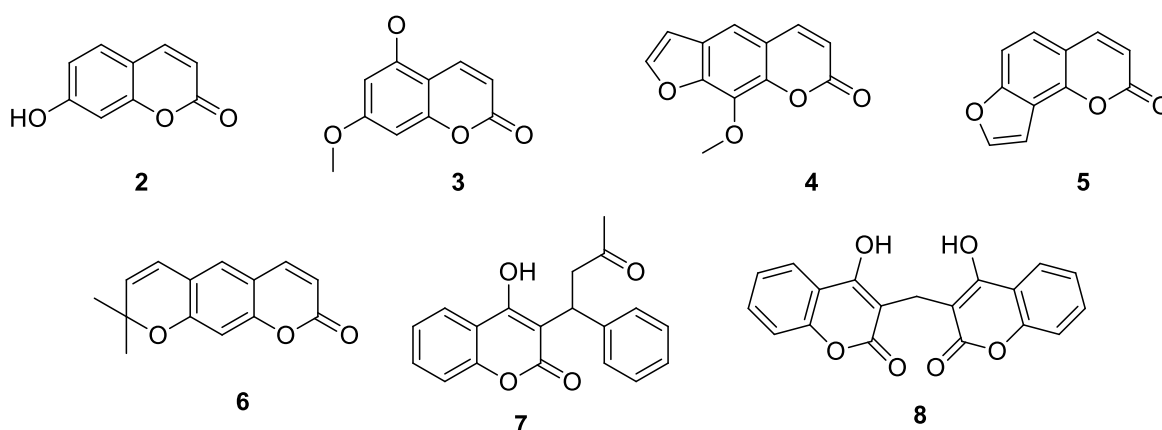
Obrázek 1. Struktura kumarinu 1.

Díky nízké toxicitě mají široké spektrum využití jako aromatické látky v potravinářství, které slouží k aromatizaci tabáků či alkoholu, výrobě parfémů a kosmetiky. Ovšem díky antikoagulačním, antibakteriálním a protirakovinným účinkům jsou jeho deriváty žádoucí ve farmacii. Dokonce se používají i při léčbě HIV.^{2, 3, 5}

1.1 Přírodní kumariny

Přírodní kumariny jsou velmi rozšířené obzvláště v rostlinné doméně, kde mohou být nalezeny v semenech, ovoci, květinách, kořenech, listech či stoncích. Jsou to sekundární metabolity vyšších rostlin, vybraných mikroorganismů nebo hub. Funkce těchto sekundárních metabolitů je převážně spřízněna s ochranným mechanismem rostliny proti býložravcům nebo před napadením mikroorganismy. Tyto sloučeniny jsou tvořeny z fenylyalaninu přes kyselinu šikimovou. Většina přírodních kumarinů obsahuje na pozici 7 oxoskupinu nebo hydroxylovou skupinu.^{4, 6}

Přírodní kumariny jsou obvykle děleny do 4 skupin. První z nich jsou jednoduché kumariny, které mohou mít hydroxylovou (umbelliferon, **2**) nebo alkoxylovou substituci na benzenovém kruhu (limettin, **3**). Další skupinou jsou furanokumariny s pětičlenným furanovým kruhem připojeným k benzenovému kruhu kumarinového skeletu. Furanokumariny se dále dělí na lineární (xanthotoxin, **4**) či angulární (angelicin, **5**). Třetí skupina je složena ze 2 šestičlenných pyranových cyklů přikondenzovaných k benzenu (seselin, **6**). Z hlediska využití je nejznámější poslední čtvrtá skupina antikoagulantů, které se vyznačují různorodými substituenty na pyranovém kruhu v poloze 3 (warfarin **7**; dicoumarol **8**).^{3, 4, 6}



Obrázek 2. Příklady kumarinových sloučenin obsažených v přírodních zdrojích.

V rostlinách se kumariny vyskytují ve volném stavu díky polární struktuře nebo v podobě glykosidů. Jsou charakteristické pro svou UV absorpci s modrou fluorescencí. Tyto vlastnosti jsou využívány dále pro vývoj ionotropních receptorů, fluorescenčních sond nebo biologických barviv pro monitorování enzymatické aktivity či chování živých buněk. Také jsou slibnými pomocníky v netradičních terapiích jako je fotochemoterapie pro podporu léčby dermatologických problémů.⁴

Extrakce kumarinů z rostlin

Existuje více způsobů získávání kumarinů z rostlinných materiálů. Extrakce může probíhat jak ze suchého, tak z živého materiálu. V závislosti na struktuře izolované látky se volí určitý typ rozpouštědla, případně směsi rozpouštědel o různé polaritě. Volba rozpouštědla má zásadní vliv jak na rozpustnost izolovaných sloučenin, tak na snadnost separace získaných

směsí. Některé sloučeniny mohou být například nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech, nebo naopak mohou být extrahovány takové směsi sloučenin, které lze separovat například frakční krystalizací. Jako technické řešení je nejvíce pro extrakci využívána metoda Soxhlet-Henkela a k purifikaci sloupcová chromatografie.⁴

1.2 Syntéza kumarinů

Kumariny a jejich deriváty mohou být získány z velkého množství přírodních zdrojů, což je však velice náročný a zdlouhavý proces. Proto bylo v zájmu organické chemie vyvinout syntetické metody vedoucí k přípravě kumarinů. Nyní existuje celá řada různých způsobů syntézy těchto látek, mezi které je možné zařadit Perkinovu, Pechmannovu i Knoevenagelovu kondenzaci, Wittigův a Claisenův přesmyk, Reformatského reakci, katalytickou cyklizaci, Kostaneskiho reakci a spoustu dalších.^{2, 3, 4, 7, 8}

1.2.1 Perkinova reakce

První syntetický kumarin byl připravený Perkinovou syntézou, která byla popsána již v roce 1868. Její princip spočívá v kondenzaci aromatických aldehydů s karboxylovou kyselinou či s jejím anhydridem za zvýšené teploty. Konkrétně kumarin **1** byl připraven zahříváním sodné soli salicylaldehydu **9** s anhydridem kyseliny octové **10**.⁹

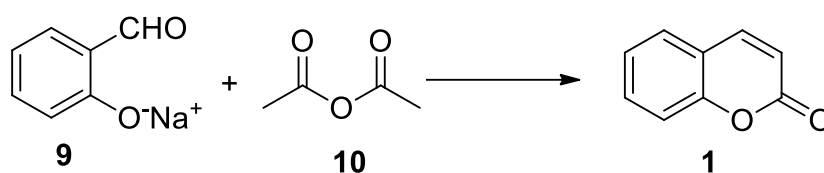


Schéma 1. Perkinova syntéza kumarinu.

Přesný mechanismus syntézy v tu dobu nebyl znám, a tak se pouze předpokládalo, že reakce zahrnuje intermolekulární kondenzaci aldolů následovanou dehydratací.⁹

Crawford a Shaw později zmínili, že formace kumarinu může být způsobena jak intermolekulárně, tak intramolekulárně spolu s laktonizací ještě před dehydratací. Intramolekulární interakce byla podpořena i v článku Majumderů, kteří dokázali vysledovat intramolekulární aldolovou kondenzaci za vzniku meziprojektu *O*-acetylsalicylaldehydu **11** s následnou dehydratací.^{9, 10}

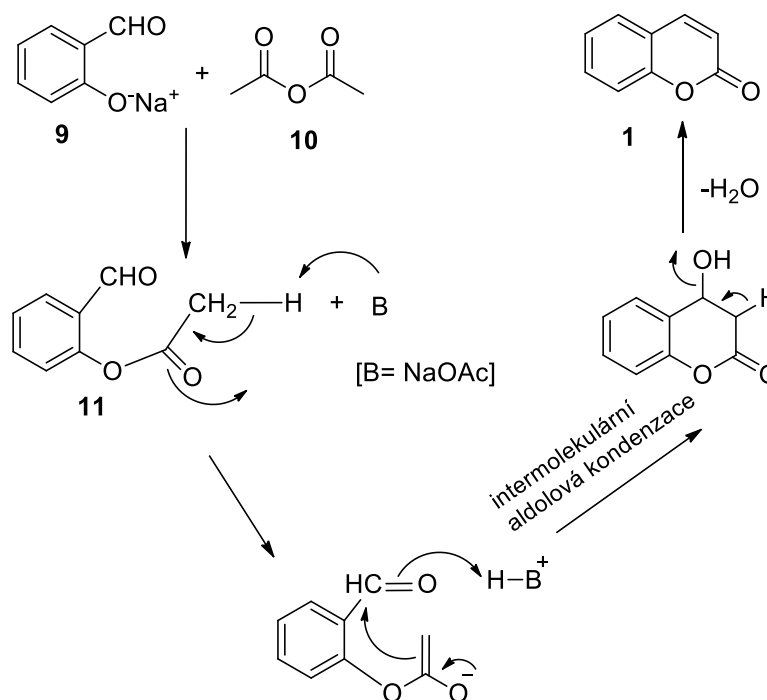


Schéma 2. Mechanismus syntézy dle Majumderů.

U Perkinovy reakce je pozitivní, že nevzniká druhý strukturální izomer, chromano-2-on, jako vedlejší produkt. Ovšem vlivem vysoké teploty, při kterých se reakce provádějí, vzniká velký počet vedlejších látek, díky kterým jsou výtěžky žádaných kumarinů poměrně nízké.¹¹

1.2.2 Pechmannova reakce

Jelikož Pechmannova reakce využívá jednoduchých reagentů, podmínky reakce jsou mírné, výtěžky vysoké, stala se hojně využívanou metodou, která spočívá v kondenzaci fenolu **12** s β -ketoestery **13** v přítomnosti kyselého katalyzátoru. Variabilita použitelných katalyzátorů je značná. Lze použít řadu minerálních kyselin, kyselinu šťavelovou, kyselinu trifluoroctovou, různé Lewisovy kyseliny nebo i heterogenní katalyzátory jako jsou zeolity.^{2, 3, 7, 8, 12}

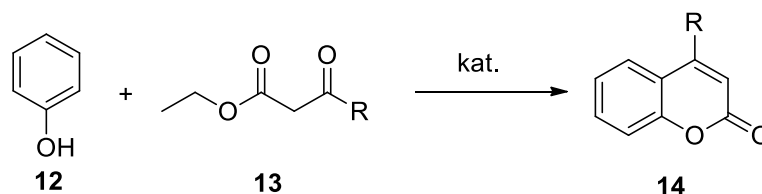


Schéma 3. Obecná Pechmannova reakce.

Pechmannova reakce se skládá ze tří kroků: transesterifikace, elektrofilní aromatické substituce a dehydratace. Po dlouhý čas existovaly pouze domněnky o tom, v jakém pořadí na sebe jednotlivé reakční stupně navazují, protože pro obhajobu navrženého mechanismu nezískali dostatek důkazů. Byl proveden pokus o objasnění mechanismu s využitím monitoringu reakční směsi plynovou chromatografií (GC), avšak Tiagy a spol. namísto meziproduktů detekovali pouze vedlejší produkty. Calvino-Casilda a spol. pak využili Ramanovu spektroskopii v reálném čase, ale opět nebyli schopni meziprodukty detekovat. Tyndall a spol. využili pro objasnění mechanismu Pechmannovy reakce NMR. Během syntézy 7-hydroxy-4-(trifluormethyl)kumarinu **19** dokázali meziprodukty izolovat, identifikovat a podle jejich pořadí výskytu v reakční směsi v daném čase i objasnit mechanismus Pechmannovy reakce. Podle tohoto výzkumu nejdříve dochází k elektrofilní aromatické substituci, poté k transesterifikaci a jako poslední krok dochází k dehydrataci.^{8, 12, 13, 14, 15}

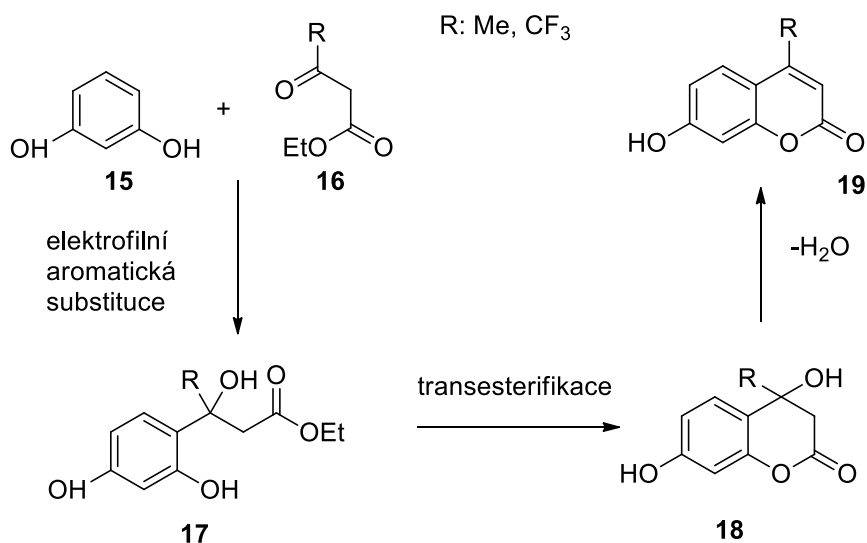


Schéma 4. Návrh mechanismu Pechmannovy reakce dle Tyndalla.

