



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ЈЕЛЕНА ТОШОВИЋ

**СТРУКТУРНЕ И АНТИОКСИДАТИВНЕ ОСОБИНЕ
ХЛОРОГЕНСКЕ КИСЕЛИНЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Професор др Светлана Марковић

Крагујевац, 2019.

I Аутор

Име и презиме: **Јелена Тошовић**

Датум и место рођења: **27.3.1990.** године, Крагујевац, Србија

Садашње запослење: **асистент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

II Докторска дисертација

Наслов: **Структурне и антиоксидативне особине хлорогенске киселине**

Број страница: 153, Број слика: 56, Број табела: 27, Број схема: 4

Број библиографских података: 142

Установа и место где је рад израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област (УКД): **Хемија – Физичка хемија и Органска хемија**

Ментор: **др Светлана Марковић**, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 24.8.2017. године

Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: 870/XI-1 од 22.11.2017. године; IV-01-1124/7 од 13.12.2017. године

Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 630/XIX-2 од 30.08.2017. године; IV-01-827/12 од 13.09.2017. године

1. **др Драган Амић**, редовни професор у пензији, Пољопривредни факултет, Свеучилиште Josipa Jurja Strossmayera у Осигеку, ужа научна област: органска хемија
2. **др Светлана Марковић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: физичка хемија
3. **др Зорица Петровић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: органска хемија
4. **др Јасмина Димитрић Марковић**, редовни професор, Факултет за Физичку хемију у Београду, ужа научна област: физичка хемија – спектрохемија
5. **др Дејан Миленковић**, научни сарадник, Истраживачко развојни центар за биоинжењеринг, БиоИРЦ доо, научна област: хемија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 750/XVI-1 од 24.10.2018. године; IV-01-895/7 од 14.11.2018. године

1. **др Драган Амић**, редовни професор у пензији, Пољопривредни факултет, Свеучилиште Josipa Jurja Strossmayera у Осигеку, ужа научна област: органска хемија
3. **др Зорица Петровић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: органска хемија
4. **др Јасмина Димитрић Марковић**, редовни професор, Факултет за Физичку хемију у Београду, ужа научна област: физичка хемија – спектрохемија

Датум одбране дисертације:

МЕНТОР

др Светлана Марковић, редовни професор
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Ужа научна област: Физичка хемија

КОМИСИЈА

др Драган Амић, редовни професор у пензији
Пољопривредни факултет, Свеучилиште Josipa Jurja Strossmayera у Осигеку
Ужа научна област: Органска хемија

др Зорица Петровић, председник Комисије
редовни професор
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Ужа научна област: Органска хемија

др Јасмина Димитрић Марковић, редовни професор
Факултет за Физичку хемију, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Физичка хемија – спектрохемија

ЗАХВАЛНИЦА

Приложена докторска дисертација је урађена на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Посебну захвалност дугујем ментору проф. др Светлани Марковић која је предложила тему и руководила израдом ове докторске дисертације. Такође, захваљујем на свим саветима, подрици, великом стрпљењу и разумевању, као и на свом знању које ми је пренела током докторских студија.

Захваљујем се члановима Комисија проф. др Драгану Амићу, проф. др Зорици Петровић, проф. др Јасмини Димитрић Марковић и др Дејану Миленковићу за помоћ при изради докторске дисертације, као и на корисним примедбама и сугестијама које су допринеле квалитету дисертације.

На крају желим да се захвалим својој породици на подрици.

Резиме	I
Summary	IV
Листа слика.....	VII
Листа табела.....	XI
Листа схема.....	XIII
ОПШТИ ДЕО	1
Слободни радикали.....	2
Штетни ефекти реактивних кисеоничних врста.....	5
Антиоксиданти.....	6
Улога антиоксиданата у организму.....	7
Улога антиоксиданата у храни.....	7
Фенолни и полифенолни антиоксиданти.....	8
Биодоступност и биоактивност фенола у људском организму.....	9
Веза између структуре фенола и антиоксидативне активности.....	10
Фенолне киселине као антиоксиданти.....	10
Биосинтеза фенолних киселина.....	11
Хлорогенска киселина као природни антиоксидант.....	13
Биолошка активност хлорогенске киселине.....	15
Метаболизам хлорогенске киселине.....	16
Механизми антиоксидативног дејства.....	21
Протокол за рачунање релативне антиоксидативне активности.....	23
Општи принципи.....	25
Термодинамичка испитивања.....	26
Кинетичка испитивања.....	27
Процена релативне антиоксидативне активности.....	33
НАШИ РАДОВИ	35
Циљеви дисертације.....	36
Структурне особине хлорогенске киселине.....	37
Конформациона анализа.....	37
Вибрациони спектри хлорогенске киселине.....	43
NMR спектри хлорогенске киселине.....	50
UV спектар хлорогенске киселине.....	55
Антиоксидативне особине хлорогенске киселине.....	60
Приступ заснован на израчунавању термодинамичких параметара.....	60
Одређивање енталпије солватисаног протона и електрона.....	62
Конформациона анализа неохлаорогенске и криптохлаорогенске киселине.....	68
Радикали, анјони и радикал катјони кафеинске и кафеоилхинских киселина.....	72
Антиоксидативни механизми кафеинске и кафеоилхинских киселина.....	84

САДРЖАЈ

Утицај слободних радикала на антиоксидативну активност хлорогенске киселине.....	87
Пристап заснован на израчунавању константи брзина.....	97
Одређивање релативне антиоксидативне активности хлорогенске киселине у неполарним растварачима.....	97
Одређивање релативне антиоксидативне активности хлорогенске киселине при физиолошким условима	110
<i>Испитивање моноанјона и дианјона хлорогенске киселине</i>	<i>111</i>
Термодинамичка испитивања.....	113
Кинетичка испитивања.....	115
<i>Испитивање моноанјона тролокса.....</i>	<i>125</i>
Термодинамичка испитивања.....	125
Кинетичка испитивања.....	126
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	129
Хемикалије.....	130
Снимање спектара.....	130
ESR мерења.....	131
Теоријске методе.....	132
Временски зависна теорија функционала густине	134
Коришћени програми	135
ЗАКЉУЧАК.....	136
ЛИТЕРАТУРА.....	140
БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ.....	148

Резиме

Приложен рукопис једним делом обухвата испитивање структурних особина, а другим делом испитивање антиоксидативног потенцијала хлорогенске киселине. Посебна пажња је усмерена ка термодинамичком и кинетичком испитивању механизма антиоксидативног деловања овог једињења.

Први део истраживања се односи на утврђивање најстабилније конформације хлорогенске киселине у гасовитој фази и у раствору упоређивањем експерименталних IR, Raman, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ и UV спектра са спектрима симулираним помоћу теорије функционала густине. Детаљном конформационом анализом је установљено да хлорогенска киселина постоји у облику смеше различитих конформера. Заједничка особина свих ових конформера је да се на хинском делу молекула налазе усмерене водоничне везе, при чему је карбоксилни кисеоник усмерен ка водонику из суседне хидроксилне групе, а не ка карбоксилном кисеонику. Најстабилнија конформација у гасовитој фази поседује $\text{O4-H4}\cdots\text{O9}'$ водоничну везу, док најстабилнији конформер у раствору поседује $\text{O4-H4}\cdots\text{O10}'$ водоничну везу. У оквиру ове докторске дисертације по први пут су испитани сви вибрациони облици у IR спектру хлорогенске киселине. Експериментално добијени Raman-ски и NMR спектри хлорогенске киселине су у сагласности са постојећим резултатима из литературе. Веома добро слагање између симулираних и експерименталних спектра указује на то да су атоми у хлорогенској киселини правилно распоређени.

Следећи корак се односио на упоређивање антиоксидативне активности хлорогенске киселине са антиоксидативном активношћу њена два структурна изомера (неохлорогенска и криптохлорогенска киселина) и кафеинском киселином. Из тог разлога су испитивани термодинамички параметари: енталпија дисоцијације везе (*Bond Dissociation Enthalpy*, BDE), афинитет према протону (*Proton Affinity*, PA), енталпија преноса електрона (*Electron Transfer Enthalpy*, ETE), јонизациони потенцијал (*Ionisation Potential*, IP) и енталпија дисоцијације протона (*Proton Dissociation Enthalpy*, PDE), у растварачима различите поларности. За потребе израчунавања термодинамичких параметара одређене су енталпије солватисаног протона и електрона у различитим растварачима помоћу различитих теоријских метода. Детаљно су испитани и радикали, анјони и радикал катјони који настају из кафеинске и кафеоилхинских киселина. Особине хидроксициметног дела у одговарајућим

радикалима, анјонима и радикал катјонима су веома сличне и практично не зависе од положаја естерификације. Хински део остаје непромењен у свим новонасталим реактивним врстама. Последица тога је да све четири фенолне киселине имају сличне вредности термодинамичких параметара: BDE, PA, ETE, IP и PDE. Из свега наведеног је закључено да кафеинска и кафеоилхинске киселине испољавају веома сличну антиоксидативну активност. Исти ови закључци изведени су и из експеримената, али до сада нису имали упориште у хемијској теорији.

Затим је уследило испитивање понашања хлорогенске киселине у реакцији са слободно радикалским врстама (DPPH^\bullet , HO^\bullet и $\text{O}_2^{\bullet-}$) помоћу ESR спектроскопије. Изведени експерименти су показали да је хлорогенска киселина селективна према DPPH^\bullet , HO^\bullet и $\text{HOO}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ радикалима.

Уследило је и термодинамичко испитивање могућих антиоксидативних механизма (пренос водониковог атома (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT), образовање радикалског адукта (*Radical Adduct Formation*, RAF), губитак протона праћен преносом електрона (*Sequential Proton Loss Electron Transfer*, SPLET) и пренос електрона праћен преносом протона (*Single Electron Transfer – Proton Transfer*, SET-PT)) ове киселине у присуству испитиваних радикала. Откривено је да у воденом раствору ни један механизам није погодан за реакцију између хлорогенске киселине и $\text{O}_2^{\bullet-}$ што води ка закључку да је у киселој средини HOO^\bullet одговоран за понашање $\text{HOO}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ смеше. HAT и RAF су повољни антиоксидативни механизми у случају реакција хлорогенске киселине са HOO^\bullet и HO^\bullet , док је у случају DPPH^\bullet радикала једини очекивани механизам HAT.

У наредном кораку је помоћу рачунарске методологије која је позната под називом: тест за процењивање укупне антиоксидативне активности заснован на квантно механичким прорачунима (*Quantum Mechanics-based test for Overall free Radical Scavenging Activity* (QM-ORSA)) испитивана антиоксидативна активност хлорогенске киселине у односу на тролокс који је представљао референтни систем. Примењена методологија подразумева термодинамичко и кинетичко испитивање свих могућих механизма и укључује различите аспекте који могу да утичу на антиоксидативни капацитет једињења.

Најпре је вршено испитивање у неполарним растварачима. Добијено је да хлорогенска киселина и тролокс са HO^\bullet радикалом реагују преко HAT и RAF механизма, док је у случају $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикала HAT једини могући реакциони пут.

Хлорогенска киселина је реактивнија према HO^\bullet , док је према $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ мање реактивна од тролокса.

Затим је вршено истраживање антиоксидативне активности хлорогенске киселине у односу на тролокс у воденом раствору при физиолошким условима. На $\text{pH} = 7.4$ хлорогенска киселина постоји у облику моноанјона (87 %) и дианјона (13 %), док се тролокс доминантно налази у облику моноанјона (> 99 %). Испитиване су реакције моноанјона и дианјона хлорогенске киселине и моноанјона тролокса са HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикалима. Оба анјонска облика хлорогенске киселине у присуству $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ подлежу искључиво НАТ механизму. У присуству HO^\bullet оперативни су НАТ, RAF, SPLET и SET-PT механизми. Како су све антиоксидативне реакције дианјона контролисане дифузијом, његов допринос у „хватању“ HO^\bullet је готово исти као и допринос моноанјонског облика који се при датим условима налази у много већој концентрацији. Израчуната вредност константе брзине за реакцију између хлорогенске киселине и HO^\bullet радикала је у савршеној сагласности са одговарајућом експерименталном вредношћу. Редослед реактивности хлорогенске киселине према изабраним радикалима је исти у поларној и неполарној средини.

Summary

One part of the enclosed manuscript is devoted to investigation of structural features of chlorogenic acid, whereas the other is associated with examination of the antioxidative potential of chlorogenic acid. Particular attention is dedicated to thermodynamic and kinetic investigation of antioxidative mechanisms of chlorogenic acid.

The first part of the investigation was devoted to determination of the most stable conformation of chlorogenic acid in gaseous phase and in solution by comparison of experimental IR, Raman, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and UV spectra with the spectra simulated using density functional theory methods.

Detailed conformational analysis has established that chlorogenic acid exists as a mixture of several conformations. A common feature of all conformations is that quinic moiety is characterized with directed hydrogen bonds, with carboxyl hydrogen oriented toward approximate hydroxyl group, but not toward carboxyl oxygen. The most stable structure in gaseous phase is characterized with $\text{O4-H4}\cdots\text{O9}'$, whereas the most stable conformation in solution is characterized with $\text{O4-H4}\cdots\text{O10}'$. Within this dissertation, all vibrational modes of the IR spectrum of chlorogenic acid were examined for the first time. Experimentally obtained Raman and NMR spectra of chlorogenic acid are in perfect accord with the literature results. Very good agreement between simulated and experimental spectra indicate correct arrangement of atoms in this compound.

The next step was related to the comparison of the antioxidative activity of chlorogenic acid with the antioxidative potentials of its two structural isomers (neochlorogenic and cryptochlorogenic acids) and caffeic acid. For this reason, thermodynamic parameters: Bond Dissociation Enthalpy (BDE), Proton Affinity (PA), Electron Transfer Enthalpy (ETE), Ionisation Potential (IP), and Proton Dissociation Enthalpy (PDE) in solutions of different polarity were examined. To obtain thermodynamic parameters, the enthalpies of the solvated proton and electron in various solutions with different theoretical methods were determined. Detailed examination of radicals, anions, and radical cations derived from caffeic and caffeoylquinic acids was conducted. The properties of the hydroxycinnamic moiety in the corresponding radicals, anions and radical cations are very similar and practically do not depend on the esterification position. Quinic moiety remains the same in the derived reactive species. As a result, all four phenolic acids have similar values of thermodynamic parameters BDE, PA, ETE, IP, and PDE. Taking all these facts into account, it was concluded that caffeic and caffeoylquinic acids exhibit very similar

antioxidant activity. The same results have been derived from experiments, however, they have not been supported by chemical theory so far.

Subsequently, the behavior of chlorogenic acid in the reactions with free radicals (DPPH[•], HO[•], and O₂^{-•}) was investigated using ESR spectroscopy. The obtained results showed that chlorogenic acid is selective toward DPPH[•], HO[•], and HOO[•]/O₂^{-•} radicals.

Thermodynamic investigation of all possible antioxidative mechanisms (Hydrogen Atom Transfer (HAT), Radical Adduct Formation (RAF), Sequential Proton Loss Electron Transfer (SPLET), and Single Electron Transfer – Proton Transfer (SET-PT)) of chlorogenic acid in the presence of investigated free radicals was also conducted. The results revealed that no mechanism is suitable for scavenging O₂^{-•}, which leads to conclusion that HOO[•] is responsible for the behavior of HOO[•]/O₂^{-•} mixture. HAT and RAF are plausible antioxidative mechanisms in the case of the reaction of chlorogenic acid with HOO[•] and HO[•], whereas the only possible mechanism in the case of DPPH[•] radical is HAT.

Following the computational methodology, also known as Quantum Mechanics-based test for Overall free Radical Scavenging Activity (QM-ORSA), the antioxidative activity of chlorogenic acid relative to trolox as reference compound was examined. The applied methodology implies thermodynamic and kinetic investigation of all possible mechanisms. This approach also considers various effects that can influence antioxidative activity of a compound.

Firstly, investigation in nonpolar solvents was performed. The results showed that both chlorogenic acid and trolox react with HO[•] via HAT and RAF mechanisms, whereas in the case of CH₃OO[•] HAT is the only favourable reaction pathway. Chlorogenic acid is more reactive toward HO[•], but less reactive toward CH₃OO[•] than trolox.

The following step was investigation of antioxidative activity of chlorogenic acid relative to trolox in aqueous solution at physiological conditions. At pH = 7.4 chlorogenic acid exists in monoanionic (87 %) and dianionic (13 %) forms, whereas dominant form of trolox is monoanionic (> 99 %). The reactions of chlorogenic acid monoanion and dianion, as well as of trolox monoanion, with HO[•] and CH₃OO[•] were examined. Both anionic forms of chlorogenic acid undergo only HAT reaction with CH₃OO[•] radical. Operative mechanistic pathways in the case of HO[•] are HAT, RAF, SPLET, and SET-PT. Considering that all the reactions with dianion are diffusion-controlled, its contribution to scavenging HO[•] is almost equivalent to that of more abundant monoanion. The calculated rate constant value for the reaction of chlorogenic acid with HO[•] is in perfect agreement with corresponding

experimentally obtained value. The order of reactivity toward selected free radicals is the same in polar and nonpolar solution.

Листа слика

- Слика 1.** Реакције у којима у организму настају реактивне врсте кисеоника и азота.
- Слика 2.** Класификација фенола заступљених у храни.
- Слика 3.** Делокализација неспареног електрона у феноксил радикалу.
- Слика 4.** Биосинтеза фенолних киселина у биљкама.
- Слика 5.** Структуре три изомерне кафеоилхинске киселине и кафеинске киселине.
- Слика 6.** Предложени метаболизам разлагања хлорогенске киселине од стране Олтхофове и њених сарадника.
- Слика 7.** Предложени метаболизам разлагања хлорогенске киселине од стране Рехнера и његових сарадника.
- Слика 8.** Предложени метаболизам разлагања хлорогенске киселине од стране Лудвига и његових сарадника. Подебљане стрелице означавају главне путеве деградације. EST - естераза; RA - редуктаза; DH - дехидрогеназа; DC (CoA) – декарбоксилација у присуству коензима А.
- Слика 9.** Промене Гибсове енергије у реакцијама 15 (а) и 16 (б). λ , ΔG_a^\ddagger и $\Delta_r G$ се односе на енергију реорганизације, енергију активације и ослобођену енергију.
- Слика 10.** Енергетске промене у обрнутој области ($-\Delta_r G > \lambda$).
- Слика 11.** Енергетско поређење вертикалног и адијабатског производа.
- Слика 12.** Двадесет најстабилнијих конформера хлорогенске киселине са назначеним вредностима за релативне слободне енергије (kJ mol^{-1}). Резултати су добијени на B3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоу теорије за гасовиту фазу (црна), DMSO (црвена) и метанол (зелена).
- Слика 13.** Оптимизоване геометрије најстабилнијих конформера хлорогенске киселине у гасовитој фази (**1**) и у DMSO растварачу (**8**) израчунате на B3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоу теорије. Дужине водоничних веза дате су у Å.
- Слика 14.** Корелација између експерименталних и израчунатих вредности таласних бројева (cm^{-1}) у IR (а) и Raman-ском (б) спектру добијених помоћу B3LYP-D3/6-311+G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311+G(d,p) и MN12-SX/6-311+G(d,p) теоријских модела су веома слични.
- Слика 15.** IR спектар хлорогенске киселине: експериментални (плава линија) и симулирани помоћу B3LYP-D3, M06-2X и MN12-SX метода (црвена, зелена и љубичаста).
- Слика 16.** Raman-ски спектар хлорогенске киселине: експериментални (плава линија) и симулирани помоћу B3LYP-D3, M06-2X и MN12-SX метода (црвена, зелена и љубичаста).
- Слика 17.** ^{13}C -NMR спектар хлорогенске киселине у DMSO растварачу.
- Слика 18.** ^1H -NMR спектар хлорогенске киселине у DMSO растварачу.
- Слика 19.** Експериментални (плава линија) и симулирани (црвена линија) UV спектар хлорогенске киселине у метанолу. Спектар је израчунат помоћу B3LYP-D3/6-311+G(d,p) теоријског модела у комбинацији са CPCM солватационим моделом.
- Слика 20.** NLMO орбитале које учествују у грађењу LUMO+1 кластера хлорогенске киселине.

- Слика 21.** NLMO кластери хлорогенске киселине. Стрелице указују на кластере који су укључени у одређени електронски прелаз.
- Слика 22.** Двадесет најстабилнијих конформера неохлорогенске киселине са назначеним вредностима за релативне слободне енергије (kJ mol^{-1}). Резултати су добијени на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије у метанолу.
- Слика 23.** Двадесет најстабилнијих конформера криптохлорогенске киселине са назначеним вредностима за релативне слободне енергије (kJ mol^{-1}). Резултати су добијени на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије у метанолу.
- Слика 24.** Ротамери радикала изведених из кафеоилхинских киселина у метанолу. За сваки пар конформера су представљене разлике у слободним енергијама (kJ mol^{-1}) израчунате помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела су представљени фонтом *Italic*.
- Слика 25.** Ротамери анјона изведених из кафеоилхинских киселина у метанолу. За сваки пар конформера су представљене разлике у слободним енергијама (kJ mol^{-1}) израчунате помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела су представљени фонтом *Italic*.
- Слика 26.** Расподела спинске густине у радикалима изведеним из кафеинске, неохлорогенске, криптохлорогенске и хлорогенске киселине у метанолу израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.
- Слика 27.** Расподела NBO наелектрисања у кафеинској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.
- Слика 28.** Расподела NBO наелектрисања у неохлорогенској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.
- Слика 29.** Расподела NBO наелектрисања у криптохлорогенској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.
- Слика 30.** Расподела NBO наелектрисања у хлорогенској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.
- Слика 31.** Оптимизоване структуре радикал катјона кафеинске и кафеоилхинских киселина у метанолу. Вредности спинске густине као и карактеристична NBO наелектрисања су израчуната помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела.
- Слика 32.** ESR спектар контролих узорака (горе) и узорака у којима је присутна 1 mM хлорогенска киселина (доле): (A) DPPH•, (B) DEPMPO/HO• производ, (B) DEPMPO/HOO• производ.
- Слика 33.** Оптимизоване структуре (5CQA-O₂)^{-•} радикалских адуката у води. Структуре 2 и 3 нису адукти адиције O₂^{-•} на 5CQA.
- Слика 34.** Оптимизоване структуре (5CQA-HOO)[•] радикалских адуката у води.
- Слика 35.** Оптимизоване структуре (5CQA-HO)[•] радикалских адуката у води.
- Слика 36.** Оптимизоване геометрије прелазних стања која се јављају у реакцијама хлорогенске киселине са HO• и CH₃OO• радикалима у бензену. Назначене су кључне дужине веза у Å. Прорачуни су извршени на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом.

- Слика 37.** Оптимизоване геометрије прелазних стања која се јављају у реакцијама тролокса са HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикалима у бензену. Назначене су кључне дужине веза у Å . Прорачуни су извршени на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом.
- Слика 38.** Резултати IRC рачуна за реакцију хлорогенске киселине са HO^\bullet преко НАТ механизма у положају 3' у бензену (лево); Резултати IRC рачуна за реакцију хлорогенске киселине са HO^\bullet преко RAF механизма у положају 8' у бензену (десно).
- Слика 39.** Зависност $\ln k_{\text{TST}}$ и $\ln k_{\text{ZCT-0}}$ од реципрочне температуре за реакције хлорогенске киселине са HO^\bullet преко НАТ и RAF механизма.
- Слика 40.** Зависност $\ln k_{\text{TST}}$ и $\ln k_{\text{ZCT-0}}$ од реципрочне температуре за реакције тролокса са HO^\bullet преко НАТ и RAF механизма.
- Слика 41.** Структуре карбоксилатног анјона (5CQA^-) и дианјона (5CQA^{2-}) хлорогенске киселине и карбоксилатног анјона (Tx^-) тролокса.
- Слика 42.** Три најстабилнија конформера моноанјона хлорогенске киселине. Приказане релативне енергије су у kJ mol^{-1} .
- Слика 43.** Расподела NBO наелектрисања у моноанјону и дианјонима хлорогенске киселине.
- Слика 44.** Површина спинске густине у радикал анјону хлорогенске киселине.
- Слика 45.** Зависност $\ln k_{\text{ZCT-0}}$ (црвена) и $\ln k_{\text{TST}}$ (плава) од реципрочне температуре за реакције моноанјона хлорогенске киселине са: а) $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ у положају 4' (НАТ), б) HO^\bullet у положају 3' (НАТ), в) HO^\bullet у положају 1' (RAF) и г) HO^\bullet у положају 8' (RAF).
- Слика 46.** Оптимизоване геометрије прелазних стања за НАТ и RAF реакције моноанјона хлорогенске киселине са HO^\bullet .
- Слика 47.** Зависност укупне енергије од $\text{HO}-\text{H4}'$ растојања у реакцији прелаза протона са моноанјона хлорогенске киселине на HO^- .
- Слика 48.** Зависност укупне енергије од $\text{HO}-\text{H3}'$ растојања у реакцији преноса протона са радикал анјона хлорогенске киселине на HO^- .
- Слика 49.** Енергетски дијаграм за НАТ реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^\bullet у синглетном (плава линија) и триплетном (црвена линија) стању. Црна линија означава претпостављени реакциони ток. Тачка у којој долази до инверзије спина (SCP) се налази на $\text{HO}-\text{H3}'$ растојању од 1.636 Å .
- Слика 50.** Енергетски дијаграм за RAF реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^\bullet у синглетном (плава линија) и триплетном (црвена линија) стању. Црна линија означава претпостављени реакциони ток. Тачка у којој долази до инверзије спина (SCP) се налази на $\text{HO}-\text{C8}'$ растојању од 2.334 Å .
- Слика 51.** Структура тачке у којој долази до инверзије спина за НАТ реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^\bullet у синглетном (горе лево) и триплетном (горе десно) стању. Назначене су укупне енергије структура. Резултат IRC рачуна за триплетно стање (доле).
- Слика 52.** Структура тачке у којој долази до инверзије спина за RAF реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^\bullet у синглетном (горе лево) и триплетном (горе десно) стању. Назначене су укупне енергије структура. Резултат IRC рачуна за триплетно стање (доле).