1.2.3 Knoevenagelova reakce

Princip této reakce spočívá opět v kondenzaci aldehydů **20** nebo ketonů se sloučeninami **21** majícími ve své struktuře aktivovanou methylenovou skupinu. Reakce bývá často katalyzována slabými bázemi nebo kombinací aminů s karboxylovými či Lewisovými kyselinami. Metoda poskytuje deriváty kumarinu **22** s velmi dobrými výtěžky.^{2, 16, 17}

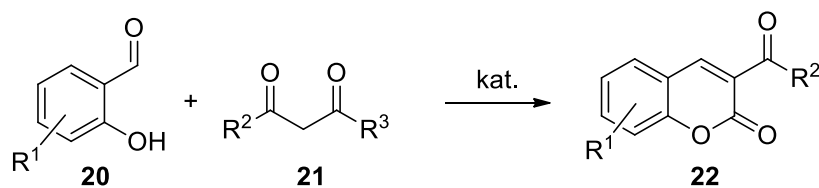


Schéma 5. Obecná Knoevenangelova reakce.

V případech, kdy je použita malonová kyselina v kombinaci s pyridinem, je reakce nazývána Doebnerova modifikace.³

1.2.4 Wittigova reakce

Princip této syntézy spočívá v reakci substituovaných aldehydů nebo ketonů s ylidem fosfonia za vzniku konjugovaných alkenů **24** a meziproductu trifenyl-fosfin oxidu **25** které jsou dále transformovány na kumariny.^{3,7}

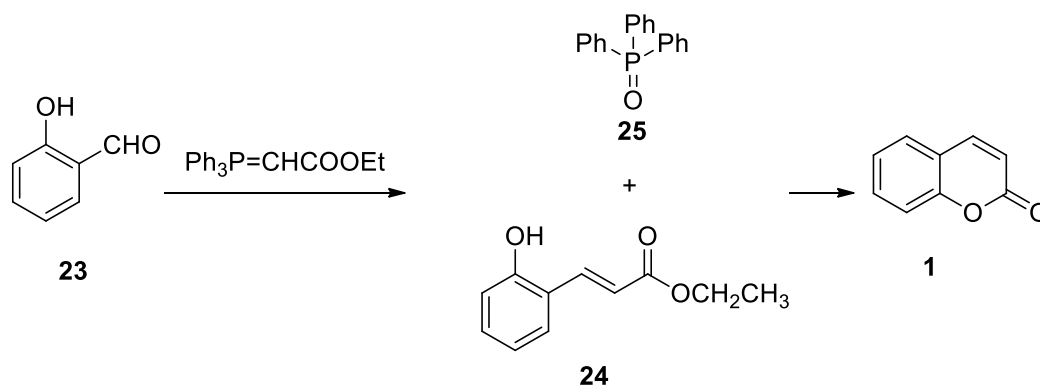


Schéma 6. Obecné schéma Wittigovy reakce.

Pro přípravu derivátů kumarinů **28** mohou být používány deriváty methyl- nebo ethylbenzaldehydu **26**.¹¹

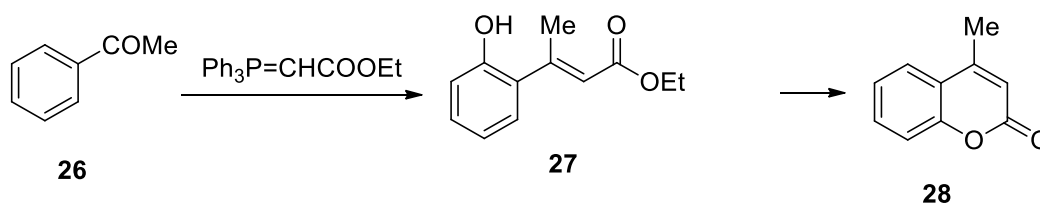


Schéma 7. Syntéza methylového derivátu kumarinu vycházející z Wittigovy reakce.

1.2.5 Kostaneckiova-Robinsonova reakce

Nejčastěji využívanými reaktanty této syntézy jsou *O*-hydroxyarylketony **29**, které po acylaci anhydridem karboxylových kyselin a následné cyklizaci vzniklého meziprojektu **30** poskytují 3,4-disubstituované kumariny **31**.²

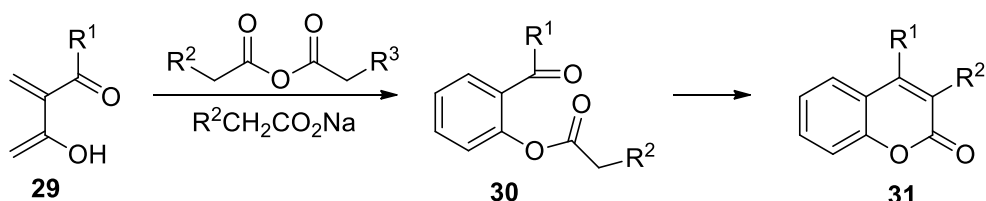


Schéma 8. Kostaneckiova-Robinsonova reakce.

1.2.6 Reformatskyho reakce

Tato metoda spočívá v reakci aldehydů nebo ketonů s α -haloestery v přítomnosti zinku za vzniku β -hydroxyesteru, který je následnou kondenzací přeměněn v kumarin.¹⁵

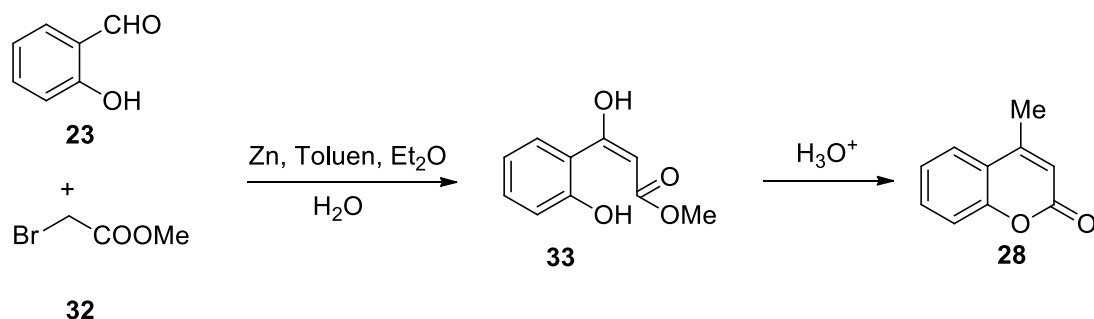


Schéma 9. Obecné schéma Reformatskyho reakce.

S postupem času vznikají další metody syntéz kumarinu či derivátů kumarinů, ač pouhou modifikací klasických metod nebo úplně nové (např. Baylisova-Hillmanova reakce, Michaelova adice a Heckova laktonizační reakce). K modifikaci metod se přistupuje pro získání vyšších výtěžků z reakce, použití jednodušších či levnějších reaktantů, pro rychlejší uskutečnění reakce nebo pro získání jiných derivátů kumarinu, než umožňují klasické metody. V poslední době se však společnost od klasických metod snaží odvrátit převážně kvůli malým výtěžkům a zároveň velkou spotřebou rozpouštědel, která jsou pro životní prostředí závadná nebo dokonce toxická.^{2, 15, 18}

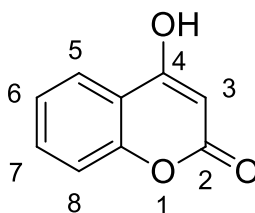
1.3 Reaktivita kumarinů

Kumariny a jejich deriváty jsou vysoce reaktivní sloučeniny díky jejich konjugovanému systému bohatému na elektrony a snadnému přenosu náboje. Tato reaktivita pak pravděpodobně způsobuje otevření cyklu v acylovém centru. Friedelovou-Craftsovou acylací nebo sulfonací je kumarin snadno substituován na atomu uhlíku v poloze 6. Hydroxylová skupina vázaná k atomu uhlíku v poloze 7 lehce podléhá acylaci, benzoylaci či Friedel-Craftsovým reakcím.⁶

2 4-HYDROXYKUMARINY

4-Hydroxykumariny **34** jsou, díky jejich biologickým vlastnostem ovlivňujícím živé systémy, předmětem zájmu různých výzkumných skupin. Ve farmacii je možné je uplatnit jako analgetikum, antirevmatikum, antipyretikum. Jsou u nich také prokázány protizánětlivé a antibakteriální či protirakovinné účinky.^{19,20}

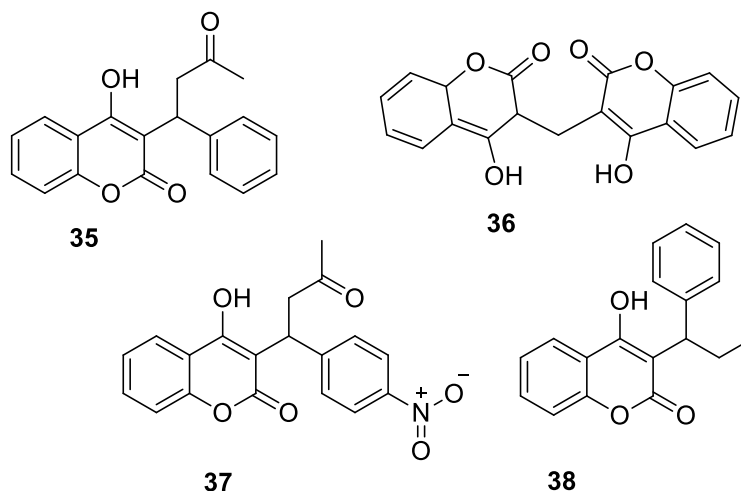
Nejvíce využívaný a tudíž logicky nejvíce známý je warfarin (4-hydroxy-3-(3-oxo-1-fenylbutyl)kumarin), který je jako antikoagulant využíván v boji proti vytváření krevních sraženin u lidí se sklony k trombotickým stavům, plicním emboliím a obecným kardiovaskulárním obtížím. Warfarin je důležitým kumarinovým derivátem ve farmacii pro svůj vysoký antikoagulační účinek a zároveň s nejnižším počtem vedlejších účinků a nejnižší toxicitou.^{19,20}



Obrázek 3. Chemická struktura 4-hydroxykumarinu **34**.

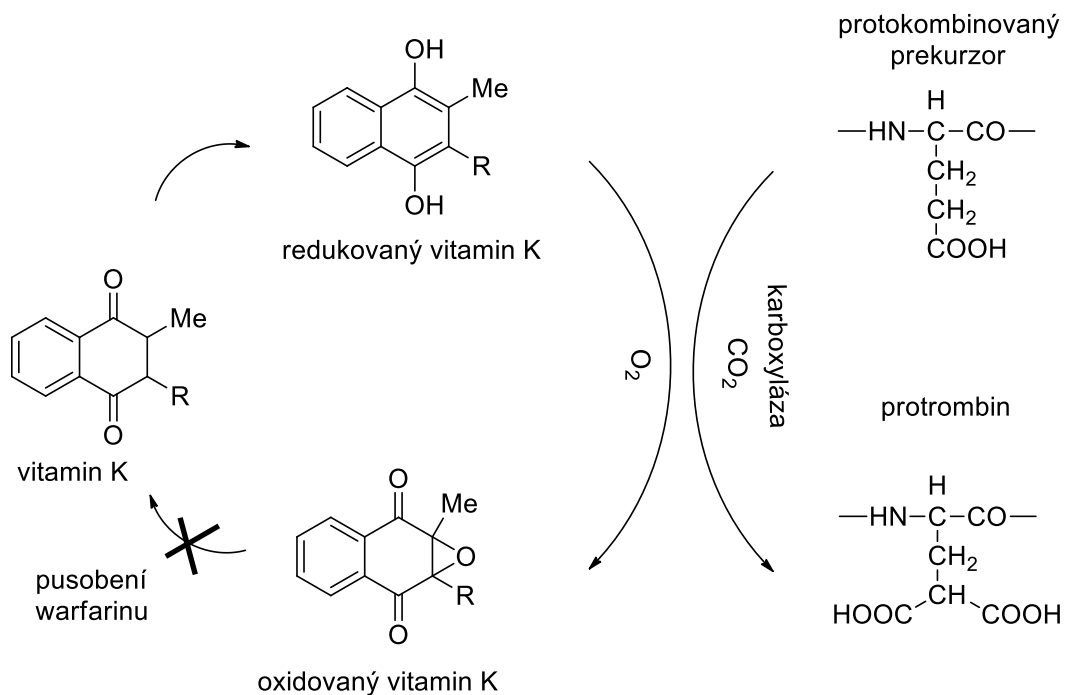
2.1 Antikoagulační 4-hydroxykumariny

Kumarinové deriváty blokují interkonverze vitamínu K a jeho 2,3-epoxidu. Zasahují tak do jejich metabolismu a limitují tvorbu koagulačních faktorů II, VII, IX a X závislých na vitamínu K. U vitamínu K zabraňují i jeho recyklaci. Nejvyužívanější kumariny díky farmakologickým účinkům jsou warfarin **35**, dicumarol **36**, sintron (acenokumarol) **37** a marcumar (fenprokumon) **38**.^{4, 21, 22, 23}



Obrázek 4. Kumarinové antikoagulanty.

Přímý efekt warfarinu je blokáda vitamin K epoxidázy, která redukuje oxidovaný vitamin K (jeho epoxidovou formu) na aktivní redukovanou formu. Tato redukovaná aktivní forma vitamínu K pak poskytuje karboxylovou skupinu enzymu vitamin K – dependentní karboxyláze, umožňující karboxylaci zmíněných koagulačních faktorů. Již vytvořený trombus však warfarin neovlivňuje, protože nemá vlastní fibrinolytickou aktivitu.²⁴



Obrázek 5. Mechanismus účinku warfarinu.

Rizikem používání antikoagulancií je současné ovlivnění tvorby inhibitorů koagulace – proteinů C a S. Tento vedlejší účinek se může projevit hyperkoagulací v začátku léčby kumarinovými deriváty. Léčba kumarinovými deriváty je velice individuální a hodně závisí na klinickém stavu pacienta. Mimo to je vstřebávání kumarinu ovlivněno i potravinovými doplňky, které pak ovlivňují jeho funkci. Pro zamezení možných komplikací je například důležité mít stabilní příjem vitamínu K z potravy.^{4, 21, 22, 23}

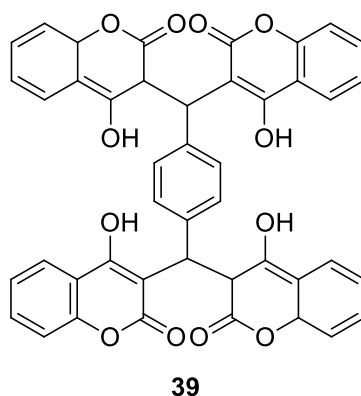
K nálezu antikoagulancií došlo náhodou, když byl dobytek krmen sladkým jetelem napadeným plísní. To vedlo k závažnému onemocnění dobytka pročež bylo charakteristické intenzivní vnitřní krvácení. Fermentace jetele obsahujícího melilotosid způsobila tvorbu 4-hydroxykumarinu a jeho derivátu dikumarolu. Oba, jak je popsáno výše, jsou antagonisté vitamínu K.²⁵

2.2 Fotochemické vlastnosti

Mimo farmakologické účinky jsou deriváty kumarinů zajímavé i díky elektronickým a fotochemickým vlastnostem. Kumariny tak byly používány i v modrozelených laserech pro fluorescenční značení, ve fluorescenčních sondách a enzymatických měřeních. Intenzivní fluorescence nabývají díky substituci funkčními skupinami na vícero pozicích. 4-Hydroxykumariny jsou široce používány jako fluorescenční sondy či biologická barviva díky vysokému kvantovému výnosu fluorescence, fotostabilitě, širokému spektrálnímu rozhraní a dobré rozpustnosti v rozpouštědlech.^{20, 24, 26}

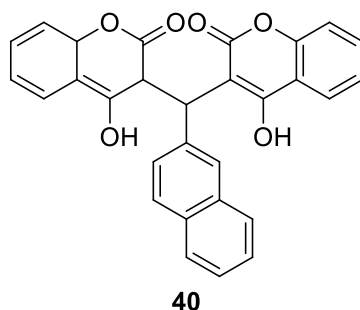
2.3 Léčebné účinky proti HIV

Mezi enzymy HIV byly identifikovány reverzní transkriptáza, proteáza a integráza pro zaměření výzkumu terapeutických sloučenin. Pro první dva enzymy jsou inhibitory v oběhu nebo v klinických studiích. Třetí enzym, integráza, ještě nebyl natolik probádán. Pro jeho inhibici mají silný vliv mnohačetné aromatické hydroxylované kruhy s arylovou substitucí na pozici ortho, čemuž odpovídají deriváty tetrameru 4-hydroxykumarinů **39**.²⁷



Obrázek 6. Základní kumarinový derivát inhibující integrázu **39**.

Tyto deriváty jsou typické svou velikostí, komplexností a symetrií. Zhao a spol. se snažily tetramer 4-hydroxykumarinu modifikovat z důvodu přítomnosti fenylových kruhů, které snižovaly účinek inhibice integrázy. V jejich výzkumu tuto sloučeninu zjednodušili s ponecháním síly inhibice a syntetizovali tak 3,3'-(2-naftalenomethylen)bis[4,7-dihydroxykumarin] **40**, kde fenyl rozšířili na 2-naftylový analog.^{27, 28}



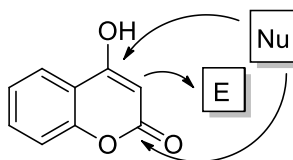
Obrázek 7. Struktura 3,3'-(2-naftalenomethylen)bis[4,7-dihydroxykumarin] **40**.

2.4 Reaktivita

Deriváty 4-hydroxykumarinu jsou žádané pro své účinky v mnoha vědeckých odvětvích. Samotné 4-hydroxykumariny převážně slouží jako výchozí materiál pro syntézu složitějších sloučenin.^{20, 29}

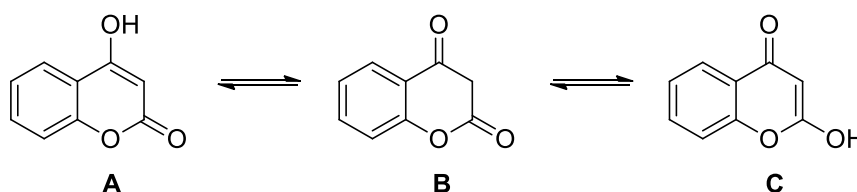
4-Hydroxykumariny mají jak elektrofilní, tak i nukleofilní centra reaktivity. Místo s nejvyšší elektrofilní reaktivitou je na uhlíku v pozici 3. Na tomto místě tak probíhají Mannichovy reakce, couplingové reakce nebo halogenace velmi snadno. Atom kyslíku hydroxylové

skupiny je naopak snadno atakován acylovými nebo alkylovými ionty. Těžké nukleofily tak mají preferenci na atomu kyslíku hydroxylové skupiny, zatímco lehké nukleofily atakují právě uhlík na pozici 2.²⁹



Obrázek 8. Reaktivita atomů uhlíku v různých polohách heterocyklu.

4-Hydroxykumariny díky těmto elektrofilním a nukleofilním centrům mohou existovat ve třech tautomerních formách: 4-hydroxychromen-2-on (**A**), chroman-2,4-dion (**B**) a 2-hydroxychromen-4-on (**C**).^{4, 29}



Obrázek 9. Tautomerní formy 4-hydroxykumarinu.

2.5 Syntéza nesubstituovaných 4-hydroxykumarinů

Prvotní pokusy o syntézu 4-hydroxykumarinů vedly přes syntézu substituovaných 4-hydroxykumarinů na pozici 3. Tyto reakce zahrnovaly kondenzaci chloridu kyseliny acetylsalicylové s acetyloctovou, kyanooctovou a malonovou kyselinou. Poté teprve přes další reakce byl získán samotný 4-hydroxyderivát. Pozdější postupy již využívaly jednodušší cestu přes reakci fenolu a malonové kyseliny v přítomnosti dvakrát až třikrát takového množství ZnCl_2 a POCl_3 . V nynější době existuje více postupů pro dosažení 4-hydroxykumarinu, avšak ty, které využívají fenol nebo 2-hydroxyacetofenon jako startovní reagenty jsou nejpoužívanější.^{24, 30}

2.5.1 Syntéza za použití 2-hydroxyacetofenonu

Reakce 2-hydroxyacetofenonu **23** s ekvivalentním množstvím acylačního činidla jako diethylkarbonát, dimethylkarbonát **41** nebo fosgen v prostředí toluenu nebo bezvodého xylenu a zvolené báze poskytuje 4-hydroxykumarin **34** ve velmi variabilním výtěžku. Výtěžek se v závislosti na použitém acylačním činidle a zvolené bázi pohybuje v intervalu 50–93 %. Jako nejvíce vhodná báze se při analýze výtěžků ukázal hydrid sodný.^{24,31}

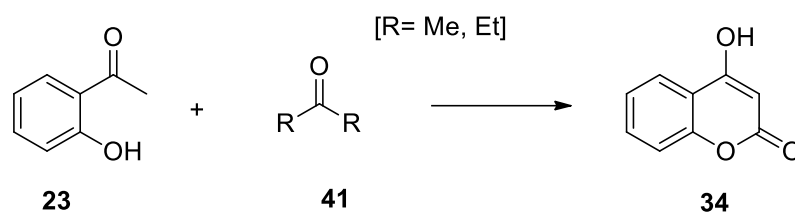


Schéma 10. Syntéza kumarinu z 2-hydroxyacetofenonu.

Další možnou syntézou, kde byl jako výchozí látka využit 2-hydroxyacetofenon **23** je kondenzace s trichloridacetonitrilem v přítomnosti *N*-metylanilinmagnesiumbromidu, (*Z*)-3-amino-3,4,4-trichloro-1-(2-hydroxyfenyl)but-2-en-1-onu. Tato sloučenina je poté přeměněna pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové na 2-(trichlormethyl)chroman **43**. Alkalickou hydrolyzou hydroxidem sodným je poté získán 4-hydroxykumarin **34**.²⁴

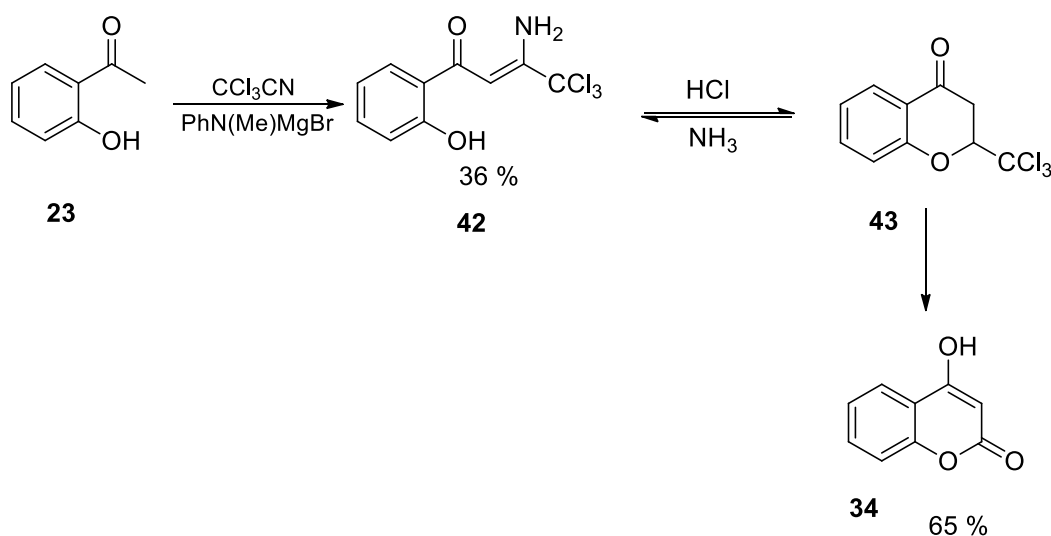


Schéma 11. Syntéza kumarinu z 2-hydroxyacetofenonu s trichloridacetonitrilem.