- Слика 53.** Оптимизоване геометрије прелазних стања добијених за НАТ реакције између моноанјона хлорогенске киселине са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ (горе). Апроксимација прелазног стања за НАТ реакцију између дианјона хлорогенске киселине са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ (доле).
- Слика 54.** Зависност укупне енергије од $\text{O3}'\text{-H3}'$ растојања у НАТ реакцији између дианјона хлорогенске киселине и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$.
- Слика 55.** Зависност укупне енергије од HO-H6 растојања у НАТ реакцији између тролокса и HO^\bullet .
- Слика 56.** Оптимизоване геометрије прелазних стања за RAF реакције између тролокса и HO^\bullet .

Листа табела

- Табела 1.** Биолошки најзначајније реактивне врсте кисеоника и азота.
- Табела 2.** Најзначајнији извори хлорогенске киселине.
- Табела 3.** Фаворизоване доворско-акцепторске интерације у конформерима **1** (гасовито стање) и **8** (DMSO) добијене помоћу прорачуна на B3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоу теорије. Вредности за конформер **1** су дате у фонту Regular, а за конформер **8** у фонту *Italic*. E(2) се односи на енергију интеракције другог реда.
- Табела 4.** Експерименталне и израчунате вредности таласних бројева који се јављају у IR и Raman-ском спектру хлорогенске киселине, асигнација и интензитети вибрационих облика.
- Табела 5.** Експерименталне и израчунате вредности хемијских померања (ppm) у ¹³C- и ¹H-NMR спектрима хлорогенске киселине у DMSO растварачу.
- Табела 6.** Експерименталне и израчунате (B3LYP-D3 и M06-2X) вредности хемијских померања (ppm) у ¹³C-NMR спектру различитих конформера хлорогенске киселине у DMSO растварачу. Резултати добијени помоћу M06-2X функционала су дати у фонту *Italic*.
- Табела 7.** Експерименталне и израчунате (B3LYP-D3 и M06-2X) вредности хемијских померања (ppm) у ¹H-NMR спектру различитих конформера хлорогенске киселине у DMSO растварачу. Резултати добијени помоћу M06-2X функционала су дати у фонту *Italic*.
- Табела 8.** UV подаци за хлорогенску киселину: експерименталне вредности таласних дужина које одговарају свим апсорпционим тракама и резултати добијени помоћу TDDFT прорачуна. λ_{\max} се односи на експерименталне и израчунате вредности таласних дужина, док f означава осцилаторну јачину.
- Табела 9.** Подаци везани за одабране NLMO орбитале молекула **5CQA** добијени из B3LYP-D3 матрице густине.
- Табела 10.** Енталпије солватације протона (kJ mol⁻¹). Резултати су добијени помоћу 6-311++G(d,p) базисног скупа и SMD солватационог модела. Скраћеница RSD (*Relative Standard Deviation*) се односи на релативну стандардну девијацију.
- Табела 11.** Енталпије солватације електрона (kJ mol⁻¹). Резултати су добијени помоћу 6-311++G(d,p) базисног скупа и SMD солватационог модела. Скраћеница RSD (*Relative Standard Deviation*) се односи на релативну стандардну девијацију.
- Табела 12.** Енталпије солватације, $\Delta H_{\text{sol}}(\text{H}^+)$ и $\Delta H_{\text{sol}}(\text{e}^-)$ и енталпије солватисаног протона и електрона $\Delta H(\text{H}^+_{\text{sol}})$ и $\Delta H(\text{e}^-_{\text{sol}})$, (kJ mol⁻¹) израчунате помоћу B3LYP функционала у комбинацији са 6-311++G(3df,3pd) и Aug-cc-pVTZ базисним скуповима.
- Табела 13.** Израчунате и експерименталне вредности хемијских померања (ppm) молекула неохлорогенске и криптохлорогенске киселине у метанолу.
- Табела 14.** Релативне енталпије кафеинске и кафеоилхинских киселина, њихових радикала, анјона и радикал катјона у три различита растварача израчунатих помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела (kJ mol⁻¹). Резултати израчунати на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије су приказани у фонту *Italic*.

- Табела 15.** Релативне слободне енергије кафинске и кафеоилхинских киселина, њихових радикала, анјона и радикал катјона у три различита растварача израчунатих помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела (kJ mol^{-1}). Резултати израчунати на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије су приказани у фонту *Italic*.
- Табела 16.** Термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) који описују антиоксидативне механизме кафеинске и кафеоилхинских киселина у различитим растварачима израчунати помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела су приказани у фонту *Italic*.
- Табела 17.** Слободне енергије (фонт Regular) и енталпије (фонт *Italic*) реакција у којима настају $(5\text{CQA-O}_2)^{\cdot,*}$, $(5\text{CQA-HOO})^{\cdot}$ и $(5\text{CQA-HO})^{\cdot}$ радикалски адукти у воденом раствору. Вредности енергија су дате у kJ mol^{-1} .
- Табела 18.** Слободне енергије реакција (46) – (52) у kJ mol^{-1} .
- Табела 19.** Енталпије реакција (46) – (52) у kJ mol^{-1} .
- Табела 20.** Гибсове енергије (kJ mol^{-1}) реакција (53) – (56) хлорогенске киселине и тролокса израчунате на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом. Скраћеница PL (*Proton Loss*) се односи на реакцију губитка протона, док се ET (*Electron Transfer*) односи на реакцију преноса електрона. Ове реакције представљају први корак SPLET и SET-PT механизма. На Схемама 1 и 2 је представљена нумерација атома.
- Табела 21.** Гибсове енергије активације ΔG_a^\ddagger (kJ mol^{-1}) и константе брзине k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) за НАТ и RAF реакције хлорогенске киселине и тролокса са HO^{\cdot} и $\text{CH}_3\text{OO}^{\cdot}$ радикалима. r^{\ddagger} означава релативну антиоксидативну активност хлорогенске киселине. Резултати су добијени на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом.
- Табела 22.** Гибсове енергије активације ΔG_a^\ddagger (kJ mol^{-1}) и константе брзине k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) за НАТ и RAF реакције хлорогенске киселине и тролокса са HO^{\cdot} и $\text{CH}_3\text{OO}^{\cdot}$ радикалима. r^{\ddagger} означава релативну антиоксидативну активност хлорогенске киселине. Резултати су добијени на M05-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са SMD солватационим моделом.
- Табела 23.** Релативна количина производа (Γ) за све повољне реакционе путеве хлорогенске киселине. У свим случајевима је коришћен 6-311++G(d,p) базисни скуп.
- Табела 24.** Гибсове енергије реакција (57) – (67) у kJ mol^{-1} .
- Табела 25.** Енергије активације ΔG_a^\ddagger у kJ mol^{-1} , константе брзине k у $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и релативна количина производа Γ у % за реакције моноанјона и дианјона хлорогенске киселине са HO^{\cdot} и $\text{CH}_3\text{OO}^{\cdot}$.
- Табела 26.** Гибсове енергије реакција (68) – (72) изражене у kJ mol^{-1} .
- Табела 27.** Енергије активације ΔG_a^\ddagger у kJ mol^{-1} , константе брзине k у $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и релативна количина производа Γ у % за реакције моноанјона тролокса са HO^{\cdot} и $\text{CH}_3\text{OO}^{\cdot}$.

Листа схема

- Схема 1.** Могући антиоксидативни реакциони путеви хлорогенске киселине у неполарним растварачима. Дате су ознаке за атоме као и за производе приказаних реакција.
- Схема 2.** Могући антиоксидативни реакциони путеви тролокса у неполарним растварачима. Дате су ознаке за атоме као и за производе приказаних реакција.
- Схема 3.** Могући антиоксидативни реакциони путеви хлорогенске киселине у базном воденом раствору; $R^\bullet = HO^\bullet$ или CH_3OO^\bullet ; Hin^- се односи са хинон анјон хлорогенске киселине.
- Схема 4.** Могући антиоксидативни реакциони путеви тролокса у базној воденој средини; $R^\bullet = HO^\bullet$ или CH_3OO^\bullet .



ОПШТИ ДЕО

Слободни радикали

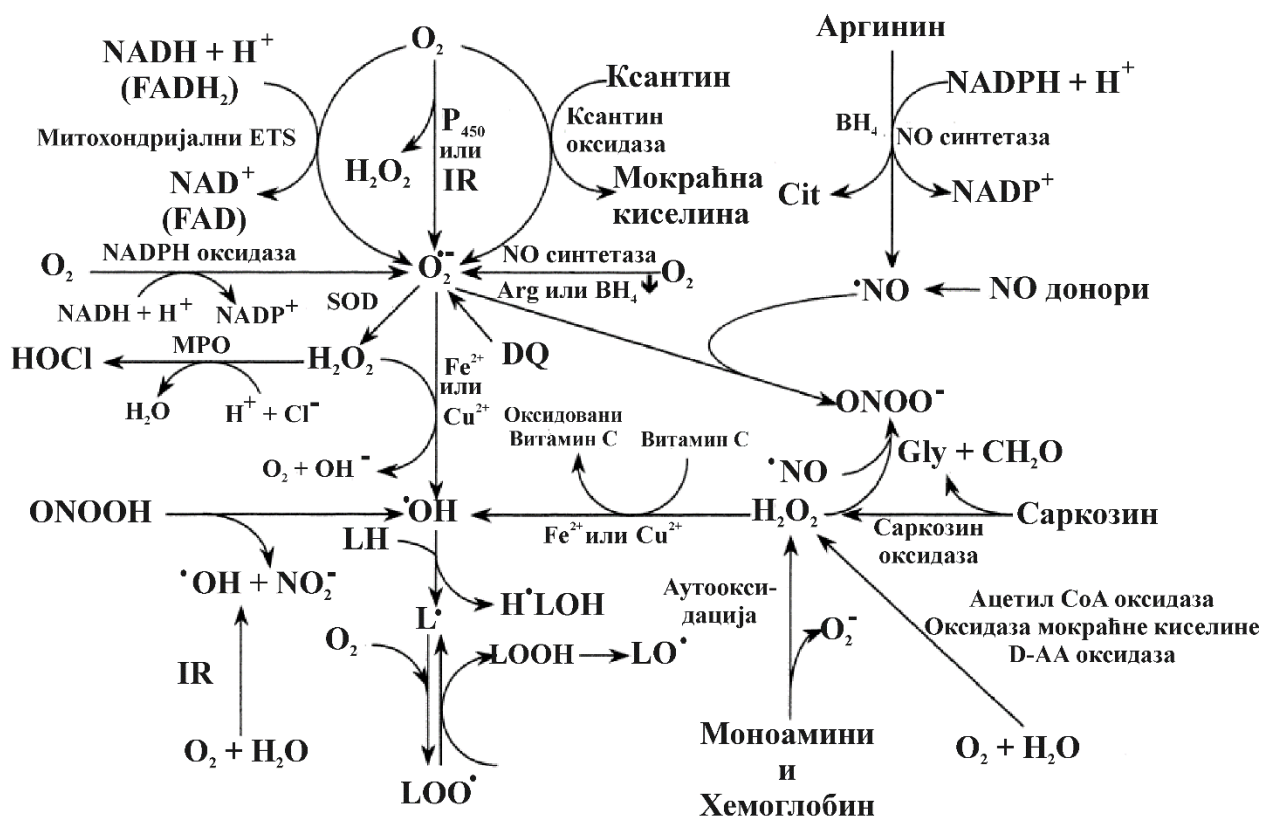
Слободни радикали су хемијске врсте које садрже неспарени електрон, а који их чини изузетно реактивним и нестабилним једињењима.¹ Зато што теже да спаре неспарени електрон слободни радикали су снажни електрофили, односно имају јак оксидациони потенцијал. Слободни радикали се у реакцији са супстратом (биомолекули или неко друго једињење) редукују и губе слободно радикалски карактер, док се супстрат оксидује, при чему настаје секундарни слободни радикал који започиње ланац радикалских реакција. За свега неколико секунди може се одиграти на хиљаде радикалских реакција, које се одвијају све док се не деактивирају новонастали слободни радикали.

У литератури се све више користи термин „реактивна врста“ уместо термина слободни радикал. Реактивне врсте по хемијској структури могу бити слободни радикали, али и молекули и јони. У популарној научној и биомедицинској литератури највише се проучавају две врсте слободних радикала: реактивне врсте кисеоника (*Reactive Oxygen Species*, ROS) и реактивне врсте азота (*Reactive Nitrogen Species*, RNS). Неки од биолошки најважнијих ROS и RNS су приказани у Табели 1.

Табела 1. Биолошки најзначајније реактивне врсте кисеоника и азота.

Реактивне врсте кисеоника							
	Супероксил радикал ањон O₂⁻	Хидроксил радикал HO[•]	Водоник пероксид H₂O₂	Пероксил радикал ROO[•]	Хидропероксид ROOH	Синглетни кисеоник ¹O₂	Озон O₃
Време полуживота	10 ⁻⁶ s	10 ⁻⁹ s	стабилан	1 s	Стабилан	10 ⁻⁶ s	1 s
Реактивне врсте азота							
	Нитроксил радикал NO[•]	Пероксинитрит ONOO⁻	Пероксиазотаста киселина ONOOH	Азот диоксид NO₂			
Време полуживота	1 s	10 ⁻³ s	Стабилна	1 s			

Слободни радикали су фундаментални у сваком биохемијском процесу и представљају есенцијални део аеробног живота у нашем метаболизму. Учествују у одржавању хомеостазе на ћелијском нивоу код здравих ткива, а имају и важну улогу као сигнални молекули. Слободни радикали такође учествују и у добијању АТФ-а из АДФ-а у процесу оксидативне фосфорилације у митохондријама, детоксификацији ксенобиотика помоћу цитохрома P₄₅₀, убијају микроорганизме и ћелије рака, а могу да се понашају и као секундарни гласници. Реакције у којима настају ROS и RNS у нашем организму су приказане на Слици 1.²



Слика 1. Реакције у којима у организму настају реактивне врсте кисеоника и азота.²

Како је приказано на Слици 1, NO настаје из L-аргинина помоћу једне од три изоформе NO синтетазе. Све три изоформе (nNOS, iNOS, eNOS) за каталитичку активност захтевају присуство кисеоника, тетрахидробиоптерина, никотинамид аденин динуклеотид фосфата (NADPH), калмодулина, флавин аденин динуклеотида (FAD), флавин мононуклеотида (FMN) и хема, док је за активност nNOS и eNOS неопходно присуство и Ca²⁺ јона.

Супероксил радикал анјон (Слика 1) се добија из кисеоника на више начина:

- 1) Оксидацијом NADPH помоћу NADPH оксидазе;
- 2) Оксидацијом ксантина или хипоксантина помоћу ксантин оксидазе;
- 3) У реакцијама трансфера електрона које се одигравају у митохондријама, при чему долази до оксидације редукованих облика NADH, NADPH и FADH₂;
- 4) Аутооксидацијом моноамина (допамина, епинефрина и норепинефрина), флавина и хемоглобина у присуству прелазних метала у траговима;
- 5) Редукцијом молекула кисеоника електроном помоћу цитохрома P₄₅₀;
- 6) Редукцијом молекула кисеоника електроном помоћу nNOS или eNOS када су у дефициту аргинин или тетрахидробиоптерин.

Супероксид дизмутаза (SOD) претвара O_2 у H_2O_2 (Слика 1). Водоник пероксид настаје и редукцијом молекула кисеоника са два електрона помоћу цитохрома P_{450} , оксидазе D-амино киселина, ацетил CoA оксидазе, или урат оксидазе. Оксидација саркозина која се јавља у метаболизму глицина такође води до настанка H_2O_2 . У присуству воде и кисеоника, јонизацијом се добијају $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и HO^{\bullet} , при чему је HO^{\bullet} најштетнији међу ROS. NO у реакцији са $O_2^{\bullet-}$ или H_2O_2 даје $ONOO^-$ чији је оксидациони потенцијал већи од оксидационог потенцијала појединачних врста из којих настаје.

Слободни радикали у организму настају и приликом инфламације.¹ Током процеса фагоцитозе у активним фагоцитима дешава се „оксидативна ерупција“ услед двадесет пута повећане потрошње кисеоника и прекомерне продукције $O_2^{\bullet-}$, повећаног стварања H_2O_2 и других ROS. Могу настати и у болестима, као што су: аутоимуне, неуродегенеративне, малигне, кардиоваскуларне, професионална обољења радника изложених дејству токсичних супстанци, као и у различитим нефизиолошким условима, попут исхемије, хипоксије, хипероксије, реперфузије.¹

Током метаболизма (биотрансформације) бројних ендогених и егзогених једињења у ендоплазматичном ретикулуму, посредством система мешовитих оксидаза, могу такође настати слободни радикали.¹ Ксенобиотици обухватају једињења која се уносе у наш организам, тзв. егзогена једињења (бројни лекови, састојци хране, пестициди, метали), као и утицаје из човековог окружења као што су зрачење (UV, јонизујуће), загађеност (природна, антропогена), дувански дим, итд. Од ендогених једињења за стварање ROS највише се помиње допамин, који аутооксидацијом у нервном ткиву производи $O_2^{\bullet-}$.

У реакцији H_2O_2 са металима који имају променљиву валенцу, у тзв. Фентоновој реакцији, настаје један од најпотентнијих радикала HO^{\bullet} .¹ Токсичност бројних метала, као што су кадмијум, арсен, никал и други приписана је продукцији слободних радикала и настанку оксидативног стреса. По уносу у организам токсични метали са променљивом валенцом (нпр. арсен) директно доводе до стварања слободних радикала, док они који имају стабилну валенцу (нпр. кадмијум) индиректно доводе до настанка оксидативног стреса на тај начин што интерагују са есенцијалним металима. Слободни радикали могу још настати и при тровању, као и при повећаној физичкој активности.¹

Штетни ефекти реактивних кисеоничних врста

ROS могу да нападну виталне компоненте ћелија, као што су полинезасићене масне киселине, протеини и нуклеинске киселине.³ У мањој мери, мета њиховог напада могу бити и угљоводоници. Мембрански липиди присутни у субћелијским органелама веома су подложни дејству слободних радикала. Када реагују са слободним радикалима, настају нови радикали који покрећу низ ланчаних реакција липидне пероксидације. Липидном пероксидацијом се добијају бројни токсични споредни производи. Новонастали производи могу да делују на местима удаљеним од оних на којима су генерисани, при чему се понашају као „секундарни гласници“. Штета која се проузрокује реакцијама липидне пероксидације је погубна за функционисање ћелије.⁴

Оксидација протеина, условљена присуством ROS, доводи до генерисања низа како стабилних тако и нестабилних производа, као што су протеин хидропероксида. Они даље, услед интеракције са јонима прелазних метала, дају нове радикале. Оксидациони производи протеина могу временом да се акумулирају и тако допринесу убрзаном старењу и развоју различитих болести.

Постоје два начина на који радикали могу да реагују са DNA: адиција на базе и апстракција водониковог атома из шећера. Двострука веза C4=C5 пиримидина је посебно осетљива на напад HO•, при чему настају различити штетни оксидациони производи попут тиамин гликола, урацил гликола, остатака урее, 5-хидроксиоксиуридина, 5-хидроксиоксицитидина и хидантоина. Интеракција пуринских база са HO• доводи до генерисања 8-хидроксиоксигуанозина, 8-хидроксиоксиаденозина, формаидопиримидина и других мање карактеристичних оксидационих производа.

Када су у питању угљоводоници, радикали насумично откидају H атом са неког од угљеникових атома производећи на тај начин радикале локализоване на C атому. Ово води до раскидања ланаца код важних молекула, као што је хијалуронска киселина.⁵

Верује се да оштећења ћелија које узрокују радикали играју главну улогу у настанку многих болести код људи — реуматоидни артритис, хеморагични шок, кардиоваскуларне болести, цистична фиброза, метаболички поремећаји, неуродегенеративне болести, гастроинтестинална улцерогенеза и сида. Неке специфичне ROS посредују у настанку Алцхајмерове и Паркинсонове болести,

оксидативне модификације липопротеина код атеросклерозе, канцера, Дауновог синдрома и исхемијске реперфузионе повреде у различитим ткивима укључујући срце, мозак, бубреге, јетру и гастроинтестинални тракт.

Антиоксиданти

Како би се организам заштитио од ROS, код људи је развијен високо функционални и софистицирани систем антиоксидативне заштите.³ Овај систем се састоји из различитих компонената, како ендогеног тако и егзогеног порекла, којима је функција да интерактивно и синергијски неутралишу слободне радикале како би заштитили биомолекуле од оштећења. Термин „антиоксиданти“ не подразумева једну одређену групу једињења сличних по хемијској природи, већ представља општи назив за сва једињења која могу да спрече или значајно смање оксидацију супстрата.⁶ Постоји више подела антиоксиданата. По једној, антиоксиданти се деле на ензимске, који представљају примарну линију антиоксидативне заштите, и неензимске антиоксиданте, који уједно чине секундарну линију одбране организма. Ензимска антиоксидативна заштита обухвата пет главних ензима који уклањају ROS из ћелија свих аеробних организама. Ову заштиту чине ензими супероксид дизмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (Gpx), глутатион редуктаза (GR) и глутатион-S-трансфераза (GST). У физиолошким условима ензими задржавају ниску концентрацију радикала у ћелијама. Њихова активност је регулисана прецизним механизмима на молекулском нивоу. Даље, ензими су битни за одржање хомеостазе између оксидативног и антиоксидативног капацитета, али и за преживљавање свих аеробних организама. Неензимски антиоксиданти обухватају природне ендogene производе ћелије, хранљиве егзогене супстанце и синтетичке производе. У неензимске антиоксиданте спадају витамин Е, витамин С, β-каротен, глутатион, албумин, металотионеин, трансферин, урати, билирубин, церулоплазмин, који с обзиром на то да имају различиту структуру и афинитет, остварују и различите механизме деловања антиоксидативне заштите.

По другој подели, постоје ендогени антиоксиданти, антиоксиданти који се налазе у храни и металопротеини.³ У ендogene антиоксиданте спадају билирубин, тиоли (нпр. глутатион, липоинска киселина, N-ацетил цистеин, NADPH и NADH), убихинон (коензим Q₁₀), мокраћна киселина и ензими као што су CuZn- или Mn-

супероксид димутаза, каталаза и селен-глутатион пероксидаза. Од антиоксиданата који се могу наћи у исхрани (егзогени) најраспрострањенији су витамин С, витамин Е, β -каротен и други каротеноиди и оксикаротеноиди (нпр. ликопен и лутеин) и полифеноли. У металопротеине спадају албумин, церулоплазмин, металотионенин, феритин, миоглобин и трансферин.

Улога антиоксиданата у организму

Антиоксиданти су веома важни за људе због могућности да учествују у вишеструко повољним интеракцијама у организму.⁷ Њихова заштитна улога често зависи од случаја, типа и од саме локације. На пример, антиоксидант који је добијен како би штитио од липидне пероксидације у организму може, а и не мора, да помогне у спречавању оксидативног стреса начињеног на DNA, протеинима или другим једињењима. Уколико је неки антиоксидант ефикасан у *in vitro* условима, то не мора да значи да ће бити ефикасан и у *in vivo* условима. Дигестивни тракт код људи може да разложи или да измени антиоксидативна једињења док пролазе кроз стомак, спречавајући их на тај начин да се апсорбују у цревима и тако их чине неефикасним у спречавању оксидације у организму.⁸ Разумљиво је очекивати и да ће, ако неко једињење има слабу антиоксидативну активност *in vitro*, такође бити и слаб антиоксидант у *in vivo* условима.

Улога антиоксиданата у храни

Још једна од важних улога антиоксиданата је да њихово присуство у прехранбеним производима, где се понашају као конзерванси, обезбеђује дужи рок трајања и одржава квалитет хране. Антиоксидативна активност у храни зависи од многих фактора укључујући место на коме је антиоксидант лоциран, интеракцију са другим састојцима хране, и са целокупним условима, као што су рН, јонска јачина и хидрофилна/хидрофобна равнотежа.⁹ Ефикасност антиоксиданта у „хватању“ слободних радикала у воденом раствору зависи од растворљивости самог антиоксиданта у воденој и липидној фази хране или пића.