2.5.2 Syntéza za použití fenolu

Při této metodě v podstatě dochází ke kondenzaci fenolu s β -ketoestery nebo s karboxylovými kyselinami. Autoři citované publikace³² zahříváním fenolu **12** společně s malonovou kyselinou **44**, fosforylchloridem a bezvodým chloridem zinečnatým po dobu dvanácti hodin, připravili s 64% výtěžkem 4-hydroxykumarin **34**.³²

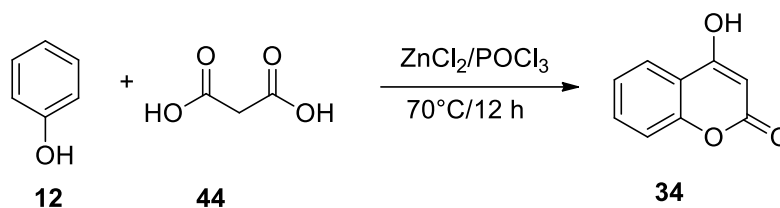


Schéma 12. Syntéza 4-hydroxykumarinu z fenolu.

Dále pak je možné čtyřhodinovým tavením fenolu **12** s Meldrumovou kyselinou **45** získat 3-oxo-3-fenoxypropanovou kyselinu **46**, u které je možné účinkem Eatonova činidla (výtěžek 48 %) nebo polyfosforečné kyseliny (PPA) (výtěžek 75 %) vyvolat intramolekulární cyklizaci poskytující 4-hydroxykumarin **34**.³³

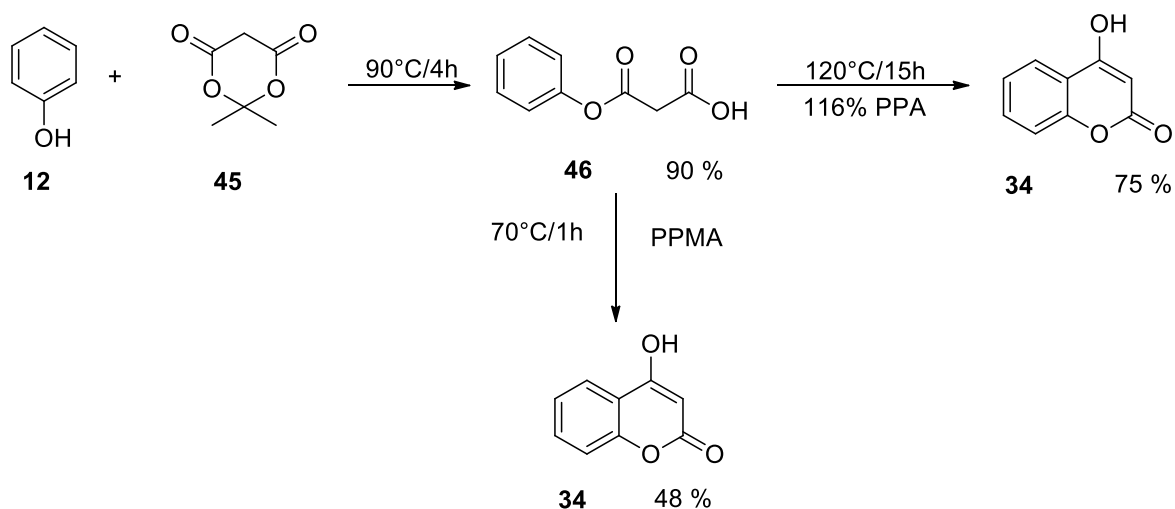


Schéma 13. Příprava 4-hydroxykumarinu z fenolu **12** a Meldrumovy kyseliny **46**.

2.6 Syntéza 3-substituovaných 4-hydroxykumarinů

K syntéze 3-aryl/alkylderivátů 4-hydroxykumarinu **48** lze přistupovat mnoha způsoby. Autoři jedné z nejstarších syntéz byli Ziegler a Junek, kteří studovali vliv relativně vysoké teploty a AlCl_3 na difenyl-malonát **47**.³⁴

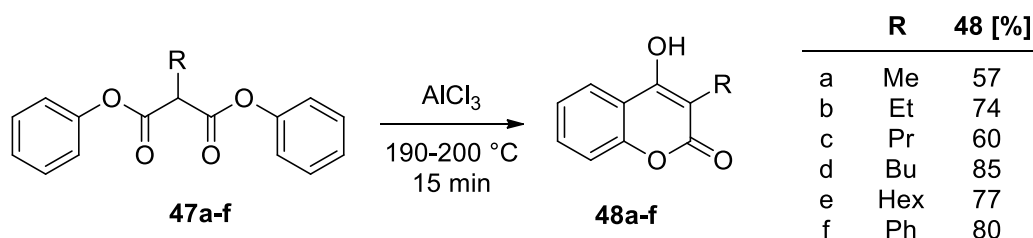


Schéma 14. Syntéza derivátů 4-hydroxykumarinu dle Zieglera a Junka.

Druhá metoda, presentovaná na Schématu 15, vychází z původní, výše zmiňované reakce Zieglera a Junka. Autoři Mentzer a Verciera využívali snadněji dostupný diethyl-fenylmalonát, který několik hodin zahřívají s fenolem na vysokou teplotu pohybující se postupně až k $350\text{ }^\circ\text{C}$. V prvním stupni této reakce, za nižších teplot, docházelo k interakci hydroxylové skupiny fenolu **12** s funkční skupinou diesteru **49** a teprve poté, při vyšších teplotách, nastane cyklizace poskytující 3-fenyl-4-hydroxykumarin **50** ve fantastickém 95% výtěžku.^{34, 35}

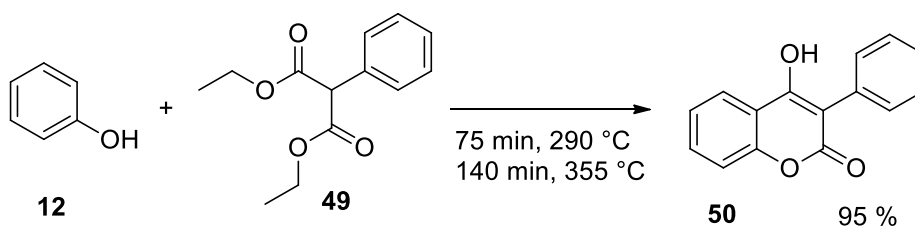


Schéma 15. Reakce Mentzera a Verciera pro syntézu 3-fenyl-4-hydroxykumarinu.

Identický fenylový derivát **50** je možné získat i substitucí samotného 4-hydroxykumarinu **34**, který je v prvním kroku vícestupňové syntézy převeden na fenylijodonium kumarinát **51**. Ten pak dále, jak je uvedeno ve schématu 16, v podobě zwitterionu, kde je kladný náboj na atomu jodu vykompenzován záporným nábojem na sousedním atomu kyslíku, interaguje s fenyloborovou kyselinou za přítomnosti palladnaté soli jako katalyzátoru na požadovaný

3-fenyl-4-hydroxykumarin **50**. Tato Suzukiho reakce dává žádoucí fenylový derivát 4-hydroxykumarinu se stále vysokým výtěžkem 72 %.³⁶

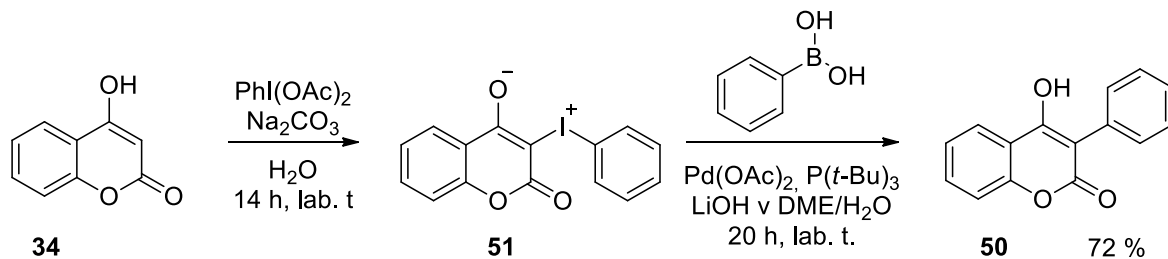


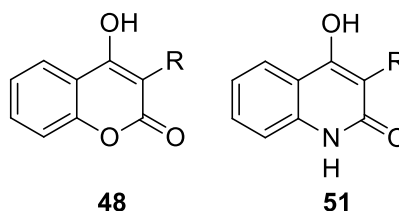
Schéma 16. Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu **50** dvoukrokovou Suzukiho reakcí.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Úvod do problematiky

Kumariny jsou předmětem mnoha výzkumů pro jejich farmakologické účinky, které se syntézou a vývojem nových derivátů stále rozšiřují. Ve výzkumné skupině doc. Kafky Ústavu chemie UTB se již desítky let věnují syntéze a reaktivitě 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **51**. Během této dlouhé doby již bylo prozkoumáno velmi mnoho, a proto, řekněme před dvěma lety, začala být pozornost také částečně zaměřována ke strukturně podobným 4-hydroxykumarinům **48**. Jelikož syntézy 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **51** jsou na našem ústavu optimalizovány natolik, že jejich výtěžek převyšuje hranici 80 %, bylo dohodnuto, že prvotní analogické experimenty směřované k přípravě kumarinů **1** budou kopírovat reakční podmínky přípravy jejich dusíkatých analogů.



Obrázek 10. Struktura 4-hydroxykumarinů **48** a 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **51**.

Úkolem této práce bylo prozkoumat možné způsoby vzniku derivátů 4-hydroxykumarinu. Nejdříve bylo potřeba projít si již dříve zavedené syntézy 4-hydroxykumarinů, seznámit se se vzniklými produkty a jejich vlastnostmi a snažit se modifikací známých postupů dosáhnout vyšších výtěžků.

3.2 Syntéza 4-hydroxykumarinu z diesteru kyseliny malonové

Jak již bylo naznačeno výše, první kroky vedly k prozkoumání možnosti přípravy 3-fenyl-4-hydroxykumarinu zahříváním směsi fenolu **12** s diethyl-fenylmalonátem **49**. Jejich kondenzace začínala, usuzováno dle prvních vydestilovaných kapek reakcí uvolňovaného ethanolu, při 220 °C. Při této teplotě docházelo k tvorbě meziprojektu **52**, který až za vyšších teplot (280–310 °C) podlehl intramolekulární cyklizaci

poskytující 4-hydroxykumarin **50**, který byl, po přečištění opakovanou digerací toluenem, adsorpcí nežádoucích nízkomolekulárních látek na aktivní uhlí z jeho alkalického roztoku a vysrážením zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, získán s výtěžkem 41 %. Tato termální kondenzace probíhala v souladu s dostupnou literaturou³⁷, ačkoliv s polovičním výtěžkem. Produkt byl potvrzen pomocí IČ i ¹H NMR spektry (Obrázek 11.).

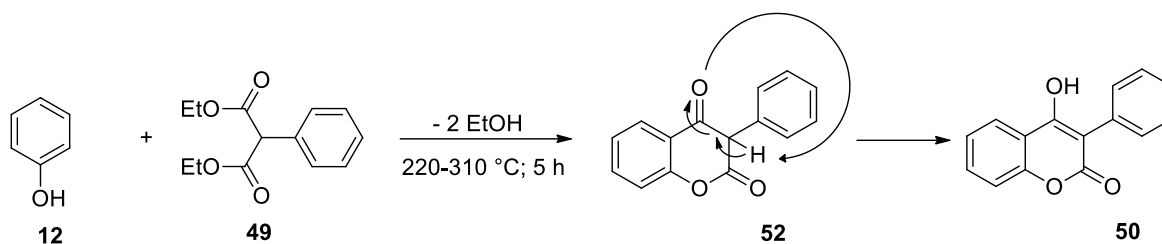
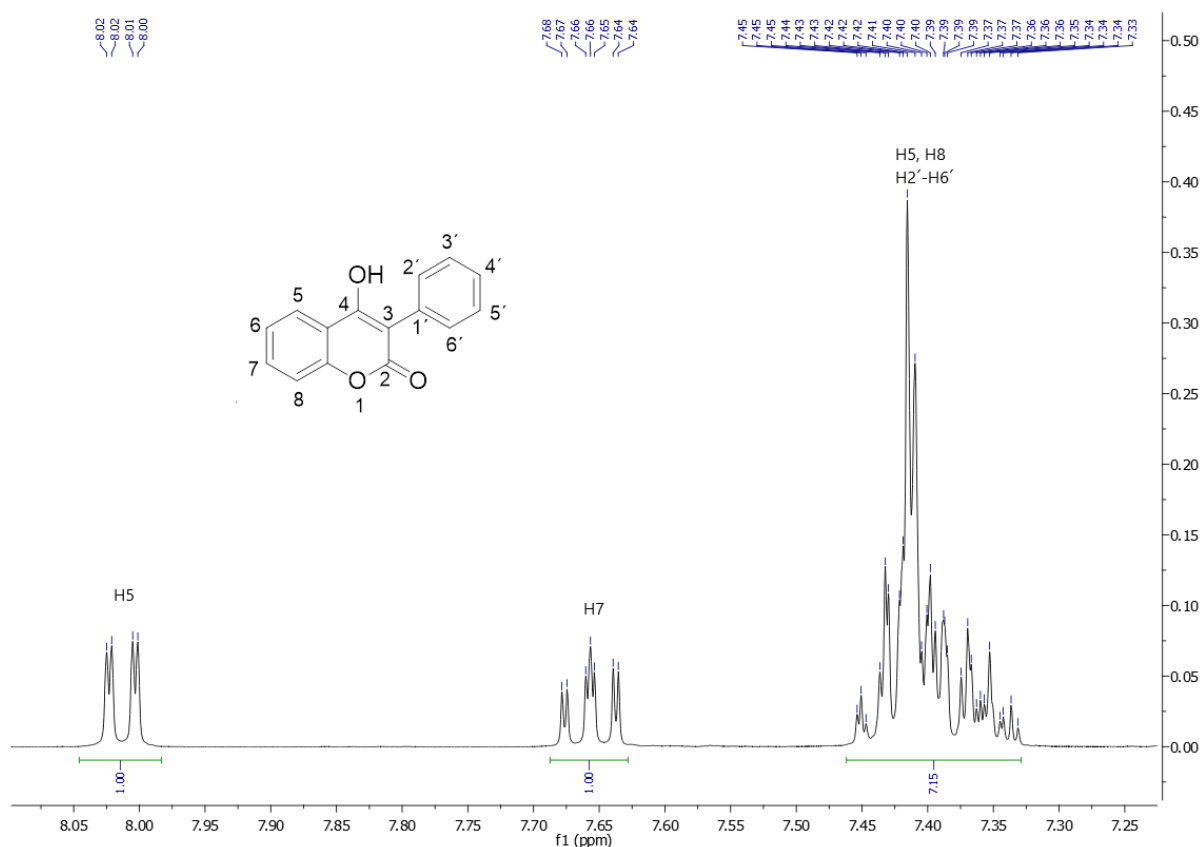


Schéma 17. Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu.



Obrázek 11. Výřez z ¹H spektra 3-fenyl-4-hydroxykumarinu **50**.

3.3 Syntéza 4-hydroxykumarinu přes 2-fenylmalonovou kyselinu

V dalších pokusech o syntézu fenylového derivátu 4-hydroxykumarinu byl zvolen vícekrokový postup vycházející z přípravy 2-fenylmalonové kyseliny **53**.

3.3.1 Syntéza 2-fenylmalonové kyseliny

Jako první metoda byla vyzkoušena alkalická hydrolyza diethyl-fenylmalonátu **49**, ze kterého po hodinovém varu ve vodném roztoku NaOH vznikly ovšem dva produkty. Ty byly při zpracování reakční směsi extrakcí, na základě rozdílné rozpustnosti v chloroformu, z velké části od sebe separovány a následně po krystalizaci z ethanolu podrobeny základním metodám instrumentální analýzy. Z NMR spekter vyplynulo, že hlavní produkt je 2-fenylmalonová kyselina **53** s výtěžkem 49 %, ze které dekarboxylací vznikla jako vedlejší produkt fenyloctová kyselina **54** s výtěžkem 25 %. Dále pak bylo zjištěno, že monitoring reakční směsi s využitím GC-MS není v tomto případě ideální. Ba naopak, není vůbec vhodný, a to z toho důvodu, že ve všech případech, i při měření téměř čisté 2-fenylmalonové, byl v chromatogramu patrný pouze pík s retenčním časem 7,463 min odpovídající kyselině 2-fenyloctové. K tomuto faktu jsou možná dvě vysvětlení. První z nich je, že 2-fenylmalonová kyselina v útrokách instrumentu je tak nestabilní, že nastane prakticky absolutní dekarboxylace, anebo spíše 2-fenylmalonová kyselina neprojde chromatografickou kolonou a analyzována je pouze nedostatečně separovaná kyselina 2-fenyloctová.

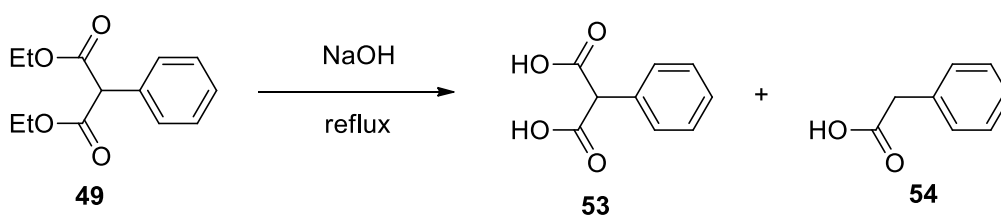
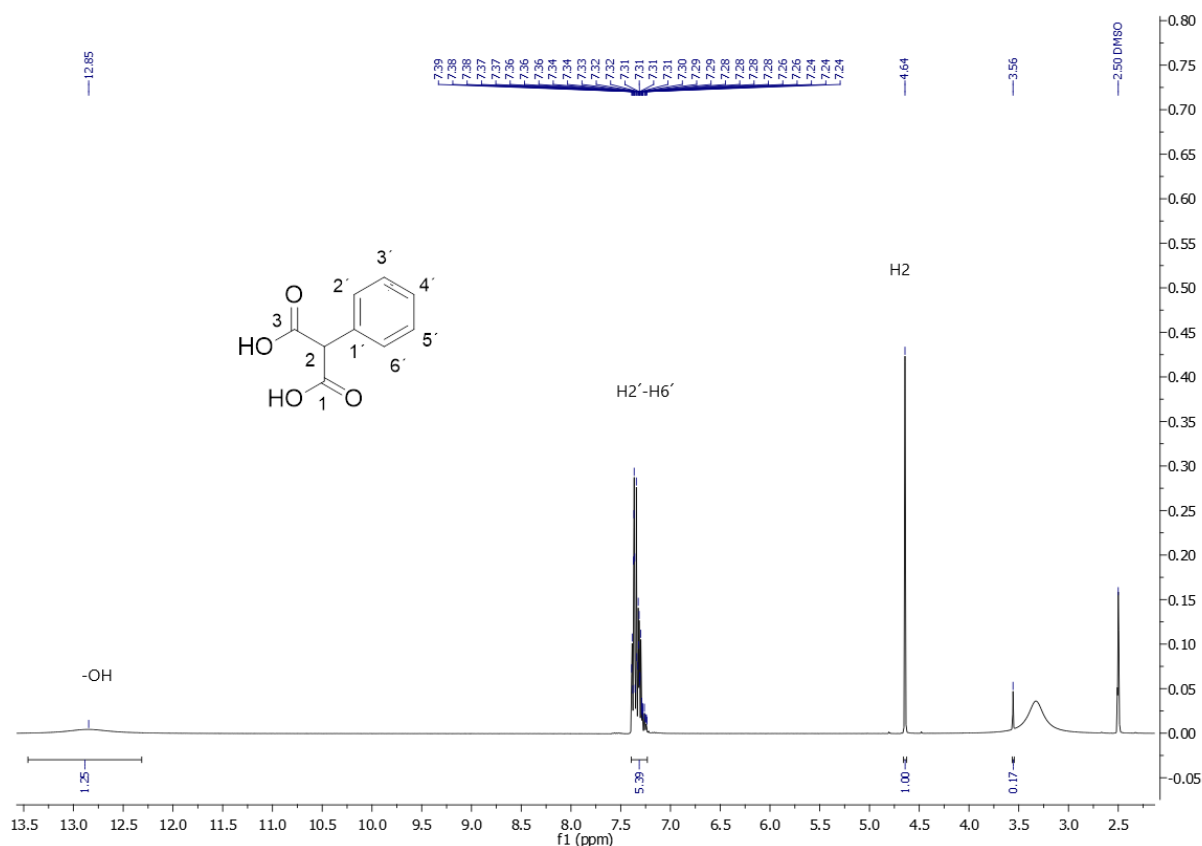


Schéma 18. Syntéza 2-fenylmalonové kyseliny.

Byla vyzkoušena i modifikovaná metoda, alkalická alkoholýza, která byla provedena za laboratorní teploty. Mírné reakční podmínky potlačily nežádoucí dekarboxylační reakci, což vedlo pouze k tvorbě požadovaného produktu **53**, s čímž je úzce spjatý i jeho jednodušší izolace z reakční směsi a navýšení výtěžku na 58 %.



Obrázek 12. Výřez z ^1H spektra 2-fenylmalonové kyseliny **53**.

3.3.2 Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu

Následně byl fenol **12**, dle publikovaného postupu³⁸, 8 h zahříván pod atmosférou argonu na teplotu 65–70 °C s 2-fenylmalonovou kyselinou **53** v trichlorid fosforilylu za přítomnosti Lewisovy kyseliny (ZnCl_2). Po ukončení reakce byl alkalizací vzniklé směsi vysrážen hydroxid zinečnatý, který byl odstraněn pouhou filtrací. Kumarin **50** byl získán extrakcí ethylacetátem z vodné fáze.

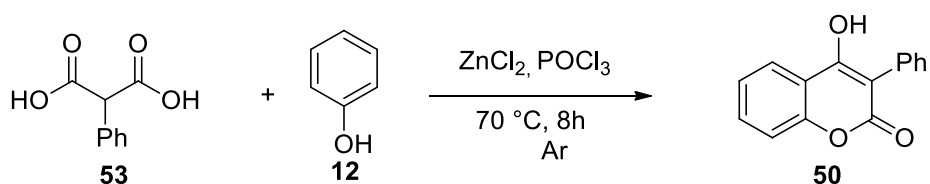


Schéma 19. Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu z 2-fenylmalonové kyseliny.

Jelikož byl relativní výtěžek sloupcovou chromatografií přečištěného kumarinu **50** necelých 6 %, byla tato metoda modifikována tak, že v následujícím experimentu byla nejprve hodinu zahřívána kyselina 2-fenylmalonová s POCl_3 a teprve poté byl přidán fenol s chloridem zinečnatým. Ovšem na výsledek to bohužel nemělo prakticky žádný vliv. Proto byl ještě proveden pokus o záměnu trichlorid fosforu za chlorid thionylu. Ani touto obměnou však nebylo dosaženo úspěchu.

3.4 Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu přes dichlorid kyseliny 2-fenylmalonové

Z důvodu mizerného výtěžku 4-hydroxykumarinu **50** předchozími způsoby, který se pohyboval v jednotkách procent, bylo rozhodnuto, že se nejprve připraví a izoluje dichlorid kyseliny 2-fenylmalonové, ten měl mimo jiné v předchozích pokusech vznikat *in situ*, který již, díky své vysoké reaktivitě, s fenolem reagovat musí.