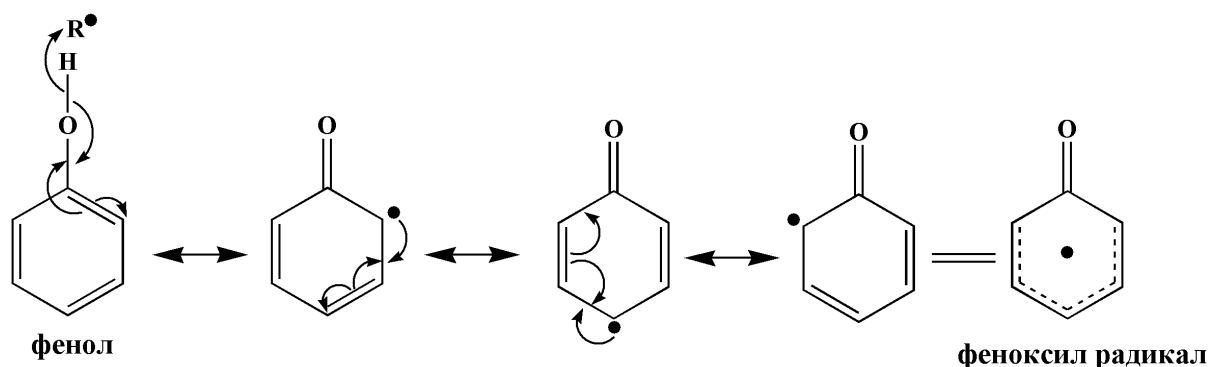
Фенолни и полифенолни антиоксиданти

Једна од најпознатијих група међу природним антиоксидативним једињењима у научној литератури су фенолна једињења. Свако једињење које садржи хидроксилну групу везану за ароматични прстен сматра се фенолним једињењем. На Слици 2 је приказана класификација фенола који су заступљени у храни.



Слика 2. Класификација фенола заступљених у храни.⁷

У реакцији природних фенола са слободним радикалом фенол донира водоников атом из фенолне групе нестабилном радикалу. При томе настаје феноксил радикал, који је знатно стабилнији од слободног радикала.¹⁰ До стабилизације феноксил радикала долази услед присуства резонанције (Слика 3).



Слика 3. Делокализација неспареног електрона у феноксил радикалу.

Иако се неспарени електрон у првом тренутку налази на електронегативном кисеонику фенолне групе, касније се делокализује преко ароматичног прстена. Настале стабилне фенолне радикалске врсте ће са знатно мањом вероватноћом условити даљи ток ланчаних радикалских реакција. Ова структурна карактеристика феноле чини моћним антиоксидантима.

Биодоступност и биоактивност фенола у људском организму

Феноли који се налазе у храни су јаки антиоксиданти *in vitro*, али допринос у антиоксидативној одбрани *in vivo* је неизвестан. Из овог разлога је при проучавању деловања неходно разматрање и биодоступности и биоактивности.

Биодоступност представља проценат хранљиве материје која се свари, апсорбује и метаболише кроз нормалне метаболичке процесе. Разликује се код сваког полифенола. Исто тако, не постоји повезаност између количине унетог полифенола кроз храну и његове биодоступности у организму. Агликони се могу апсорбовати у танком цреву, док се већина полифенола присутних у храни који су у облику естара, гликозида и полимера не могу апсорбовати у основном облику.¹¹ Да би се ова једињења апсорбовала, неопходно је да их ензими или микрофлора дебелог црева хидролизују. Током процеса апсорпције, полифеноли трпе различите промене. Облици ових једињења који доспевају у крв и ткива су другачији од оних који су присутни у храни. Из тог разлога је веома тешко да се сви метаболити идентификују и да се процени њихова биолошка активност. Важно је да се напомене да је хемијска структура, а не концентрација, она која одређује брзину и обим апсорпције и природу метаболита који циркулишу кроз крвну плазму.

Полифеноли се разликују и по месту где се апсорбују у организму. Неки полифеноли се добро апсорбују у гастро-интестиналном тракту, док се други апсорбују у цревима или у другим деловима дигестивног тракта.

Веза између структуре фенола и антиоксидативне активности

Веза између структуре фенола и антиоксидативне активности веома је зависна од стања система, при чему се пре свега мисли на: температуру, притисак, светлост, релативне физичке особине, поларност, присуство супстрата и метала.¹² Откривено је да су најбољи антиоксиданти она фенолна једињења која поседују електрон донорску групу директно везану за ароматични прстен.¹³ Студије Кима (Kim) и његових сарадника, који су испитивали антиоксидативну активност различитих група полифенола, показале су да ова активност расте са порастом броја фенолних прстенова.¹⁴ Исто тако, повећање броја слободних -ОН група доводи до повећања ефикасности фенолних једињења као антиоксиданата.¹⁵ Гликозиди, настали везивањем шећера за молекулу флавоноида, показују мању антиоксидативну активност од слободних флавоноида, што се објашњава повећањем стерних сметњи. Антиоксидативна активност фенолних киселина и њихових естара зависи од броја присутних хидроксилних група. Електрон привлачни ефекат карбоксилне групе у бензоевим киселинама има негативан утицај на могућност донирања водониковог атома код хидрокси бензоата. Деривати циметне киселине показују већу активност од деривата бензоеве киселине.¹⁴

Фенолне киселине као антиоксиданти

Фенолне киселине су деривати бензоеве и циметне киселине. Налазе се у готово свим прехранбеним биљкама (воће, поврће, житарице) и распрострањене су кроз целу биљку налазећи се у семену, листу, корену и стабљници.¹⁶ Мали број њих се налази у слободном облику. Највећи део је везан у облику естара, етара или ацетала за структурне компоненте биљке (целулоза, протеини, лигнин), веће полифеноле (флавоноиди), мање органске молекуле (нпр. глукоза, хинска, малеинска или винска киселина), или друге природне производе (нпр. терпени).¹⁷

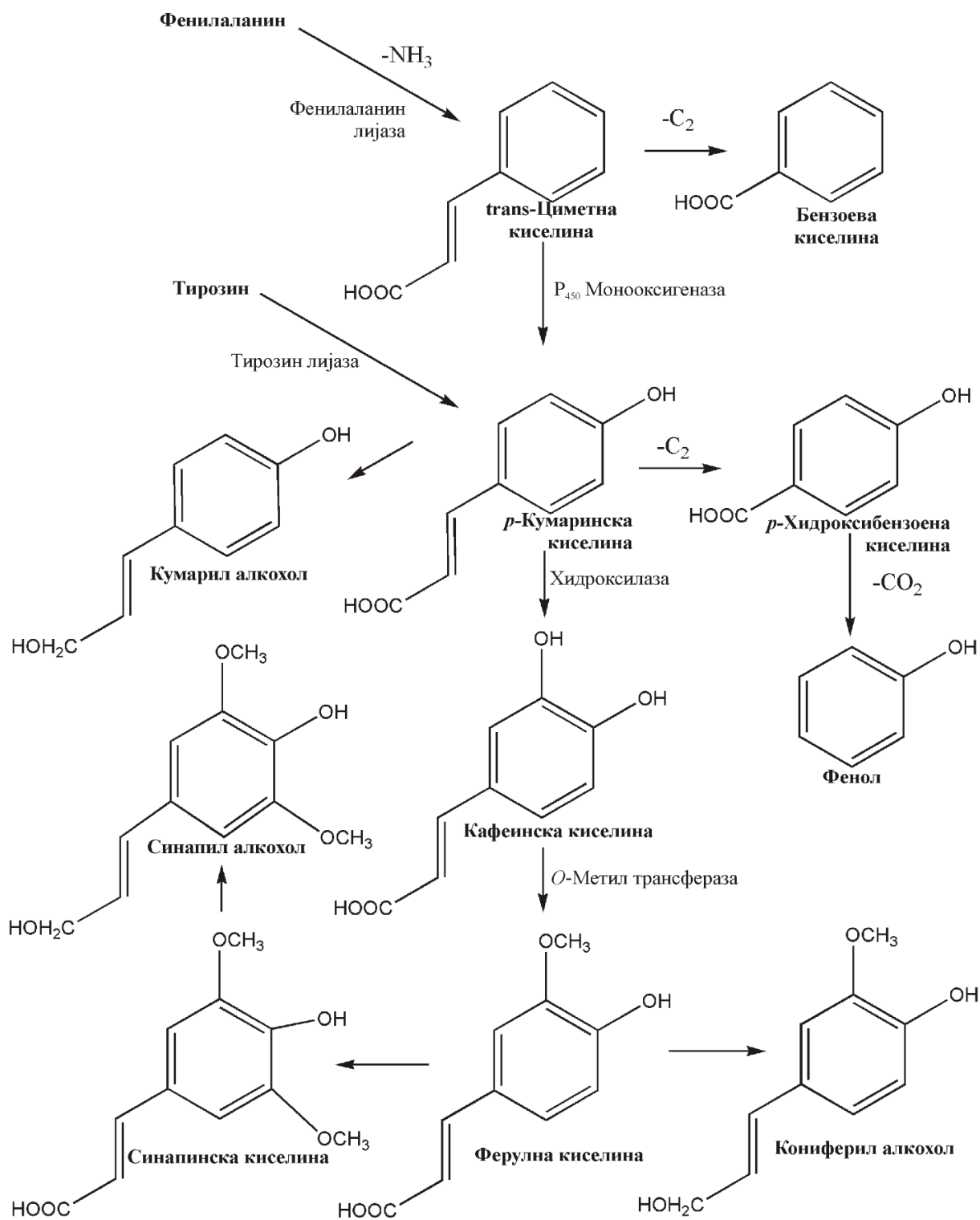
Садржај хидроксибензоевих киселина у јестивим биљкама је низак. Има их у нешто већој количини једино у одређеном црвеном воћу, црној роткви или у луку. За разлику од њих, хидроксициметне киселине, нарочито кафеинска киселина, много су више заступљене у биљкама.

Присуство фенолних киселина у храни доприноси њеном квалитету. Оне утичу на боју, нутриционе и антиоксидативне особине.¹⁸ Такође, имају утицај и на органолептичка својства хране, као што су укус, киселост и тврдоћа. Показано је и да њихово присуство утиче на сазревање плода, спречава труљење, а има улогу и у конзервирању хране.¹⁹

Биосинтеза фенолних киселина

Како деривати бензоеве, тако и деривати циметне киселине воде биосинтетичко порекло од ароматичне аминокиселине L-фенилаланина (Слика 4), која настаје из хоризмата, крајњег производа пута шикимске киселине, који је главни пут биосинтезе ароматичних аминокиселина и природних ароматичних једињења у биљкама.⁷

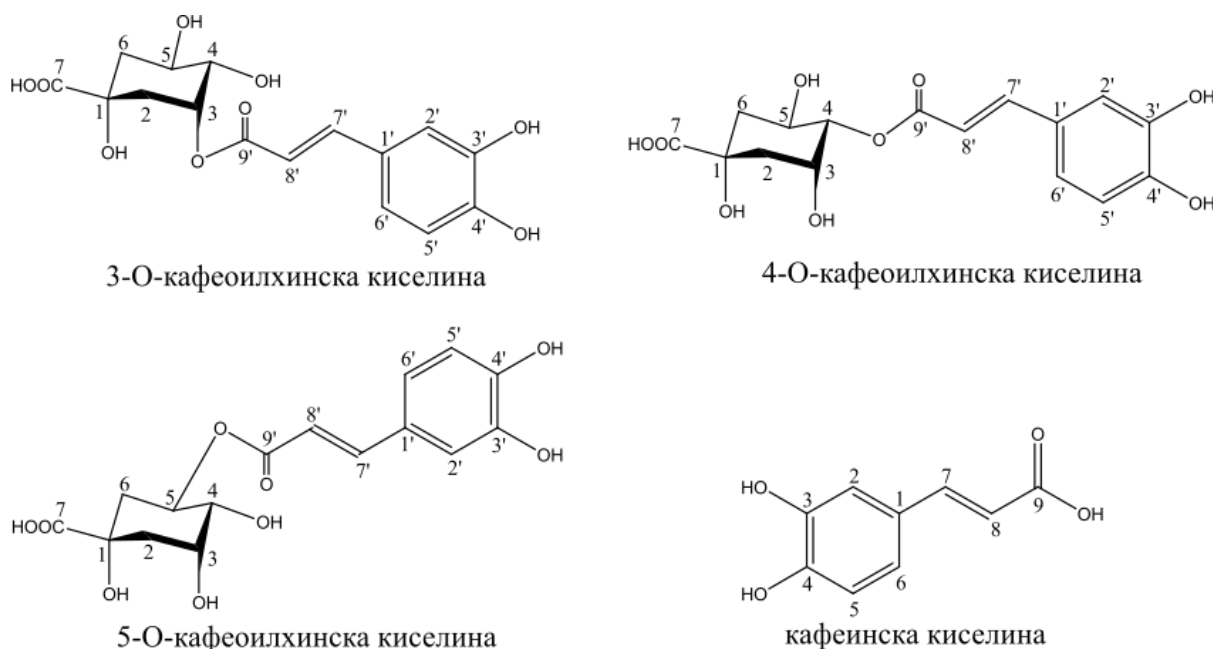
Конверзија L-фенилаланина у различите хидроксициметне киселине укључује секвенцу у три корака која се односи на „општи метаболизам фенилпропаноида“ и која је готово универзална за синтезу ароматичних метаболита. Први корак у фенилпропаноидном метаболичком путу је стереоспецифична (анти) деаминација фенилаланина, при чему долази до формирања *trans* двогубе везе на циметном делу. Хидроксилацијом ароматичног прстена у положају 4 добија се *para*-кумаринска киселина. Даља синтеза обухвата додатну хидроксилацију ароматичног прстена и реакције метиловања, при чему настају други деривати (кафеинска, ферулна и синапинска киселина).



Слика 4. Биосинтеза фенолних киселина у биљкама.⁷

Хлорогенска киселина као природни антиоксидант

Главни представник хидроксициметних киселина је кафеинска киселина (СА). У храни се СА (Слика 5) најчешће налази у облику кафеоилхинских киселина, које представљају естре кафеинске и хинске киселине (Слика 5). У зависности од места везивања постоје три изомерна облика кафеоилхинских киселина: хлорогенска киселина или 5-О-кафеоилхинска киселина (*5-O-caffeoylquinic acid*, **5CQA**), затим криптохлорогенска киселина или 4-О-кафеоилхинска киселина (*4-O-caffeoylquinic acid*, **4CQA**) и неохлорогенска киселина или 3-О-кафеоилхинска киселина (*3-O-caffeoylquinic acid*, **3CQA**).



Слика 5. Структуре три изомерне кафеоилхинске киселине и кафеинске киселине.

Од три изомера кафеоилхинских киселина **5CQA** је најзаступљенија. Налази се у различитим биљкама у којима делује као антиоксидант и на тај начин их штити од липидне пероксидације.^{20,21} Кафа, јагоде, ананас, јабуке, сунцокрет и боровнице су богате фенолним једињењима од којих је најзаступљенија хлорогенска киселина.²² Плод шљиве садржи 37 mg/kg **5CQA**.²³ Најбогатији извори су зрно кафе и кувана кафа. Садржај варира од 7,88 % до 14,4 % суве материје, у зависности од тога која је врста кафе у питању²⁴ и од услова под којима је узгајана.²² Прерађивање зелене кафе води до 8-10 % губитка на сваких 1 % губитка суве материје.^{24,25} Процењено је да 2 g раствореног праха кафе обезбеђује 50 до 150 mg киселине.^{24,25}

Табела 2. Најзначајнији извори хлорогенске киселине.

Извор	Количина 5CQA
Мате чај	0,42–0,540 mg/ml ²⁷
Лист црног и зеленог чаја	10–15 g/kg ^{24,25}
Црни и зелени кувани чај	У траговима ^{24,25}
Сирова зрна кафе	60 g/kg ²⁸
Кувана кафа	500 mg/l ²⁸
Свежа шљива	15–129 mg/kg ²²
Сува шљива	53–77 mg/kg ²³
Јабуре	62–385 mg/kg ^{24,25,28}
Сокови од јабуке	180 mg/l ²⁸
Дивља вишња	400 mg/kg ²⁸
Крушка	60–280 mg/kg ^{24,25}
Сокови од крушке	240 mg/l ^{24,25}
Бресква	50–600 mg/kg ^{24,25,28}
Боровница	0,5–2 g/kg ^{24,25,28}
Купина	50 mg/kg ^{24,25}
Црна рибизла	50 mg/kg ^{24,25}
Корен цикорије	2,6 g/kg ²⁸
Артичока	450 mg/kg ^{23,24}
Црни целер	180 mg/kg ^{24,25}
Плави патлиџан	600 mg/kg ^{24,25}
Парадајз	10–80 mg/kg ^{24,25}
Свежи кромпир	1400 mg/kg ²⁸
Кувани кромпир	300 mg/kg ²⁸
Целер	2–65 mg/kg ^{24,25}
Слатки кромпир	500 mg/kg ^{24,29}
Свежа шаргарепа	80 mg/kg ²⁸
Кувана шаргарепа	45 mg/kg ²⁸
Репа	60 mg/kg ²⁸

Екстракт зелене кафе се користи за производњу хранљивих суплемената, неких пића и различитих производа од кафе.²⁶ Други извори **5CQA** су представљени у Табели 2. У свежим и сувим шљивама **3CQA** се налази у значајним концентрацијама, док је концентрација **4CQA** значајно мања.^{23,30}

Биолошка активност хлорогенске киселине

Хемијске особине **5CQA** су одговорне за њену изражену биолошку активност. У живим системима понаша се као моћни антиоксидант.³¹ Познато је да врло ефикасно неутралише ROS и RNS.³² Захваљујући томе, **5CQA** има важну улогу у спречавању појединих хроничних болести које изазива оксидативни стрес. Хватањем различитих слободних радикала, **5CQA** спречава и деструктивне ефекте које те врсте проузрокују на DNA.³³ Показано је и да су антиоксидативне особине ове киселине одговорне за смањивање запаљења и фиброзе јетре.³⁴ Конзумирање суплемената који су богати са **5CQA** има делотворне ефекте приликом лечења дијабетеса, гојазности и хепатичне стеатозе.³⁵ Такође, показано је да се хипогликемијска и хиполипидемијска активност манифестује због учествовања овог једињења у регулацији метаболизма глукозе и липида.³⁵ Експерименти вршени на мишевима доказали су да **5CQA** смањује нежељене ефекте који настају приликом лечења канцера цисплатином на тај начин што потискује оксидативни стрес, инфламацију, апоптозу, као и аутофагију, при чему побољшава регенерацију бубрега.³⁶ Утврђена је и антиканцерогена активност **5CQA** и њених структурних изомера, на тај начин што је мерена моћ инхибирања липидне пероксидације нуклеинских киселина у *in vitro* и *in vivo* условима.²⁰ *In vivo* испитивања на пацовима су показала да **5CQA** штити од исхемије.³⁷ **5CQA** спречава и настанак оксидативног стреса који настаје услед третирања биљака паракват хербицидом на тај начин што хвата $O_2^{\bullet-}$.³⁸

Метаболизам хлорогенске киселине

Показано је да је **5CQA** јак антиоксидант *in vitro*, али се поставља питање какво је дејство овог антиоксиданта *in vivo*, јер подлеже интензивном метаболизму када се унесе у организам. Углавном се експериментална истраживања о метаболизму неког једињења свODE на мерење концентрације које организам излучи у мокраћу након уношња хране богате испитиваним антиоксидантом. Метаболити, у највећем броју случајева, имају мању активност од полазних једињења. Иако ниједна аналитичка метода за мерење метаболита у крви није доступна, могуће је да неразложени антиоксиданти доспевају у крвоток и ту делују као антиоксиданти и у *in vivo* условима.³⁹

Постоје различите студије о метаболизму **5CQA**. Олтхоф (Olthof) и њени сарадници су показали да је хипурна киселина најзаступљенији метаболит **5CQA**.³⁹ У знатно мањим количинама настају и С1- и С3-фенил метаболити. Претпоставља се да у организму сваки молекул **5CQA** даје два молекула хипурне киселине, јер се и кафеински и хински део метаболишу до овог једињења (Слика 6).

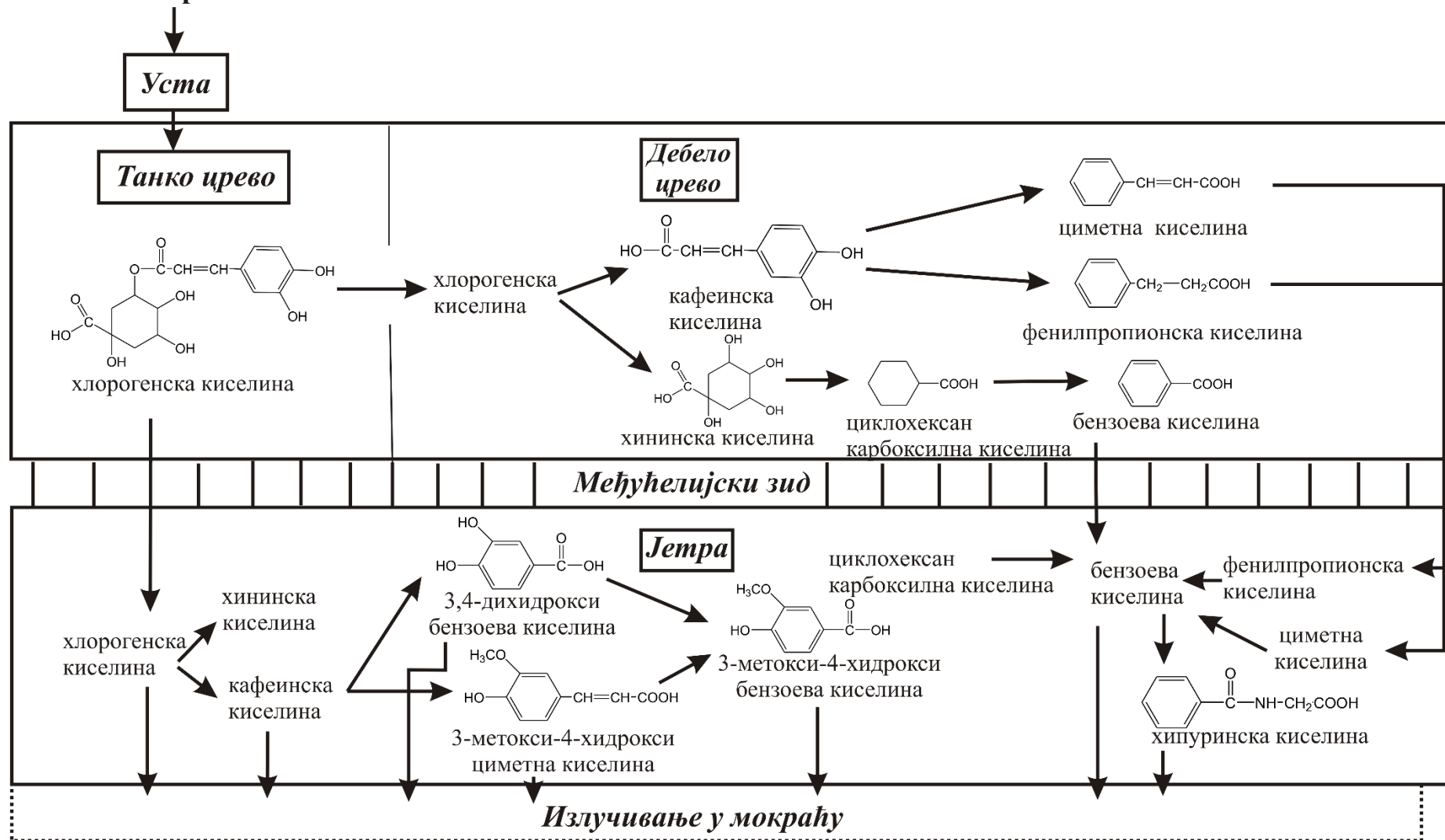
Већина унете **5CQA** доспева у дебело црево, у коме микрофлора најпре хидролизује **5CQA** до кафеинске и хинске киселине. Под дејством бактерија из дебелог црева долази до дехидроксилације кафеинске киселине. Након апсорпције, кафеинска киселина се у највећој мери процесом β -оксидације претвара у бензоеву киселину. Дехидроксилацијом хинске киселине настаје циклохексанкарбоксилна киселина, која се претвара у бензоеву киселину под дејством микрофлоре дебелог црева или након апсорпције у телесним ткивима. Настала бензоева киселина је конјугована са глицином и излучује се путем мокраће као хипурна киселина.

Према резултатима истраживања Рехнера (Rechner) и његових сарадника метаболизам **5CQA** води до настанка глукуронида ферулне и/или изоферулне киселине (Слика 7А).⁴⁰ Даља редукција двоструке везе у ферулној киселини води до настанка дихидроферулне киселине која даље подлеже β -оксидацији, при чему настаје ванилинска киселина.

С обзиром на то да до разлагања **5CQA** не долази у желуцу, највероватније место разлагања и метаболизма је дебело црево. Микроорганизми који се налазе у дебелом цреву, као и у јетри, могу бити одговорни и за процес *O*-метиловања, при коме се из кафеинске киселине добијају ферулна и изоферулна киселина.