3.4.1 Chlorace kyseliny 2-fenylmalonové

Za účelem vzniku malonyldichloridu **55** byla kyselina 2-fenylmalonová na olejové lázni vařena v thionylchloridu pod inertní atmosférou argonu po dobu pěti hodin. Po ukončení reakce byl surový produkt po odpaření přebytečných těkavých látek podroben ^1H NMR analýze. Protože tento pokus již byl předtím prováděn v rámci naší výzkumné skupiny, mohla být změřená spektra mezi sebou porovnána. Obdobně jako předtím, i tady vznikala směs dichloridu **55** a jeho dehydrohalogenovaného produktu ketenu **56**. Protože v publikovaném článku bylo uvedeno³⁹, že tyto dva produkty nelze od sebe separovat a s dříve získanou směsí nebylo dále nikterak experimentováno⁴⁰, bylo nasnadě reakci s fenolem, i přes přítomnost ketenu, zkusit.

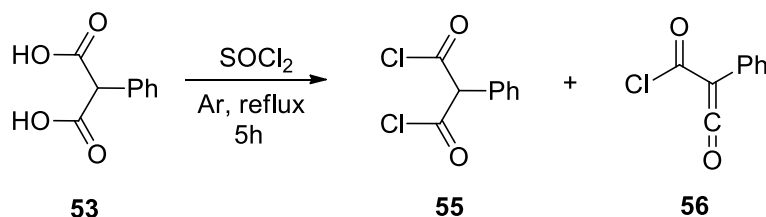
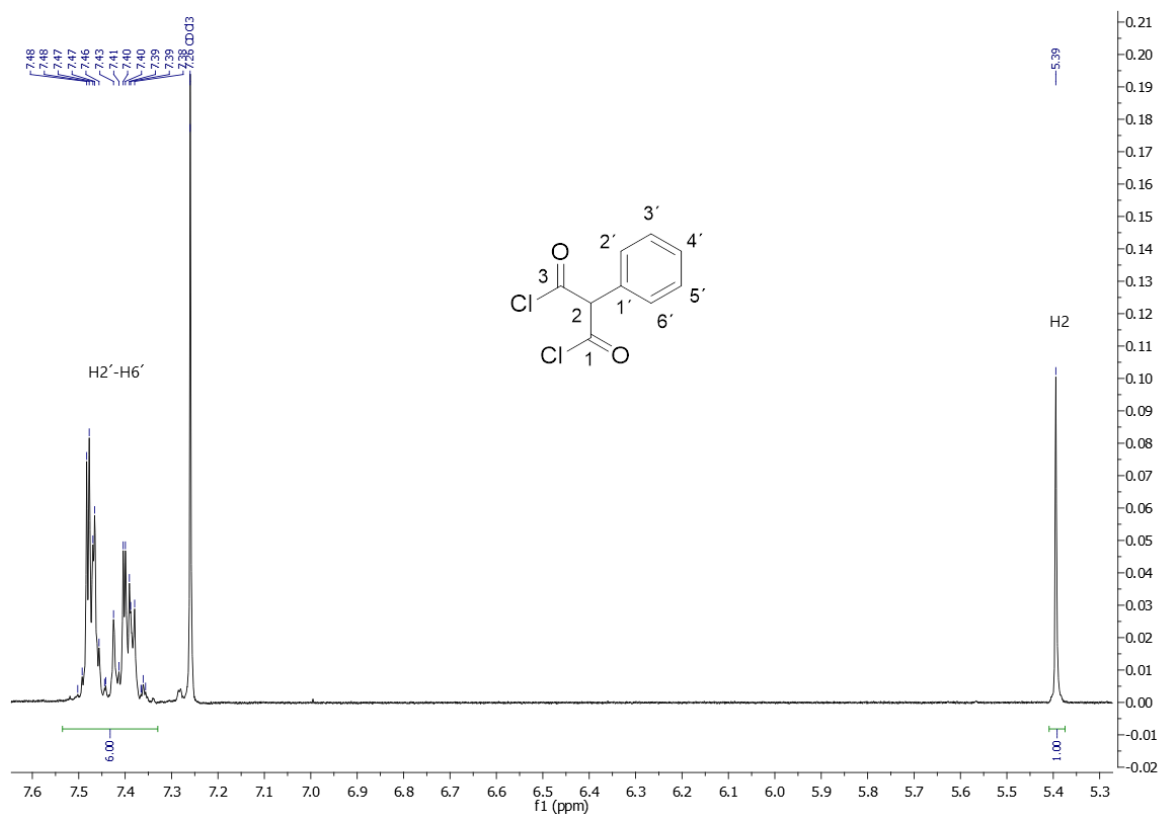


Schéma 20. Syntéza dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny.

Abychom ověřili myšlenku, že k dehydrohalogenaci, a tedy ke vzniku ketenu **56**, dochází vlivem dlouhého varu, byla zkoušena chlorace kyseliny také bez záhřevu. Samotným mícháním však nebylo možné během 12 hodin kyselinu za laboratorní teploty v thionylchloridu rozpustit. V ^1H NMR spektrech odebraného vzorku z reakční směsi nebyl žádaného dichlorid kyseliny pozorován. Proto byla suspenze krátce zahřáta, pouze po čas, než došlo k rozpuštění výchozí kyseliny (10 min) a už během této krátké doby byl v ^1H NMR spektru zaznamenán jistý progres. Po jedné hodině varu byl v ^1H NMR spektru přítomen hlavní produkt **54** s výtěžkem 98 % (Obrázek 13.), nicméně se po integraci spektra vyskytl jeden proton navíc, který si nedokážeme vysvětlit. V každém případě keten v reakční směsi nevznikal.



Obrázek 13. Výřez z ^1H spektra dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny **55**.

3.4.2 Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu

Směs dichloridu **55** a ketenu byla smíchána s fenolem **12** (v poměru 10:9 kvůli přítomnosti ketenu) a tetrahydrofuranem (THF) za současného přidavku triethylaminu (TEA) pro

eliminování vzniku kyseliny chlorovodíkové. Reakce se nezdařila a jako důvod mohlo být zahlcení TEA zbytkem síranu ve směsi kyseliny a ketenu z předchozí reakce.

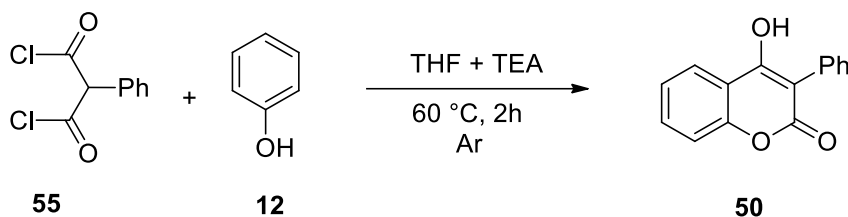


Schéma 21. Neúspěšná one-pot syntéza kumarinu z dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny.

Pro přípravu 3-fenyl-4-hydroxykumarinu **50** byly vyzkoušeny dva experimenty, které se vzájemně lišily pouze v typu použité báze a rozpouštědla a v reakční teplotě. Zvoleny byly kombinace tetrahydrofuran (THF) s triethylaminem (TEA) nebo dimethylformamid (DMF) s uhličitanem draselným.

Nejdříve byl fenol **12** s danou bází a v daném rozpouštědle 30 minut zahříván na olejové lázni s teplotou 80 °C. Následně byl ke směsi přidán dichlorid kyseliny **55** a vše bylo vařeno pod zpětným chladičem. Díky přítomnosti chloridu se předpokládalo, že reakce proběhne velmi rychle, avšak po čtyř hodinovém refluxu nebyl na TLC ani náznak vzniku kumarinu. V obou případech surová směs, po odfiltrování pevných látek z reakční suspenze (v případě použitého TEA se jednalo o jeho hydrochlorid a v případě K_2CO_3 se jednalo o blíže neidentifikované látky anorganické povahy) a odpaření rozpouštědla, dle TLC převážně obsahovala fenol, kyselinu 2-fenylmalonovou a stopy vedlejších látek.

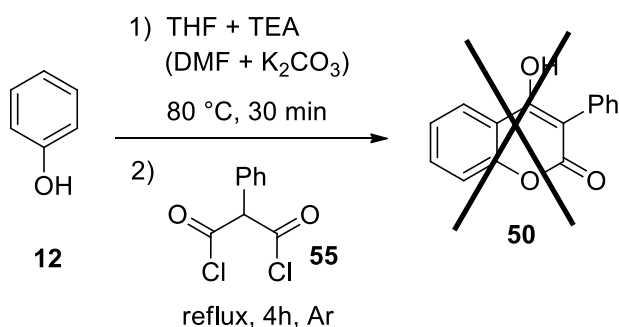


Schéma 22. Neúspěšná syntéza kumarinu z dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny.

3.5 Syntéza 2-methylmalonové kyseliny

Protože byl očekáván úspěch v syntéze fenylového derivátu 4-hydroxykumarinu **50** z kyseliny 2-fenylmalonové **53**, byla paralelně syntetizována i kyselina 2-methylmalonová **57** pro pozdější pokusy o syntézu methylového derivátu 4-hydroxykumarinu.

3.5.1 Syntéza 2-methylmalonové kyseliny

Diethyl-methylmalonát **56** byl rozpuštěn ve vodném roztoku NaOH a zahříván po dobu 4 hodin. Oddělením organické a anorganické fáze pak vznikly dva surové produkty. Oba byly podrobeny ^1H NMR analýze a jeden z nich ukazuje na dichlorid kyseliny methylmalonové **58**. Tato reakce měla výtěžek velmi kolísavý mezi 8 a 17 %, kdy si rozdíl nedokážeme vysvětlit, neboť reakce probíhaly za stejných podmínek.

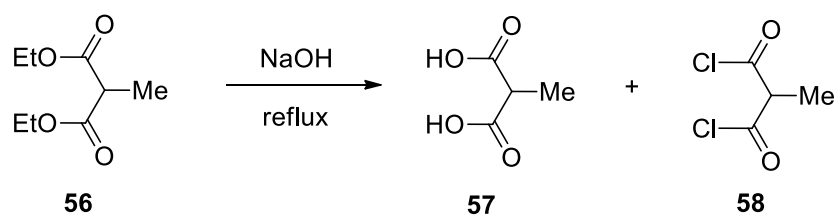
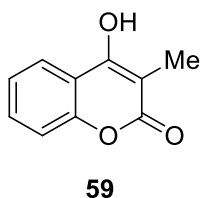


Schéma 23. Syntéza 2-methylmalonové kyseliny.

Z důvodu prozatímního nezdaru v syntéze fenylového derivátu kumarinu **50** z 2-fenylmalonové kyseliny, případně z jejího dichloridu, nebylo přistoupeno k dalšímu studiu reaktivity jejich methylového derivátu **59**.



Obrázek 14. Struktura 3-methyl-4-hydroxykumarinu **59**.

4 POPIS PŘÍSTROJOVÉ VÝBAVY A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

Rozpouštědla a reagenty byly zakoupeny z komerčních zdrojů (Sigma Aldrich, Fluka). Pro pozorování průběhu reakcí byla používána chromatografie na tenké vrstvě (TLC), pro kterou byly využívány komerční hliníkové destičky s nanesenou vrstvou silikagelu (Alugram® SIL G/UV 254; 220–240 mesh; Macherey-Nagel) s fluorescenčním indikátorem pro UV 254. Sloupcová chromatografie probíhala na silikagelu Fluka Silica gel 60, 220-240 mesh. Měření teplot tání bylo prováděno na Koflerově bloku bez korigování. Infračervená spektra (IČ) byla měřena na FT-IR spektrometru značky Alpha (Bruker Optik GmbH Ettlingen) technikou použití KBr tablet. Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla měřena na spektrometru JEOL ECZ 400 při frekvenci 400 MHz pro ^1H a 101 MHz pro ^{13}C spektra, vše při teplotě 300 K. Spektra ^1H NMR byla korigována na signál residua DMSO- d_5 s chemickým posunem δ 2,50 ppm a CDCl_3 s posunem 7,25 ppm. ^{13}C NMR spektra byla korigována na ^{13}C signál DMSO- d_6 s chemickým posunem 39,50 ppm a ^{13}C signál CDCl_3 s chemickým posunem 77,16 ppm. Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm a Interakční konstanta J v jednotkách Hz. Multiplicita signálů je značena zkratkami s (singlet), d (dublet), dd (dublet dubletu), ddd (dublet dubletů dubletu), t (triplet), m (multiplet). ESI-MS experimenty byly provedeny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X, Bruker Daltonics, iontovým zdrojem byl elektrosprej. GC-MS experimenty byly provedeny na plynovém chromatografu spojený s hmotnostním spektrometrem vybaveným kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem Shimadzu GC-MS QP2010. Plynový chromatograf byl vybavený kolonou Supelco 1 (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm). Pro všechny analýzy byl zvolen následující teplotní program: 100 $^\circ\text{C}/7$ min; 30 $^\circ\text{C}/\text{min}$ a teplotou nástřiku 250 $^\circ\text{C}$. Nosný plyn byl He a iontový zdroj měl 200 $^\circ\text{C}$, 70 eV. Všechny tyto analýzy byly prováděny za lineární konstantní rychlosti 52 cm/s. Ve výpisy signálů z hmotnostních spekter jsou uvedeny hodnoty iontů s relativním zastoupením nejméně 5 %, vyjma molekulových iontů. Hodnoty intenzit vybraných fragmentů jsou uvedeny v závorce za hodnotou m/z. ESI-IT-MS analýzy byly provedeny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) vybaveném elektrosprejovým iontovým zdrojem. Veškerá měření byla provedena v negativním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při kontaktním průtoku 3 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Ostatní parametry měření byly následující: napětí na kapiláře + 4,2 kV; teplota sušícího plynu (220 $^\circ\text{C}$); průtok sušícího plynu (6 $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$); tlak rozprašovacího plynu

(55,16 kPa). Jako rozprašovací plyn byl použit dusík. Případné další parametry byly optimalizovány během jednotlivých experimentů. Tandemová hmotnostní spektra byla po izolaci vybraného iontu měřena pomocí kolizí indukované disociace (CID).