Хлорогенска киселина

из хране



Слика 6. Предложени метаболизам разлагања хлорогенске киселине од стране Олтхофове и њених сарадника.³⁹

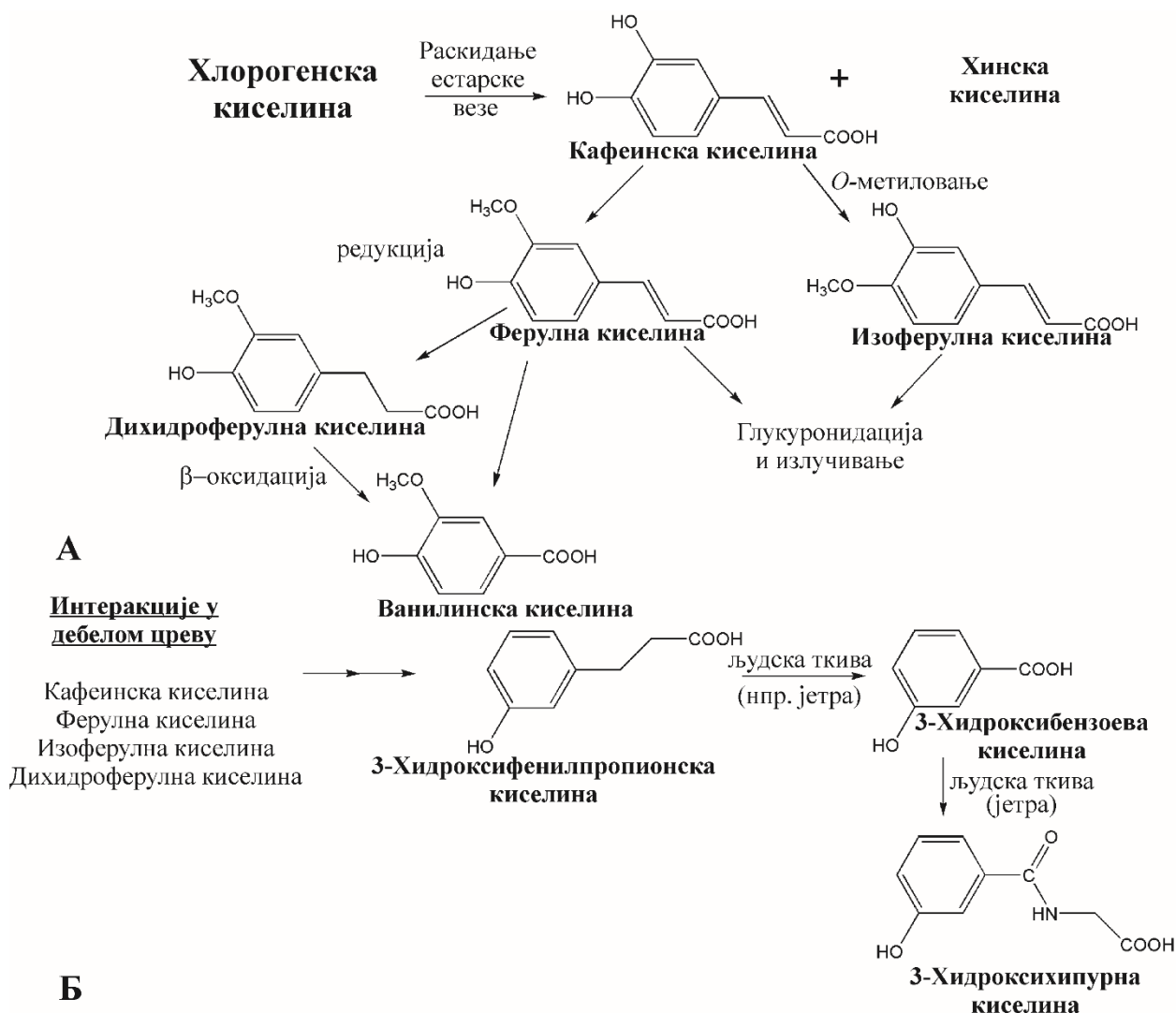
Процес глукуронидације се највероватније одвија у јетри, али је исто тако могуће да се одвија и у танком и дебелом цреву, у којима је откривено дејство UDP-глукуронилтрансферазе. До настанка дихидроферулне киселине може да дође редукцијом ферулне киселине, која се јавља као последица дејства цревне микрофлоре. Друга могућност је да настаје у жучи након апсорпције ферулне киселине, која је даље праћена редукцијом, апсорпцијом и елиминацијом у танком цреву.

Рехнер и његови сарадници сматрају да хипурна киселина представља неспецифични биомаркер за апсорпцију која се одвија у дебелом цреву приликом метаболизма **5CQA**. Разлог за овакво тумачење је што она може настати и из извора као што су: хинска киселина, бензоева киселина и ароматичне аминокиселине триптофан, тирозин и фенилаланин. Док хипурна киселина може да потиче из различитих извора, 3-хидроксиhipурна киселина може да настане само из једињења која поседују хидроксилну групу у положају 3. С обзиром на то да **5CQA** поседује хидроксилну групу у положају 3', 3-хидроксиhipурна киселина је специфичнији биомаркер за метаболизам који се одвија у дебелом цреву. Предложени пут за настајак ове киселине из полифенолних киселина које настају у метаболизму **5CQA** приказан је на Слици 7Б. Велики проценат излучене хипурне и 3-хидроксиhipурне киселине указује да у дебелом цреву долази до израженог метаболизма конзумиране **5CQA**, који води до деградације, при чему настају мање сложена фенолна једињења, која могу даље да се апсорбују и метаболишу.

За разлику од студија Олтхофове и Рехнера, у којима се претпоставља да је главни производ метаболизма хипурна, односно 3-хидроксиhipурна киселина, студије Лудвига (Ludwig) и његових сарадника показују да су могући крајњи производи микробиолошке деградације **5CQA** у дебелом цреву 1,2-дихидроксибензен (катехол), бензоева киселина и 4-хидроксибензоева киселина (Слика 8).⁴¹

Као и у претходним случајевима, претпоставља се да најпре долази до раскидања естарске везе посредством естераза из бактерија. Неколико бактерија, као што су *Escherichia coli*, *Bifidobacterium lactis* и *Lactobacillus gasser*, које се налазе у дебелом цреву, поседују цинамоил естеразу која може да катализује поменуто раскидање везе. 3,4-дихидроксибензоева киселина (протокатехуинска киселина) се добија након α -оксидације из интермедијера дихидрокафеинске киселине и 3',4'-дихидроксифенилсирћетне киселине (хомопротокатехуинска киселина). Хомопротокатехуинска киселина се брзо конвертује у 3,4-дихидроксибензоеву

киселину. 4'-дехидроксилација води затим до конверзије 3,4-дихидроксибензојеве киселине у 3-хидроксибензојеву киселину, док декарбоксилација води до настанка катехола, као што је и приказано на Слици 8.

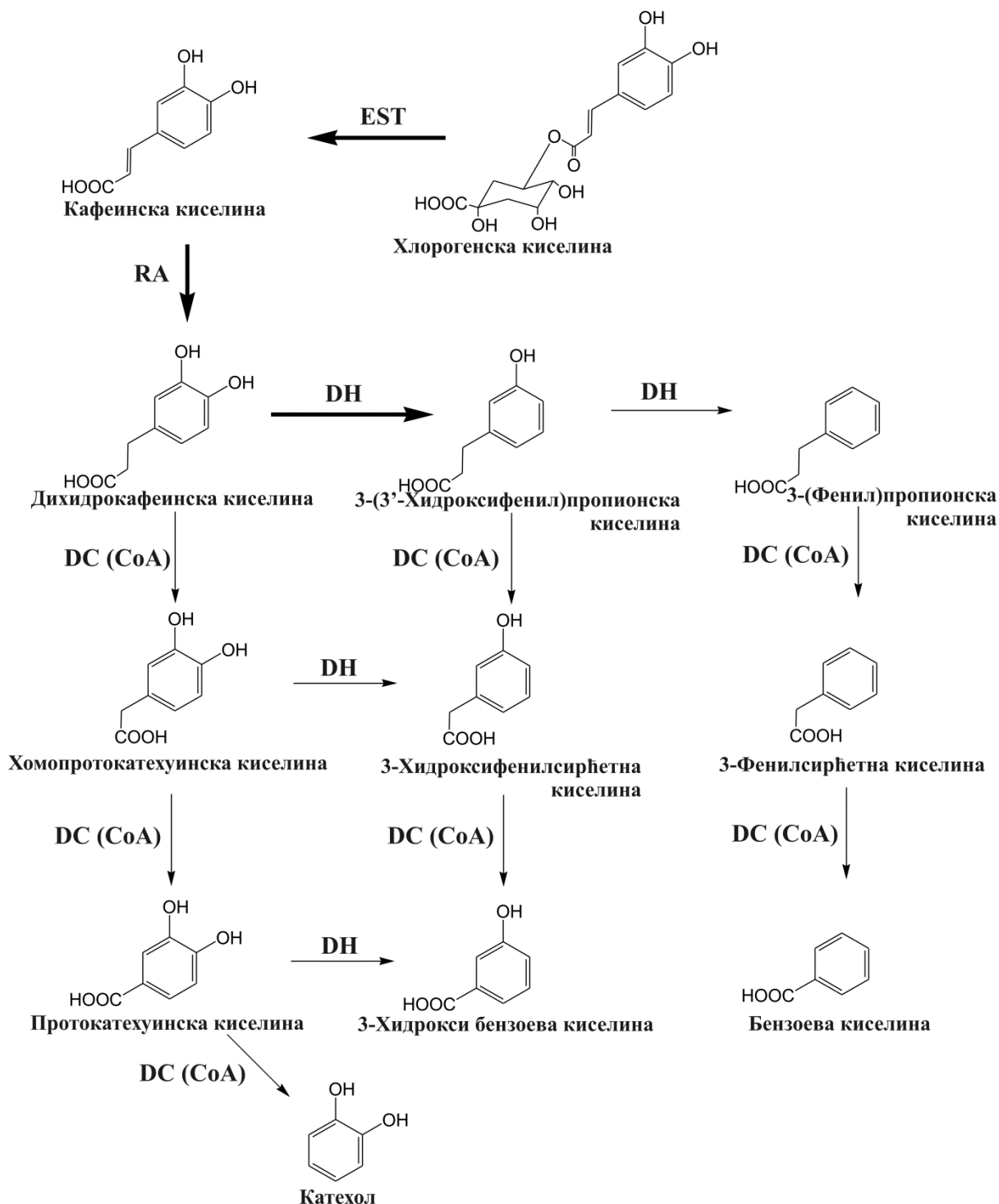


Слика 7. Предложени метаболизам разлагања хлорогенске киселине од стране Рехнера и његових сарадника.⁴⁰

Присуство бензојеве киселине и катехола у узорцима може бити резултат печења кафе, али се претпоставља да је њихова појава делом изазвана метаболизмом **5CQA**. Бензојева киселина такође може да настане и из хинске киселине услед дејства цревне микрофлоре.⁴² Још три фенолне киселине представљају метаболите **5CQA**: 3'-хидроксифенилсирћетна киселина, 3-хидроксибензојеву киселина и 4-хидроксибензојеву киселина које могу да настану услед α -оксидације из 3-(3'-хидроксифенил)пропионске киселине и 3-(4'-хидроксифенил)пропионске киселине.

Резултати ове студије указују да су бактерије присутне у цревима одговорне за даљу деметоксилацију, дехидратацију и декарбоксилацију дихидрокафеинске и 3-(3'-

хидроксифенил)пропионске киселине. Међутим, сматра се да ови метаболички путеви нису главни путеви метаболизма **5CQA**. Предложени путеви метаболизма, како главни тако и споредни, приказани су на Слици 8.



Слика 8. Предложени метаболизам разлагања хлорогенске киселине од стране Лудвига и његових сарадника.⁴¹ Подебљане стрелице означавају главне путеве деградације. EST - естераза; RA - редуктаза; DH - дехидрогеназа; DC (CoA) – декарбоксилација у присуству коензима А.

Резултати поменутих истраживања показују да **5CQA** подлеже израженом метаболизму у организму, али исто тако *in vivo* истраживања претпостављају да мали део неразложене хлорогенске киселине доспева у крвоток.^{39,43} Наиме, трећина унете **5CQA** која се апсорбује може доспети у крвоток где испољава биолошку активност, док неапсорбована фракција испољава биолошку активност у дебелом цреву.

Механизми антиоксидативног дејства

Како би спречили настанак оксидативног стреса у организму, антиоксиданти могу да реагују са слободним радикалима преко различитих реакционих путева. Једно једињење може да испољава активност реагујући преко једног или више различитих реакционих путева. Реакциони механизми преко којих једињења најчешће испољавају антиоксидативну активност су:

- Пренос водониковог атома - *Hydrogen Atom Transfer* (HAT),
- Протоном купловани пренос електрона - *Proton Coupled Electron Transfer* (PCET),
- Образовање радикалског адукта – *Radical Adduct Formation* (RAF),
- Губитак протона праћен губитком електрона – *Sequential Proton Loss Electron Transfer* (SPLET),
- Пренос електрона праћен преносом протона – *Single Electron Transfer - Proton Transfer* (SET-PT),
- Губитак протона праћен преносом водониковог атома – *Sequential Proton Loss Hydrogen Atom Transfer* (SPLHAT).

Уколико антиоксидант донира водоников атом слободном радикалу, онда се ради о HAT механизму. Реакција (1) илуструје овај механизам:



У реакцији настаје стабилнији ArO^\bullet и вероватноћа да он даље реагује са иницијалним супстратом је знатно мања. HAT механизам је доста испитиван и представља један од кључних механизма преко којих полифеноли испољавају антиоксидативну активност.⁴⁴

PCET механизам описује следећа феноксил/фенол реакција:⁴⁵



У овој реакцији се ствара комплекс између -ОН групе фенола и слободног електронског пара на кисеонику одговарајућег феноксил радикала. У следећој фази се протон са фенола преноси на слободни електронски пар радикала, док се електрон из слободног електронског пара фенола преноси у SOMO (*Singly Occupied Molecular Orbital*) орбиталу радикала.

Кључна структурна особина антиоксиданта неопходна да би испољавао активност преко RAF механизма (реакција (3)) је присуство вишеструких веза. У овој реакцији настаје радикалски адукт – [ArOH-R][•] који је знатно мање реактиван од почетног слободног радикала.



Важни фактори за одвијање овог реакционог пута су још и изражена електрофилност слободног радикала, као и повољни стерни ефекти.

Испољавање антиоксидативне активности преко SPLET механизма први су предложили Литвиниенко (Litwinienko) и Инголд (Ingold).⁴⁶ Може се представити следећим реакцијама:



Постоје бројни докази који се из дана у дан повећавају и који подупиру тврдњу да је овај механизам кључан у одбрани организма од оксидативног стреса. Показано је да овај механизам представља главни пут антиоксидативног дејства многих једињења у поларној средини.

SET-PT је механизам који се одиграва у два корака. Први корак обухвата пренос електрона (реакција (7)), док други корак обухвата депротонавање (реакција (8)):



SPLHAT механизам се такође одвија у два корака при чему прво долази до депротонавања, које затим прати пренос водониковог атома.



Ознаке ArOH , ArO^\bullet , $[\text{ArOH-R}]^\bullet$, ArO^- , $\text{ArOH}^{\bullet+}$, $\text{ArOH}^{\bullet-}$ се односе на фенол, радикал, радикалски адукт, анјон, радикалкатјон и радикаланјон изведен из тог фенола, док се R^\bullet и R^- односе на присутан радикал и његов анјон.

Преко којег механизма ће неко једињење да остварује антиоксидативну активност зависи од структуре и особина антиоксиданта и слободног радикала, али и од средине у којој се инетракција дешава.^{47,48}

Протокол за рачунање релативне антиоксидативне активности

Постоји мноштво експерименталних тестова који служе за одређивање антиоксидативног капацитета.⁴⁷⁻⁴⁹ Неки од њих су:

- ❖ DPPH (*2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl*)
- ❖ FCR (*Folin- Ciocâlțeu Reagent*)
- ❖ FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- ❖ ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- ❖ TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
- ❖ ABTS (*2,2'-Azino-bis(3-ethylBenzoThiazoline-6-Sulphonic acid)*)
- ❖ TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

У ORAC и TRAP тестовима главни реакциони механизам који је заступљен је НАТ. У FRAP тесту учествују механизми у којима се јављају реакције преноса електрона. У случају TEAC и DPPH тестова поред ових механизма укључен је и НАТ механизам. При избору експерименталних тестова за одређивање редоследа антиоксидативне активности неког скупа једињења треба бити опрезан. На пример, глутатион је одличан антиоксидант, при чему своју активност оставарује преко НАТ механизма иако је слаб електрон донор.⁵⁰ У овом случају ORAC и TRAP тестови би били адекватни за процену антиоксидативне активности овог једињења, док би FRAP тест показивао да ово једињење није ефикасан антиоксидант.

Како су фенолна једињења углавном добри антиоксиданти, постоје тестови, као што је FCR, који се заснивају на мерењу укупног фенолног садржаја и директно га повезују са антиоксидативним капацитетом. Међутим, нису сви феноли једнако ефикасни у уклањању слободних радикала, а тестови не могу да разликују и идентификују који је међу њима више, а који мање ефикасан.

Узимајући све наведено у обзир, веома је тешко, ако не и немогуће, да се пронађе јединствена метода помоћу које би се тачно и квантитативно измерио антиоксидативни капацитет једињења и добијени резултат упоредио са другим антиоксидантима. На недостатак универзалног теста за одређивање антиоксидативног капацитета указали су Приор (Prior),⁴⁸ као и Франкел (Frankel) и Мејер (Meyer) говорећи: „Постоји велика потреба за стандардизовањем тестова за одређивање антиоксидативне активности како би се смањио тренутни хаос изазван бројним различитим методологијама које се користе у те сврхе.“⁵¹

Како је компјутерска моћ у последњим деценијама драстично порасла, могуће је помоћу разноврсних компјутерских прорачуна добити поуздане резултате уз разумне компјутерске трошкове за молекуле мале и средње величине. Имајући то у виду, јавила се идеја да се осмисли методологија која се заснива на компјутерским прорачунима, а има за циљ проналажење универзалног и квантитативног начина за процену антиоксидативне активности неког једињења. Галано (Galano) и Алварез Идабој (Alvarez Idaboy) 2013. године осмислили су један такав протокол који су назвали тест за процењивање укупне антиоксидативне активности заснован на квантно механичким прорачунима (*Quantum Mechanics-based test for Overall free Radical Scavenging Activity (QM-ORSA)*).⁵² Протокол подразумева термодинамичко и кинетичко испитивање свих могућих механизма и укључује различите аспекте који могу да утичу на антиоксидативни капацитет. Међутим, примена оваквог протокола не може да укључи сву комплексност биолошког окружења или свих компонената хране. Аутори наводе да је циљ студије да обезбеди довољно информација о антиоксидативном капацитету појединачних компонената, а не природних производа који су комплексне смеше великог броја различитих једињења. При томе би се идентификовале компоненте које поседују највећу активност и које би могле да послуже за добијање лекова и хране који садрже само најактивнија једињења која су присутна у природним производима. Ово би могла да буде корисна терапија у случајевима када је организам изложен значајном оксидативном стресу и када није могуће да се путем исхране унесе неопходна количина антиоксиданата.

Дакле, QM-ORSA методологија је осмишљена тако да:

- ❖ идентификује главне реакционе механизме одговорне за антиоксидативну активност неког једињења, у зависности од природе средине и од рН;
- ❖ процени засебно антиоксидативну активност у поларним и неполарним растварачима;

- ❖ даје две мере за квантификовање: апсолутну (засновану на рачунању укупне константе брзине) и релативну (тролокс (trolox, **Tx**) се користи као референтни антиоксидант);
- ❖ омогући успостављање редоследа активности у серији антиоксиданата;
- ❖ идентификује најефикасније антиоксиданте и структурне особине одговорне за њихову активност како би помогла у осмишљавању фармаколошких стратегија за одбрану од оксидативног стреса.

Општи принципи

Најпре треба изабрати поуздану теоријску методу. За ове сврхе највише се користе методе теорије функцијала густине (*Density Functional Theory*, DFT), и то LC-xPBE, M06-2X, BMK, B2PLYP, M05-2X и MN12SX. Издвојене методе су посебно атрактивне за QM-ORSA протокол јер је познато да дају поуздане резултате у кинетичким истраживањима која представљају центални део ове методологије.⁵³ Од базисних скупова препоручују се они који садрже поларизационе и дифузне функције додате како на тешке атоме тако и на атоме водоника. У обзир треба узети и ефекте растварача. Солватациони модели, као што су CPCM (*Conductor-like Polarizable Continuum Model*) и SMD (*Solvation Model based on Density*), погодни су за коришћење приликом испитивања особина антиоксиданата у биолошким условима. За поређење активности различитих антиоксиданата неопходно је да се у израчунавањима користи исти теоријски модел. Из истих разлога, неопходно је испитивати реакције са истим слободним радикалом. Следећи корак представља испитивање свих могућих реакционих путева у којима учествују испитивани антиоксидант и изабрани слободни радикал. С обзиром на то да су HAT (реакција (1)), RAF (реакција (3)), SPLET (реакције (4) – (6)) и SET-PT (реакције (7) и (8)) механизми преко којих антиоксиданти најчешће реагују, QM-ORSA протоколом је предвиђено да је довољно испитивати реакционе путеве који се јављају у тим механизмима. Испитивање свих могућих реакционих путева за сва четири реакциона механизма може бити врло тежак задатак посебно ако се ради о антиоксиданту који може да реагује преко више механизма, у више различитих положаја и чија је структура комплексна. Зато је предложена следећа стратегија: најпре се испитује који од ових реакционих путева су термодинамички повољни, а затим се само они даље испитују и кинетички.

Термодинамичка испитивања

Израчунавање термодинамичких података има предност јер пружа могућност испитивања разноликих процеса хватања слободних радикала независно од хемијске природе тих процеса. Било који механизам може да се испитује на овај начин уз једноставно укључивање ефеката средине, као што су солватациони ефекти.

Термодинамичка испитивања подразумевају да се за све могуће реакционе путеве рачуна слободна енергија реакције ($\Delta_r G$). Уколико су реакције егзергоне или изоергоне ($\Delta_r G \leq 0$) даље се испитују кинетички, тј. рачунају се прелазна стања (уколико постоје) и одређују константе брзине тих реакција.

Овај поједностављени приступ се заснива на претпоставци да, уколико има ендергоних реакционих путева који доприносе антиоксидативној активности, они ће бити реверзибилни и самим тим производи тих реакционих путева неће бити опажени. Међутим, треба имати на уму да ендергоне реакције могу имати значајан допринос у случајевима када одговарајући производи тих реакција могу даље брзо да реагују. Ово је посебно важно у случајевима када су реакције које следе изражено егзергоне и када су енергије активације ових реакција мале. У таквим случајевима неопходно је укључити и кинетичко испитивање. Пример за овакав случај је први корак SET-PT (реакција (7)) механизма. Благо позитивне $\Delta_r G$ вредности одговарају великим вредностима константи брзина. Међутим, могуће је да у овом случају јонски интермедијери брзо реагују. Исто тако, производи настали у реакцијама преноса електрона су удаљени једни од других и могу да реагују са другим молекулима у окружењу, што може да води до иреверзибилног процеса. Из ових разлога се у случају SET реакције препоручује даље кинетичко испитивање уколико су $\Delta_r G$ вредности позитивне, а мање од 40 kJ mol^{-1} .

Још један од изузетака је и случај у коме ниједан од реакционих путева није егзергон. Тада се даља кинетичка испитивања изводе са реакцијама које су најмање ендергоне.

Кинетичка испитивања

Кинетичка испитивања су подељена на два случаја. Један обухвата испитивање кинетике код реакција које се одвијају преко прелазних стања (*Transition States*, TS) као што је случај са НАТ и RAF (реакције (1) и (3)) механизмима. Други се односи на реакције које се не одигравају преко прелазног стања, као што је случај са SPLET и SET-PT (реакције (4) – (8)) механизмима. Све испитиване реакције су бимолекулске.⁵⁴ При испитивању константи брзина свих реакција, почетна тачка је Ајрингова (Eyring) једначина и 1M стандардно стање. У савременом испитивању кинетике у раствору, ова једначина, која се често назива и конвенционална теорија прелазног стања (*Transition State Theory* (TST)), најпогоднија је за интерпретацију температурске зависности константи брзина:

$$k_{\text{TST}} = \frac{k_{\text{B}}T}{h} \exp\left(-\Delta G_{\text{a}}^{\ddagger}/RT\right) \quad (11)$$

У једначини (11) k_{B} и h представљају Болцманову (Boltzman) и Планкову (Planck) константу, док $\Delta G_{\text{a}}^{\ddagger}$ означава енергију активације.