5 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

5.1 Příprava 3-fenyl-4-hydroxykumarinu

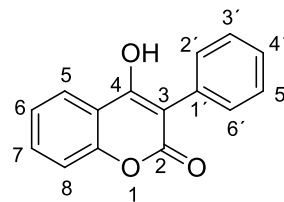
Suspenze fenolu (110 mmol, 9,41 g) a diethyl-fenylmalonátu (110 mmol 98 %, 26,5309 g) jantarové barvy byla zahřívána na kovové lázni. Teplota kovové lázně měla 220 °C a postupně se zvyšovala až na 310 °C. Během záhřevu byl jímán kondenzát ethanolu do baňky a kontrolován tak průběh reakce. Po pěti hodinách byl reakční roztok černé barvy a za horka byl nalit do 200 ml toluenu. Vyloučený pevný podíl byl opakovaně macerován ve vroucím toluenu a během vakuové filtrace toluenem promýván. Pevný podíl byl rozpuštěn 0,5 M NaOH (160 ml) a přečištěn aktivním uhlím, které bylo poté odfiltrováno. Následně proběhlo srážení 5% HCl do neutrálního pH. Žlutý pevný podíl byl odfiltrován přes fritu, promyt vodou, rozpuštěn ve vroucím EtOH, za horka přefiltrován a ponechán k samovolné krystalizaci.

3-fenyl-4-hydroxykumarin (50)

Žlutá lesklá krystalická látka, $t_f = 230\text{--}240$ °C (EtOH),
výtěžek 41 %, $R_f = 0,38$ (PE:EtOAc, 5:3).

IČ spektrum (tableta KBr): 3056, 1673, 1610, 1566, 1495, 1425,
1313, 1259, 1229, 1191, 1101, 1032, 991, 896, 853, 757, 692, 554,
506,462 cm^{-1} .

^1H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz): δ 7,33–7,45 (m, 7H, H6, H8, H2'-H6'); 7,64–7,68 (m, 1H, H5); 8,01 (dd, 1H, H5 $J = 1,5$ Hz) ppm.



5.2 Příprava 2-fenylmalonové kyseliny

Metoda se záhřevem

Směs vodného roztoku NaOH (125 mmol, 5,0333 g, 15 ml dest. vody) a diethyl-fenylmalonátu (25 mmol, 98%, 6,0152 g) byla zahřívána na 90 °C vytemperované olejové lázni po dobu 1 hodiny. Reakční suspenze byla naředěna ethanolem pro rozpuštění krystalů a okyselena 0,5 M HCl na pH 2. Proběhla extrakce organického podílu pomocí ethyl-acetátu, vysušení Na₂SO₄ a odpaření na RVO dosucha. Surový produkt byl krystalizován ve vroucím EtOH.

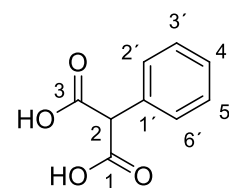
Metoda bez záhřevu

Diethyl-fenylmalonát (25 mmol, 98 %, 6,0152 g) byl rozpuštěn v 19 ml ethanolu a smíchán se směsí KOH (125 mmol, 7,013 g) rozpuštěného v 19 ml ethanolu. Tato směs byla ponechána k míchání za laboratorní teploty do druhého dne (cca 15 hod). Ethanol byl poté odpařen na RVO a surový produkt rozpuštěn v destilované vodě (cca 100 ml). Bylo poté nutné oddělit organický podíl extrakcí ethylacetátem (5x 40 ml) a tento podíl vysušit síranem sodným. Síran bylo nutné odfiltrovat a surový produkt byl vysušen na RVO dosucha.

2-fenylmalonová kyselina (53)

Bílá lesklá krystalická látka, $t_f = 150-160$ °C (EtOAc), výtěžek 58 %.

IČ spektrum (tableta KBr): 3184, 3038, 2944, 2887, 2659, 2564, 2534, 1740, 1703, 1423, 1395, 1292, 1193, 1156, 937, 868, 757, 717, 700, 665, 452 cm⁻¹.



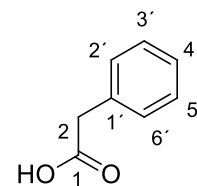
ESI-MS (neg.) m/z (%): 178,7 [M-H⁺]⁻ (15); 134,8 [M-H⁺-CO₂]⁻ (100).

¹H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz): δ 4,64 (s, 1H, H-2); 7,39–7,24 (m, 5H, H-2^A, H-3^A, H-4^A, H-5^A, H-6^A); 12,85 (s, 2H, OH) ppm.

Fenylactová kyselina (54)

Bílá krystalická látka, $t_f = 65-75\text{ }^\circ\text{C}$ (CHCl_3), $R_f = 0,4$ (PE:EtOAc, 5:3),
výťažek 25 %.

IČ spektrum (tableta KBr): 3064, 3033, 2964, 2923, 2736, 2656, 2559,
1699, 1499, 1454, 1408, 1341, 1244, 1187, 926, 904, 752, 700, 678, 604,
479 cm^{-1} .



^1H NMR spektrum (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3,65 (s, 2H, H-2); 7,26-7,36 (m, 5H, H2'-6') ppm.

^{13}C NMR spektrum (CDCl_3 , 101 MHz): δ 41,23 (C2); 127,54 (C4'); 128,83 (C3', C5');
129,55 (C2', C6'); 133,45 (C1'), 178,04 (C1) ppm.

GC-EI-MS ($t_R = 7,540$ min): 65,05(21,50); 91(100); 92,05(17,49); 136(23,57) m/z(%).

5.3 Příprava 3-fenyl-4-hydroxykumarinu přes kyselinu 2-fenylmalonovou

5.3.1 Použití POCl_3

A

Fenol (2 mmol, 188,08 mg), kyselina 2-fenylmalonová (2,1 mmol, 378,084 mg) a chlorid zinečnatý (6 mmol, 803,22 mg) byly rozpuštěny v trichlorid fosforu (6 mmol, 0,561 ml) a pod argonem zahřívány na olejové lázni vytemperované na $70\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 8 hodin. Reakční roztok byl smíchán s vodou, zalkalizován 10% NaOH za vysrážení chloridu zinečnatého. Sraženina byla odfiltrována, filtrát přečištěn aktivním uhlím, zfiltrován a okyselen 10% HCl na pH 2. Organický podíl byl extrahován pomocí ethylacetátu, vysušen Na_2SO_4 a odpařen do sucha na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn ve směsi PE:EtOAc (5:1) a podroben přečištění na sloupcové chromatografii s mobilní fází PE:EtOAc (5:2) pro oddělení od vedlejších produktů. Oddělené frakce byly smíchány a odpařeny na RVO. Výťažek činil 6 %.

B

Kyselina 2-fenylmalonová (2,1 mmol, 378,08 mg) a trichlorid fosforu (1 ml) byly zahřívány na vytemperované olejové lázni na $80\text{ }^\circ\text{C}$ pod argonem po dobu 2 hodin. Po zchlazení byla směs nechána k míchání za laboratorní teploty do dalšího dne. Následující

den byl do směsi přidán fenol (2 mmol, 188,08 mg), chlorid zinečnatý (6 mmol, 817 mg) a POCl_3 (0,5 ml). Tato směs byla znovu zahřívána po dobu 5 hodin. Reakční směs byla zchlazena, vylita do kádinky s dest. vodou a ledovou tříští. Do kádinky byl přidán NaHCO_3 za vzniku sraženiny. Sraženina byla odfiltrována a promyta vodou. Filtrát byl okyselen pomocí HCl na pH 2 a organický podíl poté extrahován pomocí ethylacetátu, vysušen Na_2SO_4 a odpařen na RVO.

Výsledný produkt neodpovídá dle NMR spektra požadovanému 3-fenyl-4-hydroxykumarinu.

5.3.2 Použití SOCl_2 – nezdařený pokus

Fenol (2 mmol, 188,08 mg), kyselina 2-fenylmalonová (2,2 mmol, 396,088 mg) a chlorid zinečnatý (6 mmol, 803,22 mg) byly rozpuštěny v thionylchloridu (3 ml) a pod argonem zahřívány na olejové lázni vytemperované na $90\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 8,5 hodin. Reakční roztok byl v průběhu podrobován TLC analýze a ani po 8,5 hodinách se na vrstvě nezobrazil žádaný produkt.

5.4 Chlorace kyseliny 2-fenylmalonové

A

Kyselina 2-fenylmalonová (3 mmol, 540,12 mg) byla rozpuštěna v thionyl chloridu (67 mmol, 5 ml) v prostředí argonu. Směs byla zahřívána na vytemperované olejové lázni pod refluxem se sušicí trubicí CaCl_2 po dobu 5 hodin. Poté byla směs ketenu a dichloridu odpařena na RVO, zchlazena a uschována pod argonem.

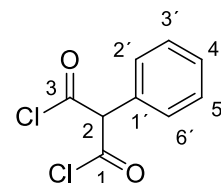
B

Kyselina 2-fenylmalonová byla za stejných podmínek rozpuštěna v thionylchloridu a směs byla zahřívána po dobu 1 hodiny. Po ohřevu byl produkt odpařen na RVO a uchován pod argonem.

Dichlorid 2-fenylmalonové kyseliny (55)

Kapalina jantarové barvy, výtěžek 98 %.

^1H NMR spektrum (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5,39 (s, 1H, H2);
7,38–7,48 (m, 6H) ppm.



5.5 Neúspěšná příprava 3-fenyl-4-hydroxykumarinu přes dichlorid 2-fenylmalonové kyseliny

5.5.1 Použití THF

i. One-pot syntéza

Směs dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny a (chlorkarbonyl)fenyl ketenu (1 mmol, 215,97 mg) byla smíchána s THF (5 ml), fenolem (0,9 mmol, 84,726 mg) a triethylaminem (0,3 ml) byla zahřívána pod argonem na vytemperované olejové lázni na 60 °C po dobu 2 hodin. Reakční roztok byl přefiltrován přes fritu a podroben analýze TLC, která neukázala posun k žádanému derivátu kumarinu.

ii. Postupná syntéza

Fenol (0,7 mmol, 65,898 mg) byl rozpuštěn ve 3 ml THF spolu s triethylaminem (1,57 mmol, 0,22 ml) a půl hodiny ponechán k záhřevu na vytemperované olejové lázni na 70 °C. Po půl hodině byla přidána směs dichloridu a ketenu (0,79 mmol, 170,626 mg) rozpuštěná v 3 ml THF a ponecháno k záhřevu další 3 hodiny. Produkt byl přefiltrován přes fritu a odpařen na RVO dosucha. TLC vrstva obsahovala výchozí látky a vedlejší produkty. Nikoliv kumarin.