У случају НАТ и RAF механизма у Ајрингову једначину се укључују два параметра: дегенерисаност реакционог пута (σ) и трансмисиони коефицијент $\gamma(T)$, тако да једначина поприма следећи облик:

$$k_{\text{ZCT-0}} = \sigma\gamma(T) \frac{k_{\text{B}}T}{h} \exp\left(-\Delta G_{\text{a}}^{\ddagger}/RT\right) \quad (12)$$

Дегенерисаност реакционог пута подразумева број еквивалентних реакционих путева, тј. да реакција може да се одигра на више различитих, али еквивалентних начина. Полак (Pollak) и Печукас (Pechukas) су показали да је σ једнака односу ротационих симетријских бројева реактаната (R) и прелазног стања (TS):⁵⁵

$$\sigma = \frac{\sigma_{\text{rot,R}}}{\sigma_{\text{rot,TS}}} \quad (13)$$

У једначини (13) $\sigma_{\text{rot,R}}$ представља симетријски ротациони број реактаната, док $\sigma_{\text{rot,TS}}$ представља симетријски ротациони број прелазног стања. За реакцију која укључује више од једног реактанта, $\sigma_{\text{rot,R}}$ једнак је производу ротационих симетријских бројева свих учесника у реакцији:

$$\sigma_{\text{rot,R}} = \prod_{i=1}^n \sigma_{\text{rot,R}^i} \quad (14)$$

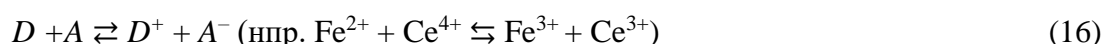
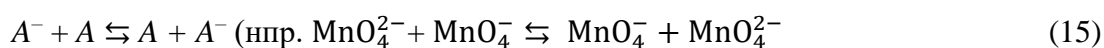
У трансмисиони коефицијент су укључени различити ефекти, од којих је најважнији тунелски ефекат. Наиме, код реакција у којима се одвија прелаз лаких честица (као што је НАТ) може да дође до продирања кроз енергетску баријеру, што води до повећања константи брзина.

За рачунање k_{ZCT-0} користи се Екартова (Eckart) метода, која се још назива и ZCT-0 (*Zero-Curvature Tunneling-0*).⁵⁶ Ово је специјални случај ZCT (*Zero-Curvature Tunneling*) методе, у којем се користи Екартова функција за рачунање криве потенцијалне енергије. Као и у теорији прелазних стања, за рачунање помоћу ових метода неопходна је само информација о стационарним тачкама, дакле о реактантима, прелазним стањима и производима.

Треба нагласити да су, за разлику од ZCT методе, $\gamma(T)$ вредности добијене Екартовом методом углавном прецењене на ниским температурама. Међутим, на собној температури (или температури тела) Екартове $\gamma(T)$ вредности су веома сличне резултатима добијеним помоћу прецизније апроксимираних метода, попут SCT (*Small Curvature Tunneling*) методе, док у истим условима ZCT метода потцењује ове вредности.⁵⁴ У сваком случају, обе методе, Екартова и ZCT, погодне су за израчунавање тунелских корекција у QM-ORSA методологији, када се константе брзине рачунају помоћу конвенционалне теорије прелазног стања.

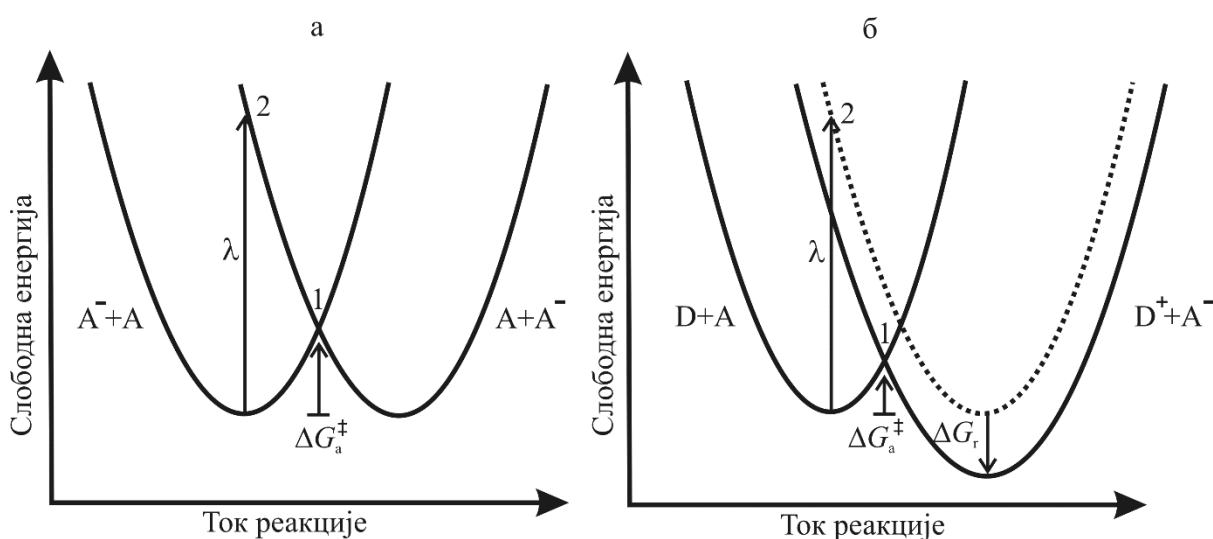
У случају SPLET и SET-PT (реакције (4) – (8)) механизма за процењивање енергије активације код реакција прелаза електрона користи се Маркусова (Marcus) теорија.⁵⁷

Средином прошлог века хемичари су располагали експерименталном техником за одређивање брзине реакција код којих се догађа само прелаз електрона. Међутим, нису могли да објасне велике разлике у брзинама тих реакција. Одговор на ово питање дао је Маркус. Узмимо за пример две једноставне реакције у којима долази до преноса електрона:



Ни у једној од приказаних реакције не дешава се ни раскидање ни образовање веза, али губитак или долазак електрона ипак доводи до малих структурних промена. Молекули растварача мењају свој положај, а хемијске везе се издужују и скраћују. Ова суптилна промена у структури захтева одређену енергију, која се назива енергија реорганизације λ .

Промене слободне енергије у реакцијама 15 и 16 су приказане на Слици 9. Гибсова енергија реактанта у равнотежном положају је представљена као најнижа тачка параболе на левој страни, док је Гибсова енергија производа у равнотежном положају представљена као најнижа тачка параболе на десној страни (Слика 9а). Пресек ових параболоа је у тачки 1. Повлачењем вертикалне праве, која креће из најниже тачке параболе реактанта и пресеца параболу производа, добијамо тачку пресека 2. На Слици 9б су приказане параболе замишљених (тачкаста линија) и реалних производа (пуна линија). Замишљени производи би енергетски одговарали реакцијама самоизмене. Међутим, у реакцији 16 долази до ослобађања енергије, што се огледа у спуштању параболое производа за износ $\Delta_r G$.



Слика 9. Промене Гибсове енергије у реакцијама 15 (а) и 16 (б). λ , ΔG_a^\ddagger и $\Delta_r G$ се односе на енергију реорганизације, енергију активације и ослобођену енергију.

Маркус је успешно израчунао енергију активације ΔG_a^\ddagger , као и енергију реорганизације λ . Енергетска баријера се израчунава као разлика Гибсове енергије тачке пресека 1 и најниже тачке параболе реактанта. Енергија реорганизације представља разлику између Гибсове енергије тачке пресека 2 и најниже тачке параболе реактанта. Маркус је такође установио да енергетска баријера може да се израчуна на основу следећег израза:

$$G_a^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta_r G}{\lambda} \right)^2 \quad (17)$$

Уколико одредимо ΔG_a^\ddagger , лако се израчунава и брзина реакције V :

$$V = v \exp\left(\frac{-\Delta G_a^\ddagger}{k_B T}\right) \quad (18)$$

где је T ознака за термодинамичку температуру, а предекспоненцијални фактор ν је ознака за вибрациону фреквенцију атома око равнотежних положаја. Како енергија реорганизације зависи од вибрационих и солватационих ефеката, очекивано је да се од реакције до реакције λ , као и ΔG_a^\ddagger , веома разликују. Из тог разлога се јављају и разлике у брзинама код различитих реакција преноса електрона.

Уколико је $\Delta_r G$ као у случају реакције 15 (Слика 9а), једначина (17) се упрошћава до формуле:

$$\Delta G_a^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \quad (19)$$

У случајевима у којима је $\Delta_r G \neq 0$, енергију активације одређујемо по формули:

$$\Delta G_a^\ddagger = \frac{(\lambda + \Delta_r G)^2}{4\lambda} \quad (20)$$

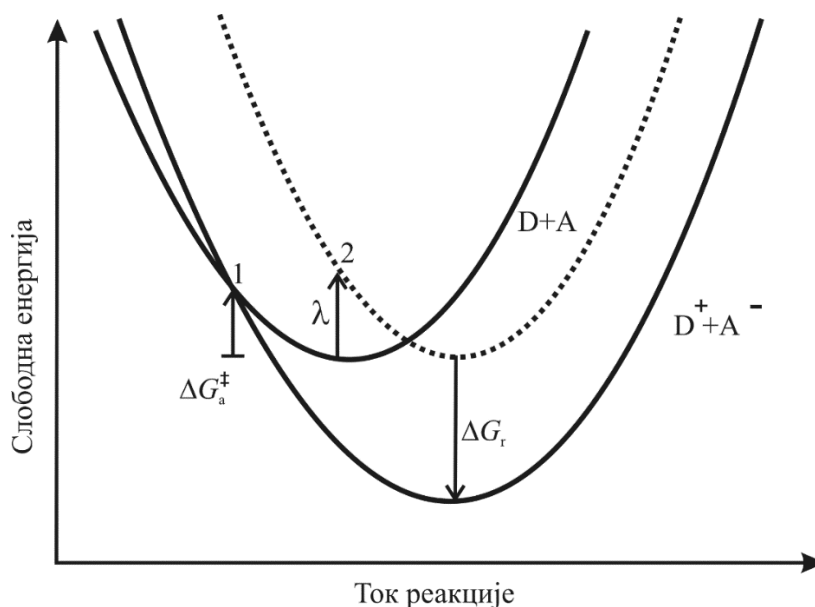
Када је реакција умерено егзергона (као што је случај са реакцијом 16, Слика 9б) негативније вредности за $\Delta_r G$ условљавају да се ΔG_a^\ddagger смањује, што указује на то да се реакција убрзава. Уколико је $-\Delta_r G = \lambda$ тада је $\Delta G_a^\ddagger = 0$, што значи да ће брзина реакције преноса електрона бити максимална. Међутим, уколико $\Delta_r G$ постане још негативније ($-\Delta_r G > \lambda$), онда долазимо до изненађујуће појаве коју је Маркус назвао „обрнута област“ (*inverted region*). Све негативније вредности за слободну енергију реакције у обрнутој области доводе до поновног повећања енергетске баријере (Слика 10), што указује на то да ће се реакција преноса електрона успоравати. Ова важна претпоставка је и експериментално потврђена.⁵⁸

Мартинез (Martínez) и сараднице⁵⁹ су развиле апроксимацију за одређивање енергије реорганизације λ .^{60,61} Мексичке научнице су установиле да је:

$$\lambda \approx \Delta E - \Delta_r G \quad (21)$$

где је ΔE заправо разлика између укупне енергије вертикалних производа и реактанта. Вертикални производ се може добити на основу оптимизоване структуре реактанта, при чему се на одговарајући начин измени наелектрисање и мултиплицитет спина, и уради се прорачун енергије у једној тачки (*single point energy*). На пример, за други корак SPLET механизма (реакција (5)) вертикални производ ArO_v^\bullet можемо добити из оптимизоване структуре реактанта ArO^- тако да му наелектрисање променимо из -1 у 0, а мултиплицитет спина из 1 у 2 (Слика 11).⁶² То значи да ће структуре ArO^- и ArO_v^\bullet бити идентичне, али ће бити разлике у вредности за укупну енергију. Слично, вертикални производ R_v^- се може добити из оптимизоване структуре реактанта R^\bullet тако

што ћемо наелектрисање променити из 0 у -1, а мултиплицитет спина из 2 у 1. Из реактанта ArO^- се такође може добити и адијабатски производ ArO^\bullet (Слика 11). За добијање овог производа, уз промену наелектрисања и мултиплицитета спина, неопходна је и оптимизација структуре. Приликом оптимизације укупна енергија достиже минималну вредност која одговара најнижој тачки на параболи производа.



Слика 10. Енергетске промене у обрнутој области ($-\Delta_r G > \lambda$).

Дакле, ΔE се израчунава на основу следећег израза:

$$\Delta E = [E(\text{ArO}_v^\bullet + E(\text{R}_v^-))] - [E(\text{ArO}^-) + E(\text{R}^\bullet)] \quad (22)$$

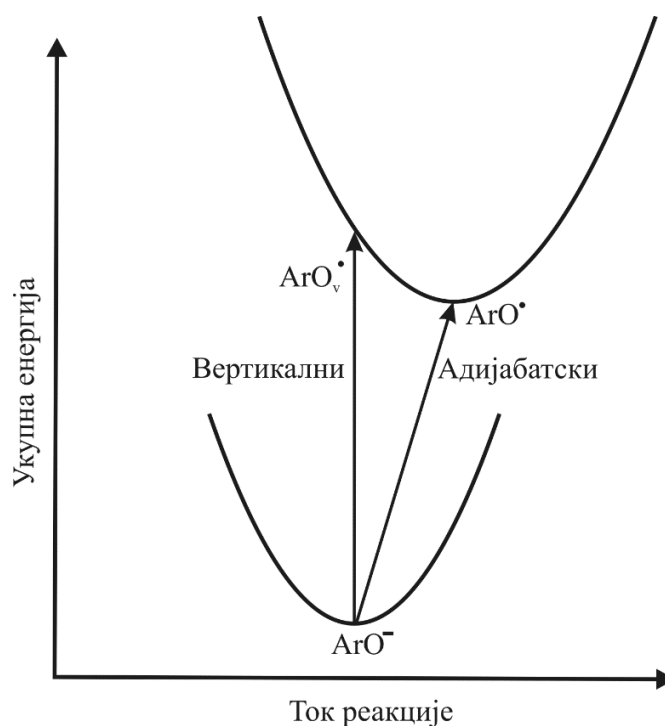
У неким случајевима константе брзине, које су израчунате тако што се једначина (17) уврсти у једначину (12), сличне су вредностима за константе брзина које се добијају за дифузијом контролисане реакције. Према томе, није могуће да се установи да ли је реакција преноса електрона контролисана дифузијом или се одвија преко енергетске баријере. Дакле, из теорије прелазног стања се не могу директно добити константе брзине за реакције прелаза електрона. За решавање овог проблема примењује се Колинс-Кимбалова (Collins-Kimball) теорија:⁶³

$$k = \frac{k_D k_{\text{TST}}}{k_D + k_{\text{TST}}} \quad (23)$$

У једначини (23) k_D означава константу брзине дифузије, а k означава привидну константу брзине (*apparent rate constant*). У Колинс-Кимбаловој теорији главна претпоставка се заснива на томе да се реакција одиграва на специфичном растојању α .

Специфично растојање се добија сабирањем полупречника реактаната (у нашем конкретном случају ArO^- и R^\bullet):

$$\alpha = \alpha_{\text{ArO}^-} + \alpha_{\text{R}^\bullet} \quad (24)$$



Слика 11. Енергетско поређење вертикалног и адијабатског производа.

Колинс-Кимбалова теорија се заснива на претпоставци Смолуховског (Smoluchowski). По овој претпоставци молекули представљају сфере које се не преклапају, али се поистовећују са Брауновим честицама које дифундују константом брзине k_D . Тада се k_D израчунава као:

$$k_D = 4\pi a D N_A \quad (25)$$

и представља константу брзине иреверзибилне бимолекулске дифузијом контролисане реакције.⁶⁴ У једначини (25) D означава узајамни дифузиони коефицијент реактаната, а N_A Авогадров број. По Труларовој претпоставци,⁶⁵ кретање два молекула (у конкретном случају ArO^- и R^\bullet) посматра се као дифундовање радикала R^\bullet у односу на ArO^- . Уколико се прихвати дата претпоставка, узајамни дифузиони коефицијент реактаната се може израчунати на основу Стоукс-Ајнштајновог приступа (Stokes-Einstein):^{66,67}

$$D_{\text{ArO}^-} = \frac{k_B T}{6\pi\eta\alpha_{\text{ArO}^-}} \quad D_{\text{R}^\bullet} = \frac{k_B T}{6\pi\eta\alpha_{\text{R}^\bullet}} \quad D = D_{\text{ArO}^-} + D_{\text{R}^\bullet} \quad (26)$$

У наведеним формулама η представља вискозност растварача.

Процена релативне антиоксидативне активности

Да би се одредила релативна антиоксидативна активност (r^T), најпре је потребно израчунати укупну константу брзине (k_{overall}) како испитиваног, тако и референтног једињења. Напоменуто је већ да се у QM-ORSA протоколу за референтно једињење узима **Тх**. Укупна константа брзине се рачуна на основу тоталне константе брзине (k_{TOT}), која је једнака збиру константи брзина свих реакционих путева за појединачну врсту у реакционом медијуму. У неполарним растварачима k_{overall} је једнако k_{TOT} . Међутим, у воденом раствору и на различитим рН вредностима ситуација није тако једноставна, јер је при овим условима могуће идентификовати више од једне кисело-базне форме антиоксиданта. Однос појединачних компоненти се може квантификовати и изразити молском фракцијом (f), која зависи од рН вредности средине и константе киселости испитиваног једињења. Тада се k_{overall} рачуна као збир свих k_{TOT} вредности помножених одговарајућом молском фракцијом.

Релативна антиоксидативна активност се рачуна на основу следећег израза:

$$r^T = \frac{k_{\text{overall}}}{k_{\text{overall}}^{\text{trolox}}} \quad (27)$$

где k_{overall} представља укупну константу брзине испитиваног антиоксиданта, док $k_{\text{overall}}^{\text{trolox}}$ представља укупну константу брзине **Тх**, израчунату под истим условима.

На основу k_{overall} вредности могуће је одредити релативну количину производа добијених реакцијом (*branching ratio*, Γ):

$$\Gamma_i = \frac{k(i)}{k_{\text{overall}}} \times 100 \quad (28)$$

где i представља одговарајући реакциони пут. Ова вредност је заправо једна од предности теоријске хемије јер нам обезбеђује и информацију о доприносу појединачног реакционог пута укупној антиоксидативној активности. На тај начин је могуће одредити који од оперативних механизма је доминантнији. Експерименталним путем је тешко добити те информације. Поред тога, рачунање Γ вредности може да предвиди споредне производе који настају у слободно радикалским процесима. Ово питање је кључно за предвиђање даље могуће судбине антиоксиданта у биолошким

системима. Узимајући у обзир да реактивност споредних производа може бити од велике важности, ово подручје је поприлично неиспитано. Потенцијална реактивност споредних производа према слободним радикалима и биолошки важним молекулима као што су липиди, протеини и DNA заслужују детаљнија испитивања.⁶⁸



НАШИ РАДОВИ

Циљеви дисертације

Постављени су следећи циљеви докторске дисертације:

- ❖ Утврђивање структуре хлорогенске киселине поређењем експерименталних и симулираних IR, Raman, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ и UV спектра;
- ❖ Термодинамичко испитивање могућих антиоксидативних механизма кафеоилхинских киселина коришћењем теорије функционала густине;
- ❖ Упоређивање антиоксидативне активности хлорогенске киселине са антиоксидативном активношћу њена два структурна изомера (неохлорогенска и криптохлорогенска киселина) и кафеинске киселине;
- ❖ Испитивање понашања хлорогенске киселине у реакцији са слободно радикалским врстама помоћу ESR спектроскопије;
- ❖ Термодинамичко испитивање могућих механизма антиоксидативног деловања хлорогенске киселине у присуству различитих слободно радикалских врста коришћењем теорије функционала густине;
- ❖ Кинетичко испитивање могућих механизма антиоксидативног деловања хлорогенске киселине у присуству хидроксил и метил пероксил радикала коришћењем теорије функционала густине;
- ❖ Одређивање реалтивне антиоксидативне активности хлорогенске киселине у растварачима различите поларности (бензен, пентил етаноат и вода).

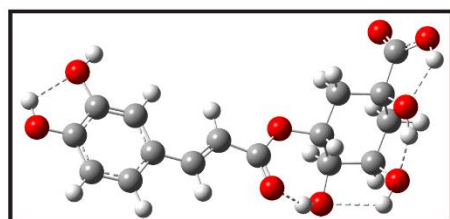
Структурне особине хлорогенске киселине

Иако је **5CQA** полифенолно једињење које је широко заступљено у исхрани и познато је по својим фармаколошким и нутритивним својствима, структурне особине овог једињења још увек нису потпуно разјашњене. Наиме, **5CQA** се налази у облику белог праха. Према нашим сазнањима, анализа праха помоћу дифракције X-зрака није урађена, тако да њена структура у чврстом стању није позната. Што се тиче структуре у раствору, она је недавно одређена и то захваљујући резултатима из ове дисертације,⁶⁹ као и експерименталним резултатима Форина (Forino) и његових сарадника.⁷⁰

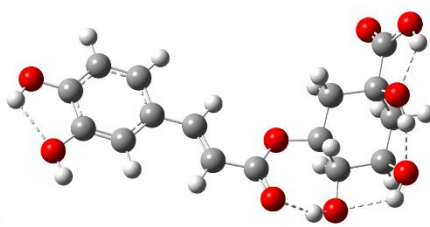
Конформациона анализа

С обзиром на то да **5CQA** може да заузме много конформација, први задатак је био да се уради конформациона анализа како би се одредили најстабилнији конформери у гасовитом стању и у раствору (метанол и DMSO).^{69,71} За те сврхе коришћена је MMFF (*Merck Molecular Force Field*) метода у комбинацији са Monte-Carlo рутином при чему је добијено укупно 1089 могућих ротамера **5CQA** у гасовитој фази. Након пажљивог прегледања свих конформера и искључивања дупликата, као и конформера чија је енергија за око 40 kJ mol^{-1} већа од енергије глобалног минимума, направљена је серија од 244 конформера. Како би се преуредио редослед стабилности ротамера добијених помоћу молекулско механичке методе, која је позната по томе да даје непоуздана енергетска предвиђања, ротамери су подвргнути квантно механичким прорачунима. Све структуре су најпре оптимизоване (без фреквенционог рачуна) у гасовитој фази на ниском нивоу теорије (B3LYP/6-31G(d)) како би се умањили компјутерски трошкови. Одабрано је двадесет најстабилнијих конформера и њихове структуре у гасовитој фази и у раствору су поново оптимизоване уз присуство фреквенционог рачуна на вишем нивоу теорије помоћу четири различите методе: B3LYP-D2,⁷¹ B3LYP-D3,⁶⁹ M06-2X⁶⁹ и MN12-SX⁷² у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом.

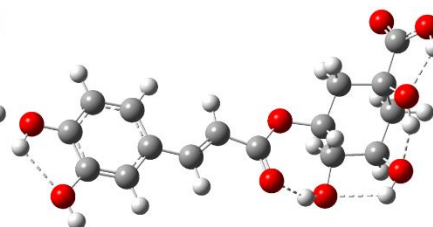
Као што је и очекивано, редослед стабилности ротамера у гасовитој фази се разликује од редоследа у раствору, док је редослед стабилности у растварачима сличне поларности готово идентичан (Слика 12).



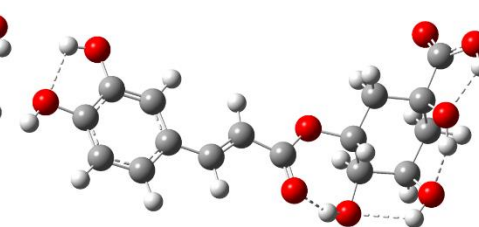
1: 0.0 kJ mol⁻¹
 0.4 kJ mol⁻¹
 0.3 kJ mol⁻¹



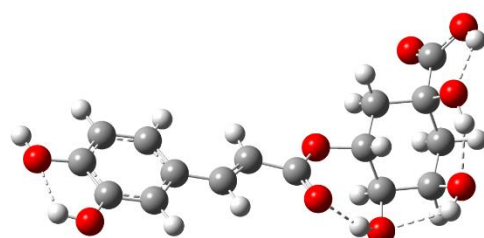
2: 0.6 kJ mol⁻¹
 0.6 kJ mol⁻¹
 0.6 kJ mol⁻¹



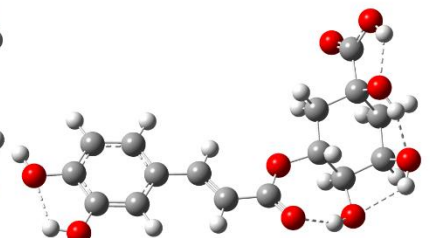
3: 0.9 kJ mol⁻¹
 2.1 kJ mol⁻¹
 2.0 kJ mol⁻¹



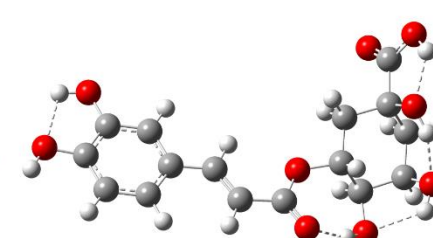
4: 2.0 kJ mol⁻¹
 2.2 kJ mol⁻¹
 2.1 kJ mol⁻¹



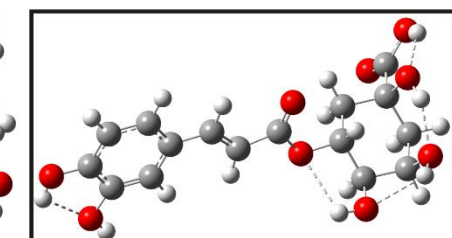
5: 2.6 kJ mol⁻¹
 2.5 kJ mol⁻¹
 2.4 kJ mol⁻¹



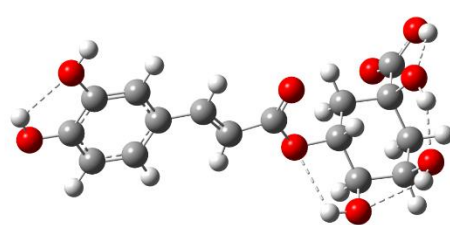
6: 2.7 kJ mol⁻¹
 0.8 kJ mol⁻¹
 0.8 kJ mol⁻¹



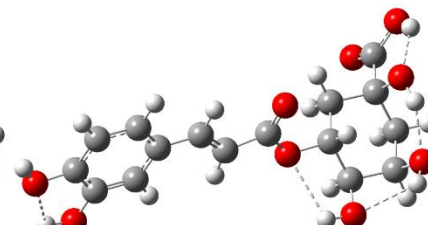
7: 3.8 kJ mol⁻¹
 2.0 kJ mol⁻¹
 2.0 kJ mol⁻¹



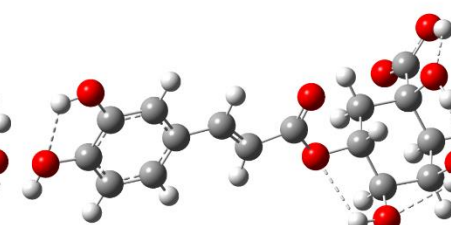
8: 4.8 kJ mol⁻¹
 0.0 kJ mol⁻¹
 0.0 kJ mol⁻¹



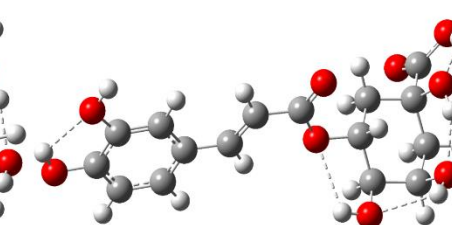
9: 4.8 kJ mol⁻¹
 0.4 kJ mol⁻¹
 0.4 kJ mol⁻¹



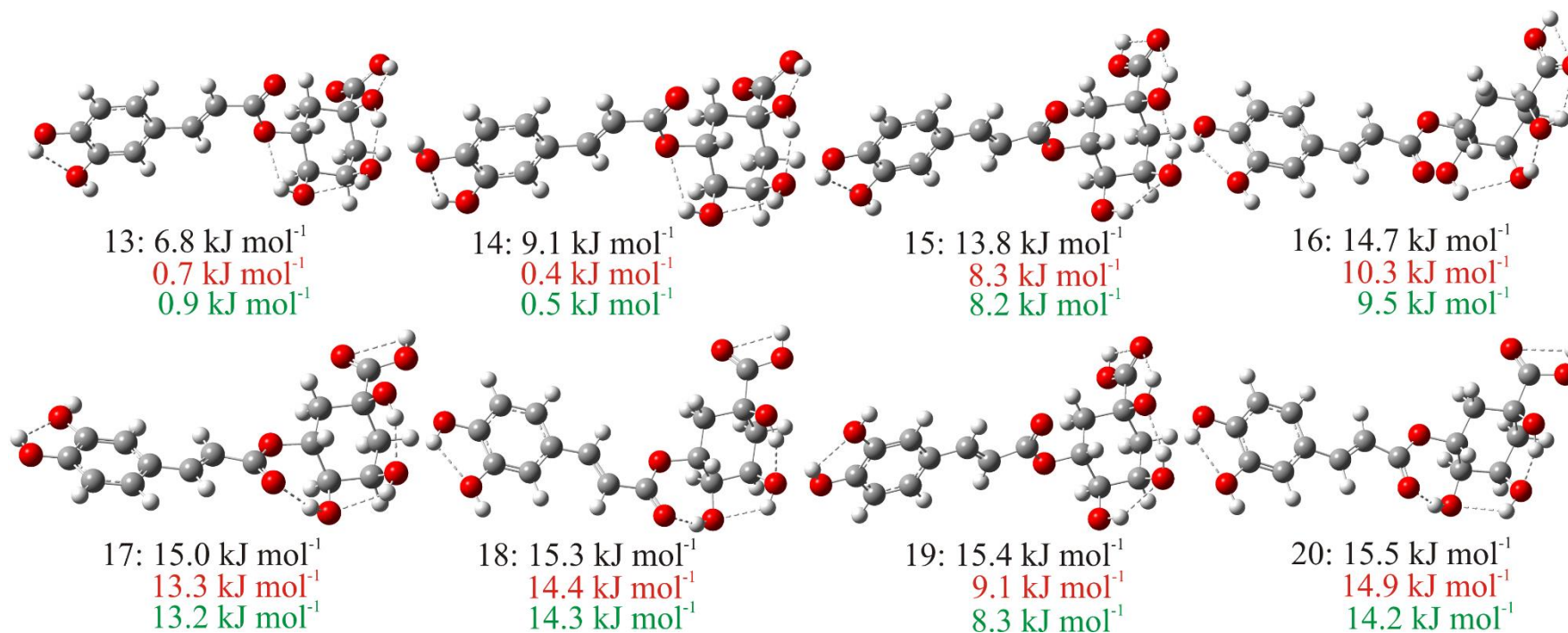
10: 5.9 kJ mol⁻¹
 1.2 kJ mol⁻¹
 1.2 kJ mol⁻¹



11: 6.1 kJ mol⁻¹
 0.5 kJ mol⁻¹
 0.5 kJ mol⁻¹

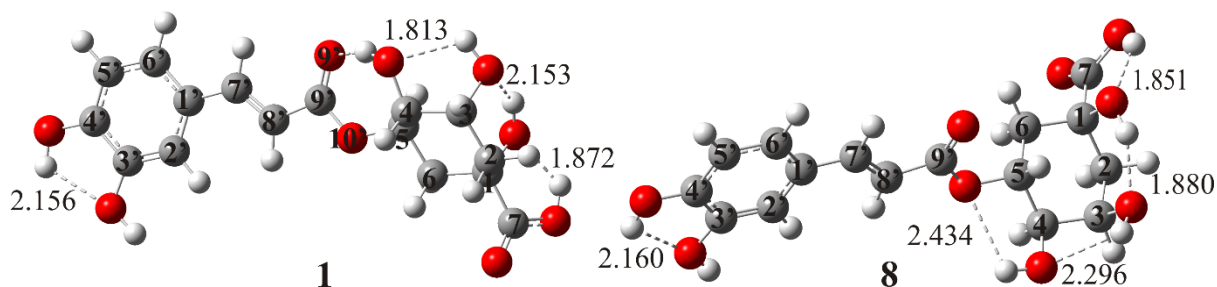


12: 6.5 kJ mol⁻¹
 0.2 kJ mol⁻¹
 0.3 kJ mol⁻¹



Слика 12. Двадесет најстабилнијих конформера хлорогенске киселине са назначеним вредностима за релативне слободне енергије (kJ mol⁻¹). Резултати су добијени на B3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоу теорије за гасовиту фазу (црна), DMSO (црвена) и метанол (зелена).

Важно је напоменути да се **5CQA** у гасовитој фази може наћи у три конформације, чија је међусобна разлика у стабилности мања од 1 kJ mol^{-1} (структуре **1**, **2** и **3** на Слици 12). У раствору постоји чак девет таквих конформера (структуре **8**, **12**, **1**, **9**, **14**, **11**, **2**, **13** и **6** на Слици 12). Наша истраживања указују на то да **5CQA** заправо постоји као комплексна смеша ових конформација. У гасовитој фази најстабилнији конформер садржи $\text{O4-H4}\cdots\text{O9}'$ водоничну везу, док у раствору преовладава структура са водоничном везом између $\text{O4-H4}\cdots\text{O10}'$ атома.



Слика 13. Оптимизоване геометрије најстабилнијих конформера хлорогенске киселине у гасовитој фази (**1**) и у DMSO растварачу (**8**) израчунате на B3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоу теорије. Дужине водоничних веза дате су у Å.

Све четири методе су дале потпуно исти најстабилнији конформер како у гасовитој фази (**1**), тако и у оба растварача (**8**). Оптимизоване геометрије најстабилнијих конформера су приказане на Слици 13 и њих ћемо мало више продискутовати. Како су резултати добијени за DMSO и метанол међусобно веома слични, дискусија ће се заснивати на резултатима за конформер **8** у DMSO-у. У оба конформера део структуре који потиче од кафеинске киселине одговара кристалној структури овог једињења.⁷³ **5CQA** има укупно пет водоничних веза, од којих је четири локализовано на хинском делу, док се преостала водонична веза налази на бензеновом прстену. Веома интересантна и неочекивана особина оба конформера је да карбоксилни водоник H8 није оријентисан ка карбоксилном кисеонику O7, него ка атому O1, тј. ка кисеонику суседне хидроксилне групе. Добијена структура најстабилнијег конформера **5CQA** у раствору идентична је структури коју су добили Форино и његови сарадници у деутерисаним CD₃OD, HDO и DMSO-d₆ растварачима помоћу следећих експерименталних метода: ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DQF-COSY, TOCSY, ROESY, HMBC и HSQC.⁷⁰ Важно је напоменути да је наша детаљна конформациона анализа потврдила резултате Форина и његових сарадника, и обрнуто, њихови експериментални резултати су потврдили способност савремених теоријских метода да квантификују суптилне разлике између конформера.

Са друге стране, резултати који се односе на гасовиту фазу не слажу се са резултатима Корнада (Cornard) и његових сарадника који тврде да је конформер **15** (Слика 12) најстабилнији конформер.⁷⁴ Закључак је донесен на основу испитивања које је вршено на скупу од 32 конформера, при чему конформер **1** није узет у обзир, а за испитивање је коришћен V3LYP/6-31+G(d,p) теоријски модел. Наши резултати добијени помоћу V3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоа теорије показују да је конформер **1** за 13.8 kJ mol⁻¹ стабилнији од конформера **15**, док разлика у слободним енергијама између ова два конформера израчуната помоћу V3LYP/6-31+G(d,p) нивоа теорије износи 12.7 kJ mol⁻¹.^{69,74} Наведена запажања указују да је неслагање резултата последица занемаривања значајног дела конформационог простора **5CQA** у случају када се разматрају само 32 структуре.

Електронска структура најстабилнијих конформера **1** и **8** је испитивана помоћу NBO (*Natural Bond Orbital*) анализе. Стављен је акценат на делокализацију електронске густине између слободних електронских парова на атомима кисеоника (попуњене NBO орбитале Луисовог (Lewis) типа) и антивезивних σ^* и π^* орбитала (формално празне не-Луисове NBO орбитале). Јачина донорско-акцепторских интеракција може се изразити помоћу пертурбационе теорије другог реда. Резултати су приказани у Табели 3.

NBO анализа показује да су атоми O7 и O9' sp хибридизовани, док су остали атоми кисеоника sp² хибридизовани. У Табели 3 се примећује и веома мала попуњеност р орбитала неких атома кисеоника: O8, O10', O7, O4', O9' и O3'. Оваква ситуација је последица израженог донирања електронске густине (манифестоване великим E(2) вредностима) из р орбитала у суседне π^* и σ^* антивезивне орбитале, што је у сагласности са уобичајеном представом хемијске структуре која у себи садржи C=C и C=O двоструку везу. У сагласности са тим и попуњеност у антивезивним орбиталама је значајно већа, док су парцијална негативна наелектрисања на одговарајућим атомима кисеоника мања у односу на атоме O1, O3 и O4.

За водоничне везе су карактеристичне донорско-акцепторске интеракције у којима се електронска густина донира из р и sp² орбитала атома кисеоника у суседне σ^* антивезивне Н-О, при чему су јачине ових веза пропорционалне вредностима енергије интеракције другог реда.

Уопштено гледано, интрамолекулске водоничне везе у конформеру **8** су слабије него у конформеру **1** (изузетак је O8–H8...O1 водонична веза), што указује на способност солватационог модела да опише утицај интермолекулских интеракција са молекулима растварача. И у гасовитој фази и у раствору, веома негативно

наелектрисани O1 и O3 атоми граде јаке O8–H8...O1 и O1–H1...O3 водоничне везе. Јачина водоничних веза се манифестује дужинама ових веза (< 1.9 Å, Слика 13), као и релативно високим E(2) вредностима (Табела 3). Овако јаке водоничне везе утичу на оријентацију хидроксилних група на хинском делу молекула, тако да у оба испитивана конформера **5CQA** четири водоничне везе формирају O–H...O ланац.

Табела 3. Фаворизоване донорско-акцепторске интерације у конформерима **1** (гасовито стање) и **8** (DMSO) добијене помоћу прорачуна на B3LYP-D3/6-311+G(d,p) нивоу теорије. Вредности за конформер **1** су дате у фонту Regular, а за конформер **8** у фонту *Italic*. E(2) се односи на енергију интеракције другог реда.

атом	NBO наелектрисање	попуњеност у донорској NBO	попуњеност у акцепторској NBO	E(2) kJ mol ⁻¹
O8	-0.669 (-0.679)	p, 1.795 (1.792)	π^*_{C7-O7} , 0.214 (0.215)	231.5 (188.1)
		p, 1.794 (1.802)	$\pi^*_{C9-O9'}$, 0.305 (0.297)	176.0 (178.0)
O10'	-0.655 (-0.577)	p, 1.802	σ^*_{O4-H4} , 0.008	2.7
		sp ² , 1.964		0.2
O7	-0.592 (-0.631)	p, 1.848 (1.858)	σ^*_{C7-O8} , 0.089 (0.085)	129.5 (124.6)
			σ^*_{C1-C7} , 0.092 (0.088)	83.1 (77.5)
O4'	-0.661 (-0.682)	p, 1.857 (1.863)	$\pi^*_{C4'-C5'}$, 0.372 (0.376)	122.3 (117.8)
			$\sigma^*_{C9'-O10'}$, 0.094 (0.102)	120.4 (137.1)
O9'	-0.665 (-0.650)	p, 1.847 sp, 1.970	$\sigma^*_{C8'-C9'}$, 0.051 (0.053)	70.8 (68.5)
			σ^*_{O4-H4} , 0.036	30.6
				14.3
O3'	-0.704 (-0.711)	p, 1.895 (1.888) sp ² , 1.977 (1.976)	$\pi^*_{C2'-C3'}$, 0.354 (0.349)	104.3 (108.7)
			$\sigma^*_{O4'-H4'}$, 0.010 (0.009)	3.7 (3.7)
O3	-0.780 (-0.784)	p, 1.947 (1.950) sp ² , 1.975 (1.972)	σ^*_{O1-H1} , 0.029 (0.028)	31.5 (30.8)
				10.7 (5.6)
O1	-0.800 (-0.802)	p, 1.945 (1.944) sp ² , 1.972 (1.975)	σ^*_{O8-H8} , 0.025 (0.026)	25.3 (27.4)
				6.0 (10.0)
O4	-0.779 (-0.767)	p, 1.947 (1.959) sp ² , 1.976 (1.980)	σ^*_{O3-H3} , 0.016 (0.009)	8.9 (2.0)
				1.7 (1.0)

У конформеру **1**, O–H...O ланац се завршава са још једном јаком водоничном везом: O4–H4...O9'. У конформеру **8** O–H...O ланац се завршава слабом O4–H4...O10' водоничном везом. Како конформери **1** – **14** у својој структури садрже један од ова два O–H...O ланца, јасно је да имају стабилизујући ефекат на систем. Према Болцмановој

формули $N_i + \sum_{j \neq i} \frac{N_j}{e^{\frac{G_j - G_i}{RT}}} = 1$, где G_i и N_i представљају слободну енергију и молску

фракцију i -тог конформера, преко 99% гасовите фазе, као и солватисане **5CQA**, садржи смешу конформера **1** – **14**.

Вибрациони спектри хлорогенске киселине

Узимајући у обзир да **5CQA** има шест хидроксилних група које имају значајни утицај на изглед вибрационих спектра, спектри су веома комплексни и садрже укупно 123 спектралних облика. Могуће је и да је комплексни изглед вибрационих спектра **5CQA** разлог због кога се IR спектар овог једињења није испитивао до сада. За симулацију IR и Raman-ског спектра коришћена је геометрија најстабилнијег конформера у гасовитој фази (**1**). Спектри су симулирани помоћу три методе: B3LYP-D3, M06-2X и MN12-SX у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом.^{69,71,72} С обзиром на то да вибрациони фактори скалирања за примењене три методе нису били доступни у литератури, израчунати су помоћу методе најмањих квадрата, а уз помоћ експерименталних резултата за IR спектар. Вибрациони фактори скалирања износе 0.951, 0.928 и 0.923 за три методе. Израчунате вредности за таласне бројеве су скалиране, и те вредности су коришћене за даља испитивања. Експерименталне и израчунате вредности таласних бројева, одговарајући вибрациони облици који се појављују у области од 4000 до 400 cm^{-1} , као и одговарајуће PED (*Potential Energy Distribution*) вредности приказане су у Табели 4. Приказани су само они вибрациони облици за које постоји одговарајућа експериментална вредност.

Табела 4. Експерименталне и израчунате вредности таласних бројева који се јављају у IR и Raman-ском спектру хлорогенске киселине, асигнација и интензитети вибрационих облика.

Асигнација вибрационих облика	ν_{IR} експ (cm^{-1})	ν_{Raman}	B3LYP- D3	M06- 2X изр (cm^{-1})	MN12- SX	PED (%)
ОН истезање (δ^+)	3624 j^{\ddagger}		3597	3576	3582	ν_{OH} (100)
ОН истезање (x)	3473 j		3453	3467	3500	ν_{OH} (90)
ОН истезање (x)	3348 j		3412	3441	3473	ν_{OH} (97)
СН истезање (a)		2984 c	2996	2988	2964	ν_{CH} (98)
СН истезање (x)	2953 c	2951 c	2957	2946	2929	ν_{CH} (84)
СО истезање (x)	1732 cj		1743	1759	1742	ν_{OC} (86)
СО истезање (a)	1690 vj	1690 c	1634	1657	1638	ν_{OC} (73)
СС истезање (b, a)	1639 vj	1632 j	1586	1590	1571	ν_{CC} (55)
СС истезање (b, a)	1602 j	1604 bj	1556	1563	1541	ν_{CC} (59)

НСС савијање (б) НОС савијање (б) ОСС савијање (б) ССС савијање (б)	1516 сј	1519 вс	1479	1469	1459	$v_{OC} (10) + \delta_{HCC} (43)$
СС истезање (б, а)	1443 ј	1443 сј	1406	1397	1389	$\delta_{HCC} (58)$
НОС савијање (х) НСС савијање (х)	1385 с	1374 с	1377	1356	1366	$\delta_{HOC} (55)$
НОС савијање (б) НСС савијање (б, а)	1323 с		1344	1331	1330	$v_{CC} (33) + \delta_{HOC} (30)$
НОС савијање (б, q) НСС савијање (х) НСО савијање (х)	1306 с	1316 вс	1335	1326	1325	$\delta_{HCC} (53)$
ССО савијање (х)	1289 ј	1286 сј	1328	1316	1324	$\delta_{HOC} (70)$
СОСН торзија (а) НССО торзија (х) ССОН торзија (х) НСОН торзија (х) СССН торзија (х)	1250 с	1252 с	1284	1265	1263	$\tau_{HOC} (27)$
НСО савијање (х) НСС савијање (х) НСС савијање (а)	1223 с		1246	1248	1257	$\delta_{HCO} (22)$
ОС истезање (б) СС истезање (б)	1189 сј	1189 сј	1246	1235	1240	$v_{OC} (49)$
НССО торзија (х) СССО торзија (х) ССОС торзија (х) ССОН торзија (х) ОССО торзија (х)	1158 с	1164 с	1164	1183	1172	$\delta_{HCO} (10)$
СС истезање (б, а)	1136 с		1153	1141	1141	$v_{CC} (25) + \delta_{HOC} (30)$
НСС савијање (а) НОС савијање (б) ОСО савијање (а) ССО савијање (а)	1112 с	1118 с	1137	1139	1135	$v_{OC} (33) + \delta_{HCC} (24)$
СС истезање (х)	1086 сј		1092	1101	1099	$v_{CC} (31)$
СС истезање (х)	1070 вс	1074 вс	1073	1087	1074	$v_{CC} (47)$
ОС истезање (х)	1036 сј		1034	1055	1045	$v_{OC} (61)$
СС истезање (а, х) ОС истезање (а, х)	998 с	999 вс	993	1004	992	$v_{CC} (42)$

НССО торзија (x)						
СССС торзија (x)						
СССО торзија (x)	976 c	980 вс	975	987	974	$v_{CC} (11)$
НОСС торзија (x)						
НССС торзија (x)						
НССС торзија (б, а)	971 сј		971	956	945	$\tau_{НССС} (72)$
СС истезање (б, а)	938 c		937	928	943	$v_{CC} (46)$
ОС истезање (б, а)						
ОС истезање (x)	908 c	920 вс	930	917	908	$v_{OC} (51)$
СС истезање (x)						
НСС савијање (x)	866 вс	861 вс	853	842	878	$v_{OC} (10) + v_{CC} (10) + \delta_{НСС} (12)$
НСС савијање (а)	852 c		844	838	864	$\tau_{НССО} (26) + \tau_{НССО} (10)$
НСС савијање (б)	817 j	821 вс	812	801	788	$\tau_{НССО} (32)$
НССО торзија (б)						
СССС торзија (б)	800 c		793	784	779	$\tau_{НССО} (67)$
НССС торзија (б)						
ОС истезање (б, x)	767 вс	770 вс	767	764	767	$v_{OC} (60)$
СС истезање (б, x)						
СС истезање (б, а)	715 вс		719	708	707	$\delta_{НСС} (12) + \tau_{НССО} (10)$
НСОН торзија (x)	676 c	677 вс	658	696	683	$\tau_{НСОН} (15) + \tau_{НОСС} (11) + \tau_{НССО} (10)$
НОСС торзија (x)						
НОСС торзија (x)	604 сј	598 вс	618	598	592	$\tau_{НСОН} (24) + \tau_{НОСС} (34)$
НСОН торзија (x)						
ССО савијање (б, x)						
ССС савијање (б, x)	561 c		568	562	579	$\delta_{ССО} (36)$
НСС савијање (б)						
НСОН торзија (x)						
НОСС торзија (x)		537 вс	541	533	527	$\tau_{НСОН} (13)$
СССС торзија (x)						
СССО торзија (x)						
НСС савијање (б)						
ССС савијање (б, x)	510 вс	513 вс	504	510	501	$\delta_{ССС} (28)$
ССО савијање (б, x)						

† б, а, и х се односе на бензенски део, ациклични ланац и хински део

‡ вј – веома јака, j – јака, сј – средње јака, c – слаба, вс – веома слаба

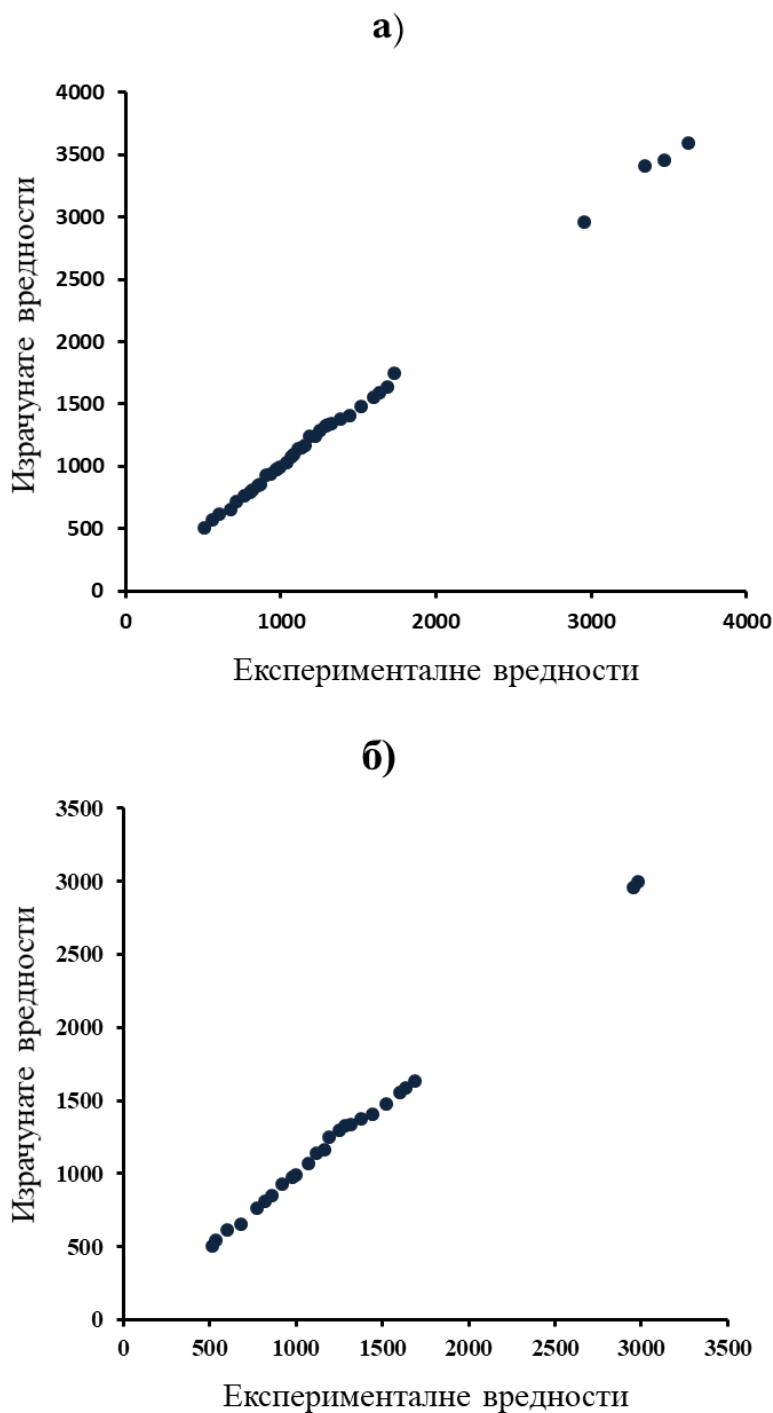
Упоредивање експерименталних и израчунатих вредности таласних бројева у Табели 4 указује да између њих постоји линеарна корелација. Квалитет линеарне корелације је одређен на основу три дескриптора: коефицијента корелације (R), просечне апсолутне грешке (*Average Absolute Error*, AAE) и просечне релативне грешке (*Average Relative Error*, ARE). Коефицијенти корелације за IR и Raman-ски спектар износе 0.9994 и 0.9990 у случају B3LYP-D3 методе (Слика 14), 0.9993 и 0.9992 у случају M06-2X методе и 0.9990 за оба спектра у случају MN12-SX методе.