5.5.2 Použití DMF

Fenol (0,56 mmol, 52,66 mg) byl rozpuštěn ve 3 ml DMF spolu s uhličitanem draselným (1,25 mmol 172,76 mg) a půl hodiny ponechán k záhřevu na vytemperované olejové lázni na 70 °C. Po půl hodině byla přidána směs dichloridu a ketenu (0,63 mmol, 136,1 mg) rozpuštěná v 3 ml DMF a ponecháno k záhřevu na 150 °C další 3 hodiny. Produkt byl přefiltrován přes fritu a odpařen ve směsi s toluenem na RVO. TLC surového produktu obsahovala pouze výchozí látky a vedlejší produkty.

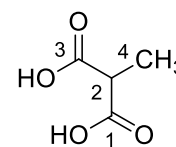
5.6 Příprava 2-methylmalonové kyseliny

Směs vodného roztoku NaOH (125 mmol, 5,0333 g, 15 ml dest. vody, cca 30 %) a diethyl-methylmalonátu (25 mmol, 99 %, 4,355 g) byla zahřívána na vytemperované olejové lázni na 90 °C po dobu jedné hodiny. Směs byla po záhřevu okyselená na hodnotu pH 2 pomocí HCl. Bylo nutné oddělit organický podíl pomocí ethylacetátu a chloroformu. Tyto podíly byly vysušeny síranem sodným, přefiltrovány a odpařeny na RVO. Podíl z ethylacetátu byl podroben samovolné krystalizaci pomocí směsi hexanu za vzniku malých bílých krystalů. Krystaly byly zfiltrány na fritě a promyty vychlazeným cyklohexanem.

2-methylmalonová kyselina (57)

Bílé krystaly, $t_f = 127-133$ °C (EtOAc), výtěžek 17 %.

IČ spektrum (tableta KBr): 3429, 3055, 2956, 2925, 2854, 1673, 1620, 1566, 1495, 1455, 1424, 1314, 1258, 1228, 1191, 1163, 1128, 1101, 1031, 991, 896, 853, 756, 700, 555, 506, 463



^1H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz): δ 1,22 (d, 3H, H-4 $J = 7,2$ Hz); 3,3 (q, 1H, H-2 $J = 7,2$ Hz), 12,57 (s, 2H, -OH) ppm.

^{13}C NMR spektrum (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ 13,63 (C4); 45,68 (C2); 171,59 (C1 a C3) ppm.

ESI-MS (neg.) m/z (%): 116,8 $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ (100).

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo pokusit se o přípravy fenylového a methylového derivátu 4-hydroxykumarinu. Ve vědecké skupině doc. Kafky a prof. Kláska jsou zkoumány strukturně podobné chinolin-2-ony a byl tedy předpoklad stejného chování a reaktivity i kumarinů.

Příprava 3-fenyl-4-hydroxykumarinu z diethyl-fenylmalonátu probíhala dle literatury. Jediným rozdílem byl výtěžek kumarinu, kdy v literatuře popisují výtěžek 80 %, zatímco námi připravený kumarin dosahoval výtěžku 41 %. Příprava tohoto derivátu z 2-fenylmalonové kyseliny byl úspěšný, byť s malým výtěžkem, který je motivací pro optimalizaci této metody a nalezení podmínek pro lepší výtěžek derivátu kumarinu.

Dosažení fenylového derivátu 4-hydroxykumarinu z dichloridu kyseliny 2-fenylmalonové nebylo úspěšné. Důvod není objasněn, neboť se předpokládala výborná reaktivita mezi dichloridem a fenolem, ke které taktéž dochází *in-situ* během dříve úspěšné reakce 2-fenylmalonové kyseliny a fenolu.

3-Methyl-4-hydroxykumarin se prozatím ve výzkumné skupině nezdařilo syntetizovat. Pokud by se výše zmíněné syntézy povedlo optimalizovat, byla myšlenka provést syntézu methylového derivátu z 2-methylmalonové kyseliny, případně z jejího dichloridu pro využití větší reaktivity chloridu kyselin.

Časový limit v odevzdání této práce omezil dále i možnost použití tzv. „magic malonátů“, pro syntézu obou zamýšlených derivátů, fenylového i methylového. „Magic malonáty“ by díky snadnějšímu odstoupení esterové skupiny v podobě trichlorfenolu mohly reagovat lépe, než ethylová skupina použitých malonátů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 A. Stefanachi, F. Leonetti, L. Pisani, M. Catto, A. Carotti. *Molecules* **2018**, 23(2), 250.
- 2 Szwaczko, K. Coumarins Synthesis and Transformation via C–H Bond Activation—A Review. *Inorganics* **2022**, 10(2), 23.
- 3 F. Borges, et al. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 887-916.
- 4 M. J. Matos, et al. Coumarins – An Important Class of Phytochemicals. *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health* **2015**. ISBN 978-953-51-2170-1.
- 5 M. A. Musa, et al. *Curr Med Chem.* **2008**, 15(26): 2664-2679.
- 6 K. A. Kumar, et al. *Journal of Chemical and Pharmaceutical research* **2015**, 7(9), 67-81. ISSN: 0975-7384.
- 7 S. M. Sethna, N, M. Shah. *Chem. Rev.* **1945**, 36(1), 1-62.
- 8 N. H. Jadhav, et al. *ACS Omega* **2019**, 4(5), 8522-8527.
- 9 L. Majumder a S. Majumder. *ETSOC* **2007**, 11, 1-30.
- 10 M. Crawford and J. A. M. Shaw, *J. Chem. Soc.* **1953**, 3435-3438.
- 11 Y. F. Mustafa, M. K. Bashir, M. K. Oglah. *Sys. Rev. Pharm.* **2020**, 11(6), 598-612.
- 12 S. Tyndall, et al. *J. Org. Chem.* **2015**, 80(18), 8951-8953
- 13 S. M. EL-Dafrawy, et al. *Journal of Material Reasearch and Technology* **2020**, 9(1), 13-21.
- 14 B. Tyagi, et al. *J. Mol. Catal. A. Chem.* **2007**, 276 (1–2) 47-56.
- 15 V. Calvino-Casilda, et al. *E. Catal. Today* **2010**, 155 (3–4) 279-281.
- 16 M. Molnar, M. Lončarić, M. Kovač. *Current Organic Chemistry*, **2020**, 24, 4-43.
- 17 A. Shaabani, et al. *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, 6(4), 710-714.
- 18 L. N. Dutta, M. Bhattacharyya, A. K. Sarkar. *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 1556-1562.
- 19 J.C. Jung, O.S. Park. *Molecules* **2009**, 14, 4790-4803.
- 20 Y. K. Al-Majedy, et al. *Molecules* **2014**, 19, 11791-11799.

- 21 J. Malý, M. Matýšková, M. Penka. Antikoagulační léčba: doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře: 2005. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP **2005**. ISBN 80-903573-6-9.
- 22 K. Lefflerová. *Interv Akut Kardiol* **2008**, 7(6), 220-224.
- 23 M. Matýšková. *Med. Praxi* **2011**, 8(4), 194-197.
- 24 J. Yoda, et al. *World Journal of Organic Chemistry* **2019**, 7(1), 19-30.
- 25 Y. Lin, X. Shen, Q. Yuan, Y. Yan. *Nature Communications*, **2013**, 4 (2603).
- 26 A. Pereira, et al. Coumarins as Fluorescent Labels of Biomolecules. *Phytochemicals in Human Health* **2019**. ISBN 978-1-78985-588-3.
- 27 H. Zhao, et al. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 242-249.
- 28 A. Carneiro, et al. *Molecules* **2021**, 26, 501
- 29 G. M. Ziarani, et al. *Molecular Diversity* **2019**, 23, 1029–1064.
- 30 M. M. Abdou, et al. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, 12(1), 88-121.
- 31 J. Jung, Y. Jung, Q. Park. *Synthetic Communications* **2001**, 31(8) 1195-1200.
- 32 S. Naveen, et al. *Analytical Sciences X-ray Structure Analysis Online* **2006**, 22 (4), 103-104.
- 33 W. Gao, W. Hou, M. Zheng, L. Tang. *An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **2010**, 40(5), 732-738.
- 34 E. Ziegler und H. Junek, *Mh. Chem.* **1956**, 87, 214.
- 35 C. Mentzer und P. Vercier, *Mh. Chem.* **1957**, 88, 264
- 36 Q. Zhu, et al. *Org. Lett.* **2002**, 4(19), 3333–3336.
- 37 Q. Ji et. Al. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 108, 166-176.
- 38 Mentzer et al. *Bulletin de la Societe Chimique de France* **1949**, 749–753.
- 39 Justin Finnerty et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(8), 1701–1704.
- 40 V. Konečná, Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2021, 38–39.

1 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DME	dimethylether
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Et	ethyl
Ac	acetyl
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
Hex	hexan
IČ	infračervená
Me	methyl
NMR	Nukleární magnetická rezonance
kat.	katalyzátor
kol.	kolektiv
PE	petrolether
Ph	fenyl
PPA	kyselina polyfosforečná
R_f	retenční faktorrozp. rozpouštědlo
RVO	rotační vakuová odparka
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
t_R	retenční čas
t_t	teplota tání
UV	ultrafialové

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Struktura kumarinu 1	11
Obrázek 2. Příklady kumarinových sloučenin obsažených v přírodních zdrojích.	12
Obrázek 3. Chemická struktura 4-hydroxykumarinu 34	19
Obrázek 4. Kumarinové antikoagulanty.	20
Obrázek 5. Mechanismus účinku warfarinu.	20
Obrázek 6. Základní kumarinový derivát inhibující integrázu 39	22
Obrázek 7. Struktura 3,3'-(2-naftalenomethylen)bis[4,7-dihydroxykumarin] 40	22
Obrázek 8. Reaktivita atomů uhlíku v různých polohách heterocyklu.	23
Obrázek 9. Tautomerní formy 4-hydroxykumarinu.	23
Obrázek 10. Struktura 4-hydroxykumarinů 48 a 4-hydroxychinolin-2(1 <i>H</i>)-onů 51	29
Obrázek 11. Výřez z ¹ H spektra 3-fenyl-4-hydroxykumarinu 50	30
Obrázek 12. Výřez z ¹ H spektra 2-fenylmalonové kyseliny 53	32
Obrázek 13. Výřez z ¹ H spektra dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny 55	34
Obrázek 14. Struktura 3-methyl-4-hydroxykumarinu 59	36

SEZNAM SCHÉMÁT

Schéma 1. Perkinova syntéza kumarinu.....	13
Schéma 2. Mechanismus syntézy dle Majumderů.....	14
Schéma 3. Obecná Pechmannova reakce.....	14
Schéma 4. Návrh mechanismu Pechmannovy reakce dle Tyndalla.....	15
Schéma 5. Obecná Knoevenangelova reakce.....	16
Schéma 6. Obecné schéma Wittigovy reakce.....	16
Schéma 7. Syntéza methylového derivátu kumarinu vycházející z Wittigovy reakce.....	16
Schéma 8. Kostaneckiova-Robinsonova reakce.....	17
Schéma 9. Obecné schéma Reformatskyho reakce.....	17
Schéma 10. Syntéza kumarinu z 2-hydroxyacetofenonu.....	24
Schéma 11. Syntéza kumarinu z 2-hydroxyacetofenonu s trichloridacetonitrilem.....	24
Schéma 12. Syntéza 4-hydroxykumarinu z fenolu.....	25
Schéma 13. Příprava 4-hydroxykumarinu z fenolu 12 a Meldrumovy kyseliny 46	25
Schéma 14. Syntéza derivátů 4-hydroxykumarinu dle Zieglera a Junka.....	26
Schéma 15. Reakce Mentzera a Verciera pro syntézu 3-fenyl-4-hydroxykumarinu.....	26
Schéma 16. Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu 50 dvoukrokovou Suzukiho reakcí.....	27
Schéma 17. Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu.....	30
Schéma 18. Syntéza 2-fenylmalonové kyseliny.....	31
Schéma 19. Syntéza 3-fenyl-4-hydroxykumarinu z 2-fenylmalonové kyseliny.....	32
Schéma 20. Syntéza dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny.....	33
Schéma 21. Neúspěšná one-pot syntéza kumarinu z dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny.....	35
Schéma 22. Neúspěšná syntéza kumarinu z dichloridu 2-fenylmalonové kyseliny.....	35
Schéma 23. Syntéza 2-methylmalonové kyseliny.....	36