У случају B3LYP-D3 методе AAE и ARE вредности за IR спектар износе 19.4 cm^{-1} и 1.5 %, док у случају Raman-ског спектра ове вредности износе 21.4 cm^{-1} и 1.8 %. Слична ситуација је и у случају M06-2X методе: AAE и ARE вредности за IR спектар износе 21.9 cm^{-1} и 1.6 %, док у случају Raman-ског спектра ове вредности износе 19.1 cm^{-1} и 1.6 %. AAE и ARE вредности добијене помоћу MN12-SX методе за IR спектар износе 24.3 cm^{-1} и 1.8 %, а за Raman-ски 23.2 cm^{-1} и 1.8 %. Све три вредности (R , AAE и ARE) показују да све три методе дају слично, веома добро слагање између експерименталних и симулираних вибрационих спектра, што указује на исправну асигнацију вибрационих облика (Слике 15 и 16). Резултати добијени за Raman-ски спектар су у веома доброј сагласности са већ постојећим резултатима који се могу наћи у литератури.⁷⁵

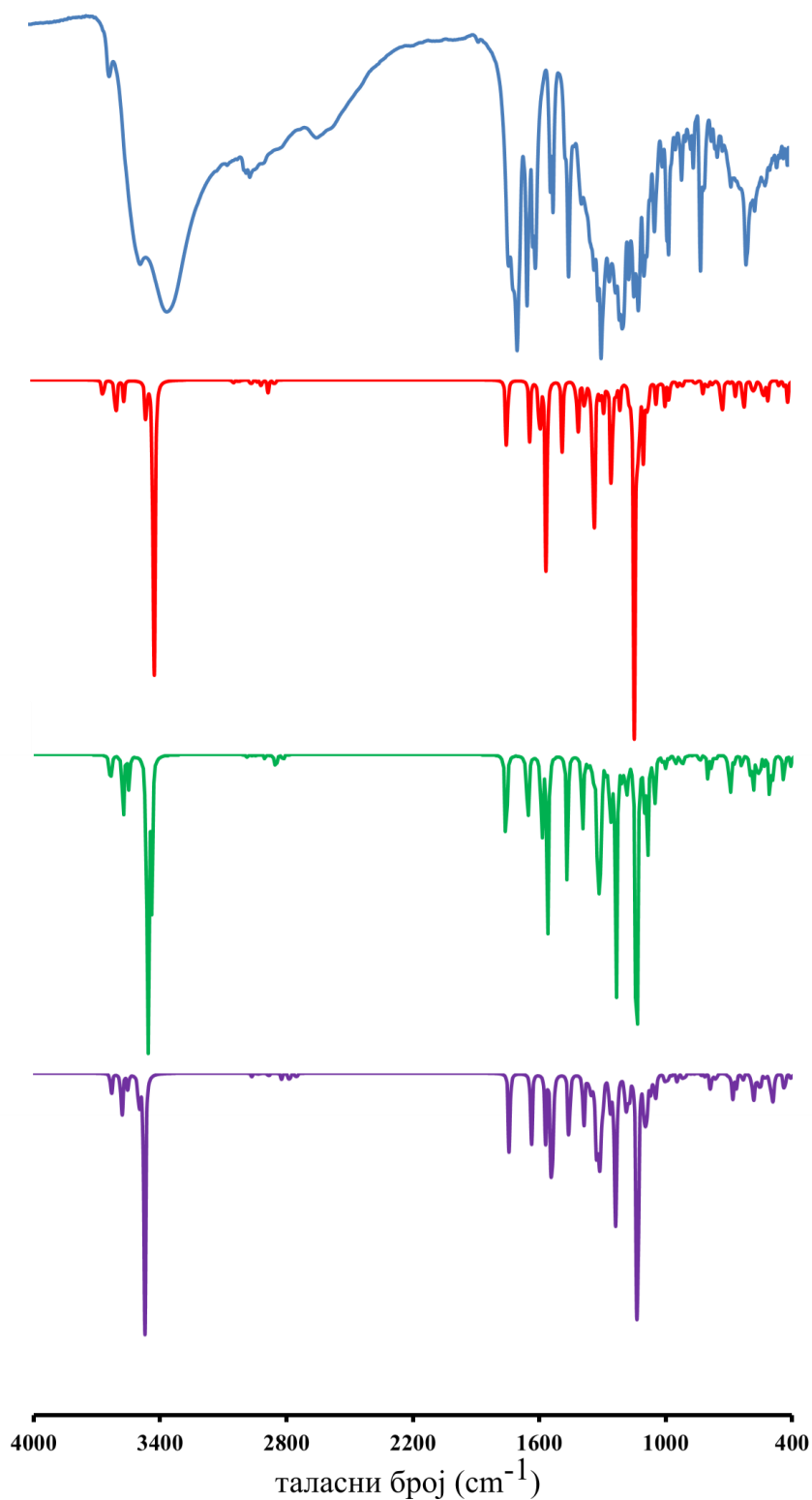
Највећа одступања у позицији трака која се јављају између израчунатог и експерименталног спектра свакако су последица тога што се при прорачунима у обзир узима изоловани молекули и тако се занемарују интермолекулске интеракције. Ове интеракције, пре свега интермолекулске водоничне везе, од велике су важности за особине реалног молекула **5CQA**, који је у чврстом стању. Из тог разлога су највећа одступања од експерименталних вредности уочена у случају поларних хидроксилних и карбонилних група (Табела 4).

Најизразитије траке се јављају у високо фреквентној области ($4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$) IR спектра молекула **5CQA** и оне се приписују различитим облицима ОН вибрација (Табела 4). У овом делу спектра су присутне веома масивне траке које се међусобно преклапају (Слика 15). Интензивне траке које се јављају на 3624 , 3473 и 3348 cm^{-1} могу се приписати ОН истезању различитих хидроксилних група. У области високих фреквенција се такође налазе траке које потичу од СН истезања на хинском делу и у ацикличном ланцу. Вибрациони доприноси нормалним истезајућим облицима (PED вредности у Табели 4) у области од $3624 - 2953 \text{ cm}^{-1}$ су скоро искључиво приписани

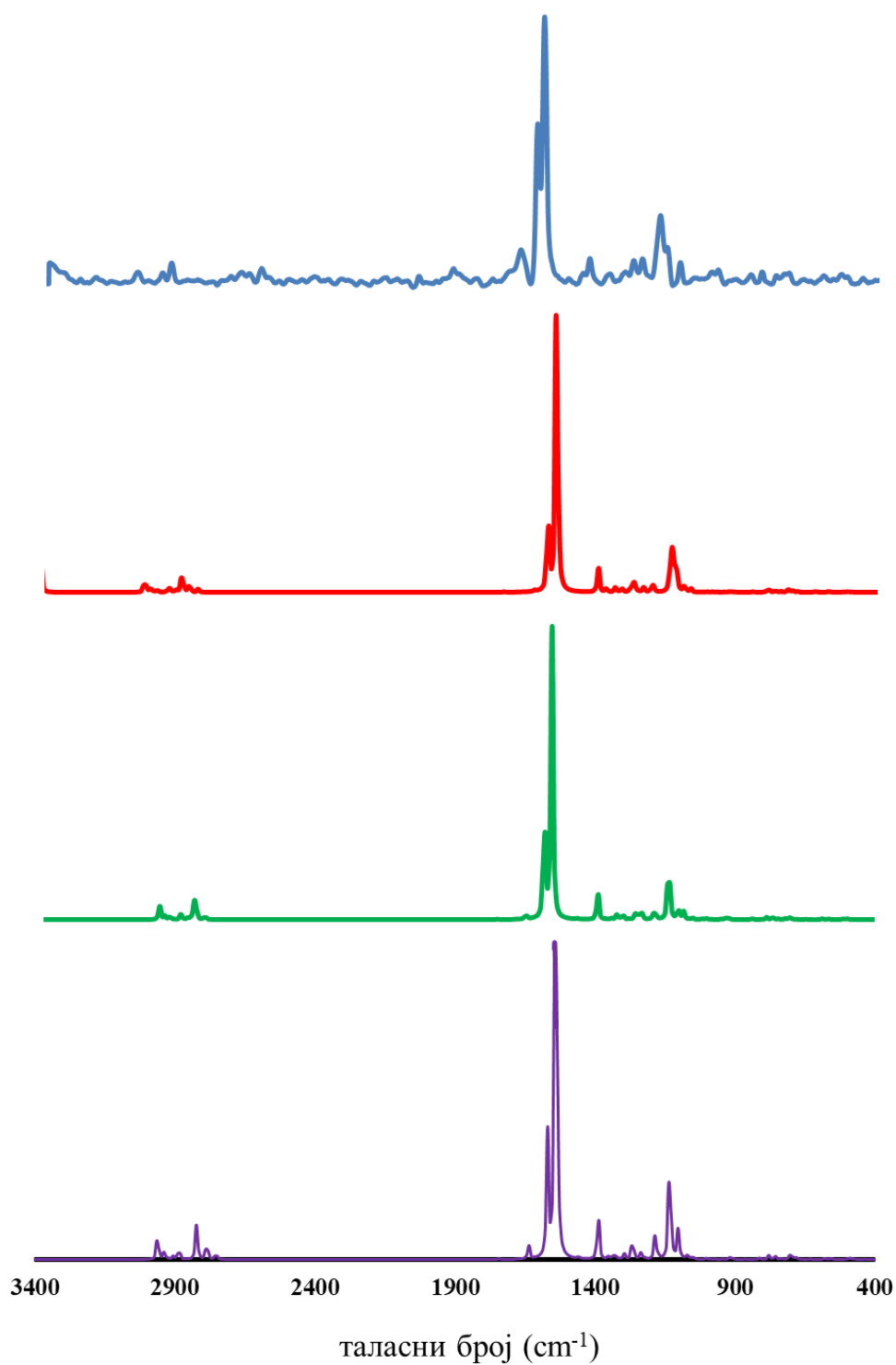
ОН и СН истежању (84–100 %), док остали облици представљају комбинацију различитих врста вибрација.



Слика 14. Корелација између експерименталних и израчунатих вредности таласних бројева (cm^{-1}) у IR (а) и Raman-ском (б) спектру добијених помоћу B3LYP-D3/6-311+G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311+G(d,p) и MN12-SX/6-311+G(d,p) теоријских модела су веома слични.



Слика 15. IR спектар хлорогенске киселине: експериментални (плава линија) и симулирани помоћу V3LYP-D3, M06-2X и MN12-SX метода (црвена, зелена и љубичаста).



Слика 16. Раман-ски спектар хлорогенске киселине: експериментални (плава линија) и симулирани помоћу B3LYP-D3, M06-2X и MN12-SX метода (црвена, зелена и љубичаста).

У области средњих до ниских фреквенција ($1800 - 500 \text{ cm}^{-1}$) у IR и Raman-ском спектру јављају се истакнуте траке. Траке средњег и јаког интензитета на 1732 (IR) и $1690 \text{ cm}^{-1} \text{ (IR)}$ одговарају CO истезању на хинском делу и у ацикличном ланцу. Такође, траке средњег и јаког интензитета на 1639 (IR) , 1632 (R) , 1604 (R) , 1602 (IR) , 1443 (IR, R) и $1189 \text{ (IR, R)} \text{ cm}^{-1}$, приписане су углавном CC истезању у бензеновом прстену и ацикличном ланцу. Траке које описују CC и CO истезање хинског дела се налазе на 1086 (IR) и $1036 \text{ (IR)} \text{ cm}^{-1}$. Траке јаког и средње јаког интензитета које се јављају на 1289 (IR) , 1286 (R) и $817 \text{ (IR)} \text{ cm}^{-1}$ одговарају различитом CCO, OCO и HCC савијању у свим деловима структуре **5CQA**. Трака средњег интензитета која одговара HCCC торзији на бензеновом и хинском прстену, као и у ацикличном ланцу, налази се на $971 \text{ (IR)} \text{ cm}^{-1}$.

Траке слабог (и веома слабог) интензитета које се јављају у IR и Raman-ском спектру на 1690 (R) , 1136 (IR) , 1074 (R) , 1070 (IR) , 999 (R) , 998 (IR) , 938 (IR) , 920 (R) и $908 \text{ (IR)} \text{ cm}^{-1}$ одговарају различитом CO и CC истезању на хинском делу, бензену и у ацикличном ланцу. Готово све HCCO, CCCC, HOCC, HCCC и HCOH торзионе вибрације у оба спектра (1252 (R) , 1250 (IR) , 1164 (R) , 1158 (IR) , 980 (R) , 976 (IR) , 800 (IR) , 677 (R) , 676 (IR) , 598 (R) и $537 \text{ (R)} \text{ cm}^{-1}$) су слабог или веома слабог интензитета. Траке слабог интензитета у IR и Raman-ском спектру уочене на 1519 (R) , 1385 (IR) , 1374 (R) , 1323 (IR) , 1306 (IR) , 1316 (R) , 1223 (IR) , 1112 (IR) , 1118 (R) , 866 (IR) , 861 (R) , 852 (IR) , 821 (R) , 513 (R) и $510 \text{ (IR)} \text{ cm}^{-1}$ приписане су комбинацији HCC, CCC, CCO, OCO, HCO и COH савијајућих вибрација које се јављају у свим деловима молекула.

NMR спектри хлорогенске киселине

^{13}C - и ^1H -NMR спектри у DMSO-у су симулирани помоћу B3LYP-D3, M06-2X и MN12-SX функционала у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом и CPCM солватационим моделом.^{69,71,72} Израчуната су хемијска померања за угљеникове и водоникове атоме у односу на тетраметилсилан (TMS). С обзиром на то да су тако добијене вредности углавном прецењене (сем у случају ^{13}C -NMR спектра израчунатог помоћу MN12-SX методе, где су поменуте вредности потцењене), вредности за хемијска померања су скалиране. Фактор скалирања је одређен методом најмањих квадрата и вредности за ^{13}C - и ^1H -NMR спектре су следеће: 0.937 и 0.932 (B3LYP-D3), 0.872 и 0.883 (M06-2X) и 1.066 и 0.928 (MN12-SX). Експериментално добијене и

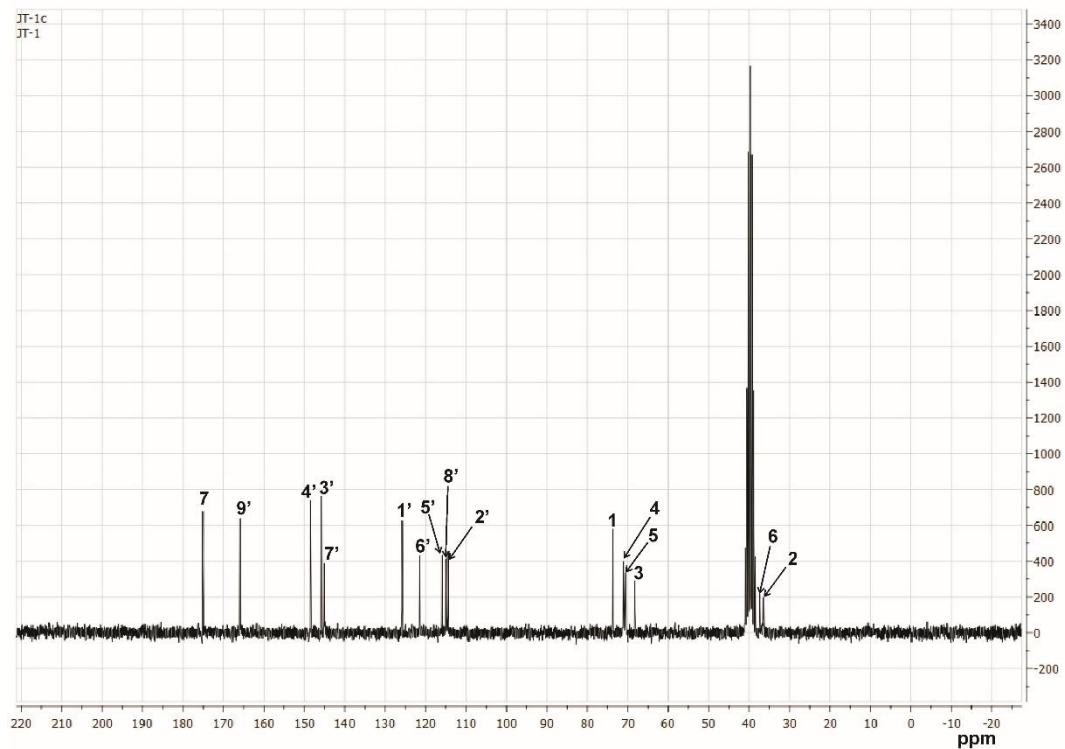
израчунате вредности хемијских померања су представљене у Табели 5, док су експериментално добијени спектри приказани на Сликама 17 и 18.

Табела 5. Експерименталне и израчунате вредности хемијских померања (ppm) у ^{13}C - и ^1H -NMR спектрима хлорогенске киселине у DMSO растварачу.

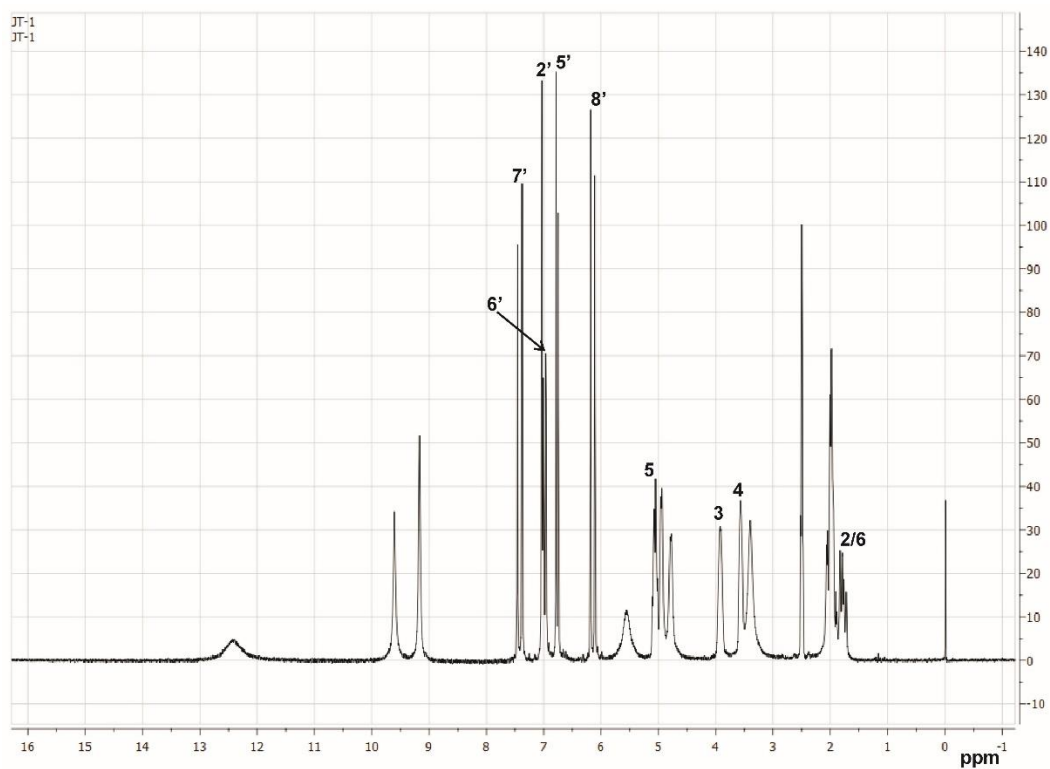
C	Експ	B3LYP-D3	M06-2X	MN12-SX	H	Експ	B3LYP-D3	M06-2X	MN12-SX
7	175.07	172.89	169.98	172.62	7'	7.420	7.426	7.581	7.535
9'	165.89	166.11	162.79	164.55	2'	7.035	7.029	7.108	6.893
4'	148.50	147.65	147.36	148.87	6'	6.985	6.805	6.875	6.967
3'	145.73	142.37	142.45	142.60	5'	6.760	6.646	6.951	6.634
7'	145.10	146.51	151.21	149.92	8'	6.150	6.119	6.376	6.152
1'	125.78	125.44	127.53	124.67	5[ax]	5.060	4.914	4.548	4.686
6'	121.51	127.85	130.94	131.22	3[eq]	3.919	4.277	3.909	4.223
5'	115.92	114.09	118.57	115.67	4[ax]	3.566	3.820	3.437	3.729
8'	114.96	110.19	116.82	112.03	2[ax]	2.060	1.924	1.749	2.027
2'	114.49	109.08	113.08	110.11	6[ax]	1.983	1.877	1.752	1.943
1	73.67	80.26	73.53	74.05	6[eq]	1.895	2.211	2.147	2.293
4	71.04	74.38	67.92	71.90	2[eq]	1.775	2.079	1.826	2.124
5	70.59	73.15	67.80	69.30					
3	68.27	73.78	66.96	70.35					
6	37.39	39.03	37.04	37.52					
2	36.48	38.35	35.71	37.46					
R		0.997	0.996	0.997			0.997	0.995	0.996
AAE		3.01	2.77	2.26			0.16	0.19	0.17

Експериментално добијене вредности хемијских померања су у савршеној сагласности са резултатима који се могу пронаћи у литератури.^{70,76,77} Коefицијенти корелације су релативно велики, док су AAE вредности релативно мале, тако да се може закључити да све три методе показују подједнаку способност да опишу NMR особине молекула **5CQA**.

Резултати приказани у Табели 5 показују да се поједине израчунате вредности хемијских померања за угљеникове атоме доста разликују од експерименталних вредности. Неслагање је заправо последица ротације око једноструких веза и најочигледније је на атомима C2' и C6' (ротација ароматичног прстена око C1'–C7' једноструке везе), као и на атому C8' (ротација око C8'–C9' једноструке везе). Слагање између симулираног и експерименталног ^1H -NMR спектра је изненађујуће добро (Табела 5), што указује на смањену флексибилност хинског дела молекула услед постојања усмерених водоничних веза.



Слика 17. ^{13}C -NMR спектар хлорогенске киселине у DMSO растварачу.



Слика 18. ^1H -NMR спектар хлорогенске киселине у DMSO растварачу.

Табела 6. Експерименталне и израчунате (B3LYP-D3 и M06-2X) вредности хемијских померања (ppm) у ^{13}C -NMR спектру различитих конформера хлорогенске киселине у DMSO растварачу. Резултати добијени помоћу M06-2X функционала су дати у фонту *Italic*.

C	12	1	9	14	11	експ
7	173.23	172.29	172.89	173.21	172.86	175.07
	<i>171.12</i>	<i>168.58</i>	<i>169.42</i>	<i>170.93</i>	<i>169.37</i>	
9'	164.99	169.63	166.16	164.93	166.14	165.89
	<i>162.00</i>	<i>167.18</i>	<i>162.79</i>	<i>162.05</i>	<i>162.87</i>	
4'	147.82	147.22	147.14	145.06	144.64	148.50
	<i>147.46</i>	<i>146.78</i>	<i>147.19</i>	<i>144.17</i>	<i>144.05</i>	
3'	142.31	141.01	141.68	143.85	143.45	145.73
	<i>141.58</i>	<i>140.25</i>	<i>140.87</i>	<i>144.15</i>	<i>143.28</i>	
7'	146.46	149.61	146.64	146.77	147.41	145.10
	<i>151.35</i>	<i>154.77</i>	<i>151.37</i>	<i>151.13</i>	<i>151.57</i>	
1'	125.36	124.09	125.41	126.45	126.60	125.78
	<i>127.95</i>	<i>127.53</i>	<i>127.12</i>	<i>128.32</i>	<i>128.64</i>	
6'	127.91	127.06	119.04	116.53	117.68	121.51
	<i>132.07</i>	<i>130.62</i>	<i>123.86</i>	<i>121.10</i>	<i>122.26</i>	
5'	114.00	113.12	115.04	114.04	113.68	115.92
	<i>118.88</i>	<i>117.76</i>	<i>119.96</i>	<i>118.11</i>	<i>118.42</i>	
8'	111.60	107.18	110.89	112.63	111.04	114.96
	<i>117.30</i>	<i>113.79</i>	<i>116.97</i>	<i>118.14</i>	<i>117.47</i>	
2'	108.40	108.05	118.01	119.56	119.46	114.49
	<i>110.54</i>	<i>110.46</i>	<i>121.46</i>	<i>122.42</i>	<i>123.02</i>	
1	80.49	78.94	80.43	80.43	80.37	73.67
	<i>73.57</i>	<i>72.61</i>	<i>73.97</i>	<i>73.75</i>	<i>74.13</i>	
4	74.55	76.15	74.37	74.45	74.37	71.04
	<i>68.03</i>	<i>69.81</i>	<i>68.14</i>	<i>68.13</i>	<i>68.10</i>	
5	73.22	75.69	73.27	73.21	73.21	70.59
	<i>67.47</i>	<i>69.61</i>	<i>68.43</i>	<i>67.61</i>	<i>68.61</i>	
3	73.82	73.54	73.67	73.95	73.76	68.27
	<i>67.47</i>	<i>66.67</i>	<i>67.41</i>	<i>68.06</i>	<i>67.46</i>	
6	39.16	40.22	38.97	39.19	39.00	37.39
	<i>36.72</i>	<i>38.31</i>	<i>36.30</i>	<i>36.94</i>	<i>36.41</i>	
2	38.46	36.78	38.36	38.50	38.38	36.48
	<i>36.37</i>	<i>34.80</i>	<i>35.95</i>	<i>36.56</i>	<i>35.91</i>	
R	0.997	0.995	0.998	0.998	0.998	
	<i>0.996</i>	<i>0.995</i>	<i>0.997</i>	<i>0.997</i>	<i>0.996</i>	
AAE	3.04	4.07	2.65	2.94	3.02	
	<i>3.07</i>	<i>3.13</i>	<i>2.86</i>	<i>2.68</i>	<i>2.94</i>	

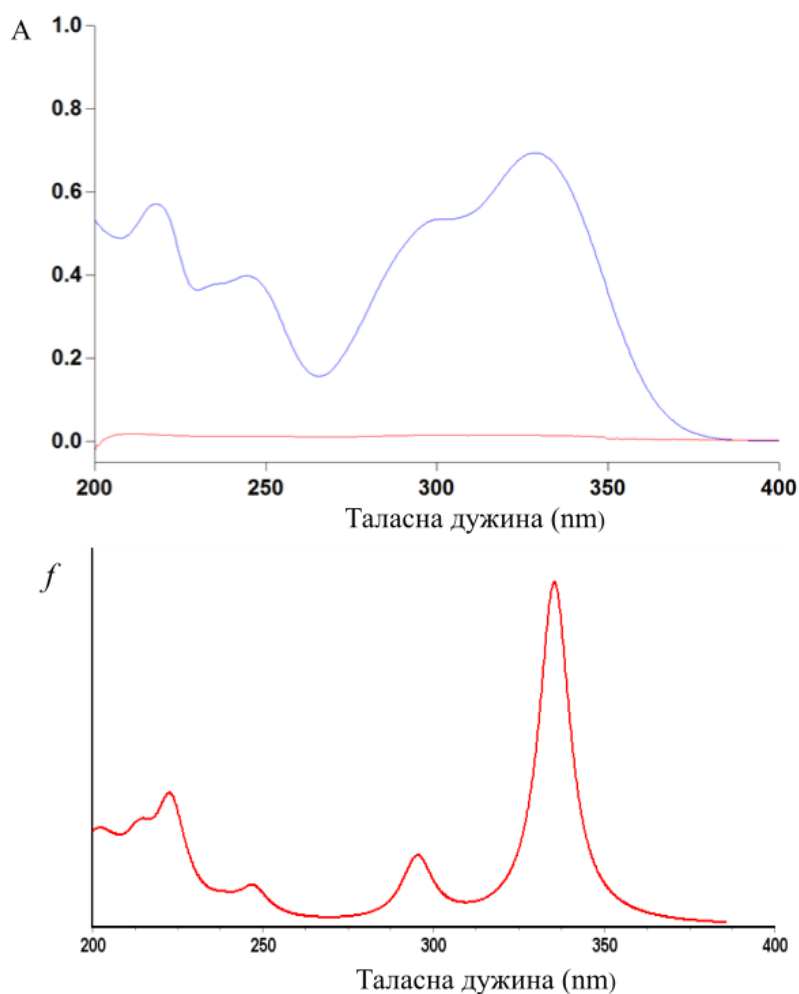
Табела 7. Експерименталне и израчунате (B3LYP-D3 и M06-2X) вредности хемијских померања (ppm) у $^1\text{H-NMR}$ спектру различитих конформера хлорогенске киселине у DMSO растварачу. Резултати добијени помоћу M06-2X функционала су дати у фонту *Italic*.

H	12	1	9	14	11	експ
7'	7.459	7.546	7.356	7.448	7.428	7.420
	<i>7.614</i>	<i>7.721</i>	<i>7.591</i>	<i>7.628</i>	<i>7.576</i>	
2'	7.071	7.083	6.618	6.821	6.757	7.035
	<i>7.064</i>	<i>7.236</i>	<i>6.870</i>	<i>6.787</i>	<i>6.817</i>	
6'	6.760	6.696	7.197	7.034	7.126	6.985
	<i>6.896</i>	<i>6.860</i>	<i>7.320</i>	<i>7.222</i>	<i>7.264</i>	
5'	6.722	6.775	6.711	6.622	6.549	6.760
	<i>6.837</i>	<i>6.556</i>	<i>6.633</i>	<i>6.878</i>	<i>6.662</i>	
8'	5.968	6.082	6.173	6.069	6.191	6.150
	<i>6.318</i>	<i>6.398</i>	<i>6.424</i>	<i>6.299</i>	<i>6.479</i>	
5[ax]	4.859	4.882	4.880	4.822	4.908	5.060
	<i>4.472</i>	<i>4.562</i>	<i>4.634</i>	<i>4.464</i>	<i>4.668</i>	
3[eq]	4.311	4.091	4.262	4.327	4.270	3.919
	<i>3.985</i>	<i>3.770</i>	<i>3.910</i>	<i>3.967</i>	<i>3.929</i>	
4[ax]	3.891	3.686	3.799	3.886	3.807	3.566
	<i>3.564</i>	<i>3.440</i>	<i>3.443</i>	<i>3.511</i>	<i>3.452</i>	
2[ax]	1.921	1.845	2.049	1.941	1.920	2.060
	<i>1.914</i>	<i>1.869</i>	<i>1.699</i>	<i>1.817</i>	<i>1.703</i>	
6[ax]	1.877	2.208	1.880	1.905	1.891	1.983
	<i>1.824</i>	<i>2.286</i>	<i>1.734</i>	<i>1.777</i>	<i>1.740</i>	
6[eq]	2.237	2.074	2.210	2.250	2.210	1.895
	<i>2.211</i>	<i>1.983</i>	<i>2.137</i>	<i>2.193</i>	<i>2.141</i>	
2[eq]	2.099	2.065	2.049	2.102	2.051	1.775
	<i>1.865</i>	<i>1.921</i>	<i>1.850</i>	<i>1.885</i>	<i>1.870</i>	
R	0.995	0.997	0.996	0.995	0.996	
	<i>0.995</i>	<i>0.994</i>	<i>0.995</i>	<i>0.994</i>	<i>0.995</i>	
AAE	0.20	0.16	0.19	0.20	0.19	
	<i>0.16</i>	<i>0.22</i>	<i>0.21</i>	<i>0.21</i>	<i>0.21</i>	

Како је већ напоменуто, у DMSO растварачу на собној температури може да постоји шест конформера чија разлика у енергији не прелази 0.5 kJ mol^{-1} (структуре **8**, **12**, **1**, **9**, **14** и **11** на Слици 12). Из тог разлога су израчунати ^{13}C - и $^1\text{H-NMR}$ спектри за преосталих пет (**12**, **1**, **9**, **14** и **11**) најстабилнијих конформера помоћу B3LYP-D3 и M06-2X теоријских метода и ти резултати су приказани у Табелама 6 и 7.⁶⁹ R и AAE вредности за различите конформере су међусобно врло сличне, што потврђује нашу претпоставку да молекул **5CQA** постоји као смеша више енергетски повољних конформера.

UV спектар хлорогенске киселине

У UV спектру **5CQA** присутне су четири траке на следећим таласним дужинама: 329, 298, 244 и 218 nm (Слика 19).⁶⁹ UV спектар испитиваног једињења у метанолу (конформер **8**) је симулиран помоћу TDDFT (*Time Dependent Density Functional Theory*) методе на сва три нивоа теорије.



Слика 19. Експериментални (плава линија) и симулирани (црвена линија) UV спектар хлорогенске киселине у метанолу. Спектар је израчунат помоћу B3LYP-D3/6-311+G(d,p) теоријског модела у комбинацији са CPCM солватационим моделом.

У Табели 8 су приказане експерименталне и израчунате вредности таласних дужина (λ_{\max}), осцилаторне јачине (f) као и доприноси од појединачних електронских прелаза. Резултати приказани у Табели 8 показују да три методе са различитом успешношћу предвиђају UV спектар молекула **5CQA**. Методе B3LYP-D3 и M06-2X репродукују све четири траке, док се спектар симулиран помоћу MN12-SX методе састоји само из једне интензивне траке која се јавља на 328 nm. Може се закључити да

MN12-SX метода није погодна за симулирање UV спектра. Уколико се упореде експерименталне и израчунате λ_{\max} вредности за преостале две методе, може се увидети да су вредности за таласне дужине израчунате помоћу M06-2X методе благо потцењене, док B3LYP-D3 функционал даје резултате који се одлично слажу са експерименталним вредностима. Из овог разлога, даље испитивање UV апсорпције молекула **5CQA** је вршено на основу B3LYP-D3 геометрије основног стања.

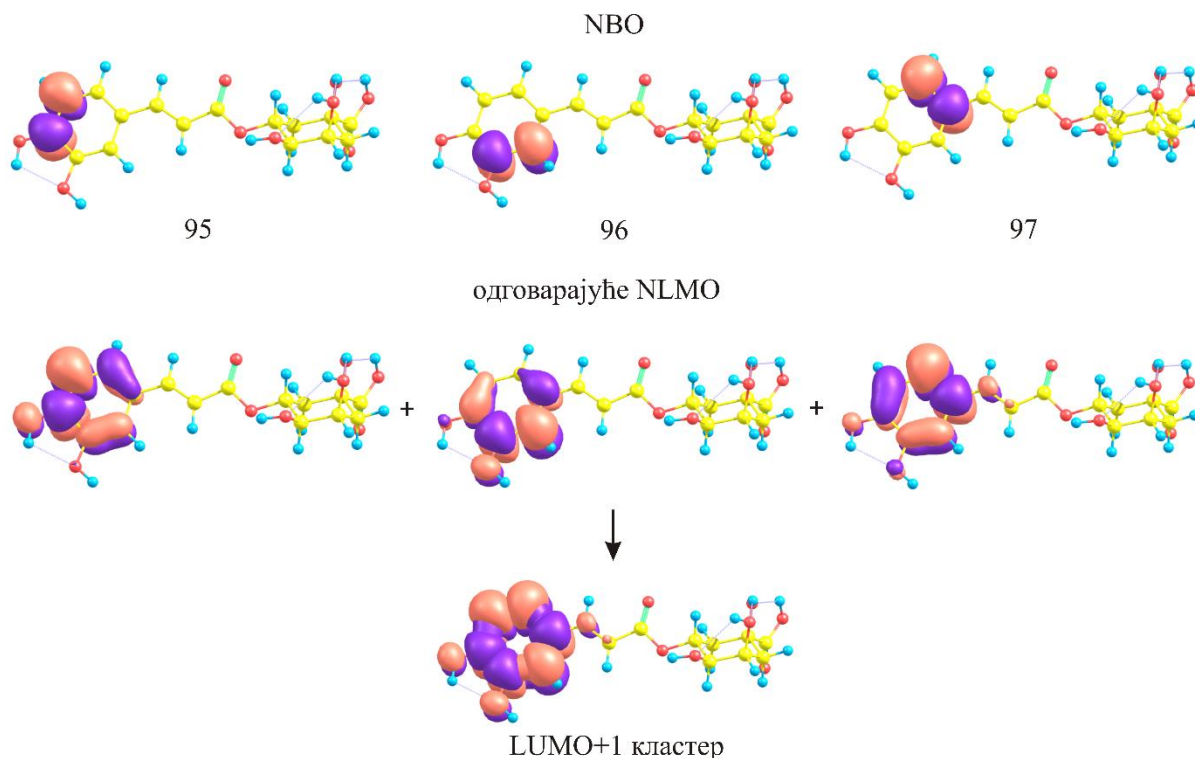
Табела 8. UV подаци за хлорогенску киселину: експерименталне вредности таласних дужина које одговарају свим апсорпционим тракама и резултати добијени помоћу TDDFT прорачуна. λ_{\max} се односи на експерименталне и израчунате вредности таласних дужина, док f означава осцилаторну јачину.

експ λ_{\max} (nm)	B3LYP-D3			M06-2X			MN12-SX		
	λ_{\max}	f	електронски прелази	λ_{\max}	f	електронски прелази	λ_{\max}	f	електронски прелази
329	335	0.77	H→L (77%)	299	0.86	H→L (69%)	328	0.71	H→L (67%)
298	295	0.14	H-1→L (67%)	259	0.06	H-1→L (60%)	/	/	/
244	247	0.07	H→L+1 (63%)	221	0.19	H→L+3 (57%)	/	/	/
218	223	0.24	H-4→L (60%)	202	0.26	H-1→L+3 (42%)	/	/	/

Ради бољег увида у UV спектар молекула **5CQA** конструисани су NLMO (*Natural Localised Molecular Orbitals*) кластери. NLMO кластер треба разумети као део молекула који је окарактерисан одговарајућом густином електрона.^{78,79} Њих смо конструисали на следећи начин. Испитане су и идентификоване све π везивне, π^* антивезивне NLMO орбитале, као и NLMO орбитале у којима се налазе слободни електронски парови. Пажљиво су разматране просторна и енергетска сепарација и природа NLMO орбитала, као и природа NBO орбитала из којих су потекле. На основу свих тих особина појединачне NLMO орбитале су груписане у NLMO кластере. За разлику од молекулских орбитала, NLMO кластери садрже више од два електрона, али ће бити називани слично као и молекулске орбитале (HOMO кластер, LUMO кластер, итд.) и служиће за идентификацију делова молекула који су укључени у електронске прелазе. Овакав приступ илустрован је Сликаом 20, на којој је приказано конструисање LUMO+1 кластера молекула **5CQA**.

Свака NLMO орбитала настаје делокализацијом одговарајуће NBO орбитале преко суседних и удаљених атома. Тако се, на пример, непопуњене NLMO орбитале 95, 96 и 97 (Слика 20) простиру преко целог бензеновог прстена. Будући да су ове

NLMO орбитале исте природе (антивезивне π^* NLMO), са малом електронском и просторном сепарацијом, а уз то образују π -електронску густину у бензеновом прстену, закључујемо да оне граде LUMO+1 кластер. Подаци неопходни за конструкцију NLMO кластера су приказани у Табели 9.



Слика 20. NLMO орбитале које учествују у грађењу LUMO+1 кластера хлорогенске киселине.

Табела 9 показује да су π NLMO, које су локализоване на карбонилним групама у молекулу **5CQA**, орбитале са најнижом енергијом. Две NLMO орбитале се међусобно разликују: C7=O7 припада карбоксилној групи, док C9'=O9' припада естарској групи. Имајући ово у виду, одлучено је да те две π NLMO граде два различита кластера најниже енергије: НОМО-5 и НОМО-4 (Слика 21). НОМО-3 кластер се састоји од слободних електронских парова (p орбитале) локализованих на sp^2 хибридованим атомима кисеоника. НОМО-2 и НОМО-1 кластере представљају p орбитале sp хибридованих O7 и O9' атома. Три π NLMO орбитале локализоване на ароматичном прстену, као и конјугована C7'=C8' π орбитала, исте су природе, просторно и енергетски су блиске, тако да граде НОМО кластер молекула **5CQA**. У антивезивном делу NLMO орбитала најниже енергије је π^* орбитала локализована на C9'=O9' групи (LUMO кластер). Готово дегенерисане π^* орбитале на ароматичном прстену граде

LUMO+1 кластер. LUMO+2 кластер представља π^* орбитала на C7=O7 групи, док LUMO+3 кластер (кластер највише енергије) представља C7'=C8' π^* орбитала.

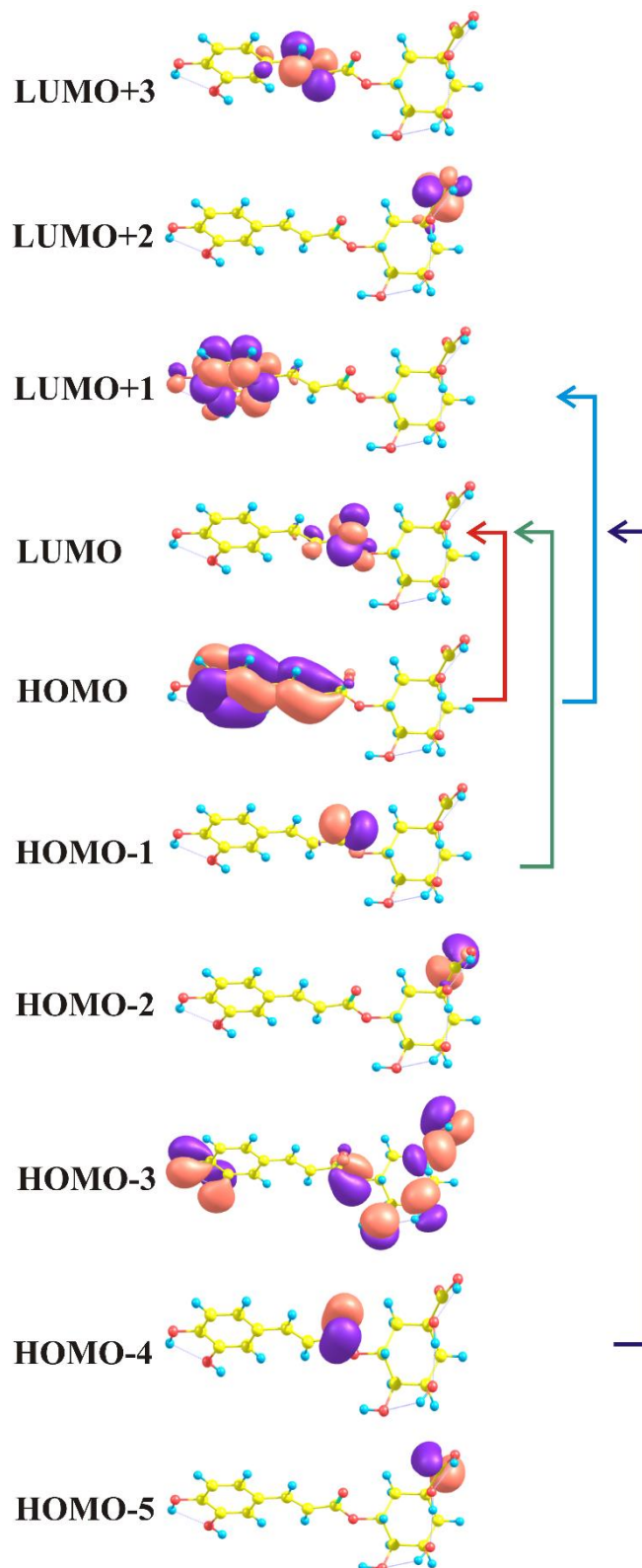
Табела 9. Подаци везани за одабране NLMO орбитале молекула **5CQA** добијени из V3LYP-D3 матрице густине.

NLMO	Енергија (E_h/p^*)	Средња енергија (E_h/p)	NLMO кластер
69. π^* C7'-C8'	0.02508	0.02508	LUMO+3
98. π^* C7-O7	0.01963	0.01963	LUMO+2
97. π^* C1'-C6'	0.01804		
96. π^* C2'-C3'	0.01030	0.01267	LUMO+1
95. π^* C4'-C5'	0.00967		
94. π^* C9'-O9'	-0.00691	-0.00691	LUMO
93. π C1'-C6'	-0.25989		
92. π C4'-C5'	-0.27476		
91. π C2'-C3'	-0.28235	-0.27550	HOMO
90. π C7'-C8'	-0.28501		
89. p O9'	-0.28107	-0.28107	HOMO-1
88. p O7	-0.28727	-0.28727	HOMO-2
87. p O4	-0.32664		
86. p O4'	-0.34074		
85. p O10'	-0.34364		
84. p O3'	-0.34766	-0.35599	HOMO-3
83. p O8	-0.34946		
82. p O3	-0.38690		
81. p O1	-0.39688		
80. π C9'-O9'	-0.40962	-0.40962	HOMO-4
79. π C7-O7	-0.43935	-0.43935	HOMO-5

* E_h/p = хартри по честици

Комбиновањем резултата добијених помоћу TDDFT теорије (предвиђања енергетских нивоа приказаних у Табели 9) и NBO теорије (NLMO кластери приказани на Слици 21), изведени су следећи закључци. Трака која се јавља на 329 nm (експ) се може приписати $\pi \rightarrow \pi^*$ електронском прелазу са кафеинског дела молекула (HOMO кластер) у C9'=O9' естарску карбонилну групу (LUMO кластер). Прелаз обухвата повољни интрамолекулски трансфер наелектрисања преко планарног конјугованог дела молекула и окарактерисан је малом енергетском сепарацијом. Следећа је трака на 298 nm (HOMO-1 \rightarrow LUMO) и може се разматрати као $n \rightarrow \pi^*$ прелаз са карбонилне групе (p орбитала) у карбонилну групу (π^* орбитала). $\pi \rightarrow \pi^*$ електронски прелаз са кафеинског дела молекула у ароматични прстен (HOMO \rightarrow LUMO+1) је одговоран за присуство траке на 244 nm. Трака на 218 nm (HOMO-4 \rightarrow LUMO) укључује прелаз са

карбонилне групе (π орбитала) у карбонилну групу (π^* орбитала). Са Сlike 21 се види да је за све електронске прелазе карактеристична минимална просторна сепарација, док је величина енергетске сепарације пропорционална ексцитационим енергијама.

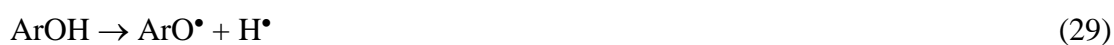


Слика 21. NLMO кластери хлорогенске киселине. Стрелице указују на кластере који су укључени у одређени електронски прелаз.

Антиоксидативне особине хлорогенске киселине

Приступ заснован на израчунавању термодинамичких параметара

Један од начина за проучавање антиоксидативне активности једињења се заснива на израчунавању термодинамичких параметара. Помоћу ове методологије проучавају се три механизма преко којих антиоксидант може да испољава своју активност, и то: НАТ, представљен једначином (29), SPLET, представљен једначинама (30) и (31) и SET-РТ механизам, представљен једначинама (32) и (33).



Тада се термодинамички параметри: енталпија дисоцијације везе (*Bond Dissociation Enthalpy*, BDE, једначина (34)), афинитет према протону (*Proton Affinity*, PA, једначина (35)), енталпија прелаза електрона (*Electron Transfer Enthalpy*, ETE, једначина (36)), јонизациони потенцијал (*Ionisation Potential*, IP, једначина (37)) и енталпија дисоцијације протона (*Proton Dissociation Enthalpy*, PDE, једначина (38)), дефинишу као енталпије реакција (29) – (33):

$$\text{BDE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{ArOH}) \quad (34)$$

$$\text{PA} = H(\text{ArO}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}) \quad (35)$$

$$\text{ETE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArO}^-) \quad (36)$$

$$\text{IP} = H(\text{ArOH}^{+\bullet}) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArOH}) \quad (37)$$

$$\text{PDE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}^{+\bullet}) \quad (38)$$

Уместо енталпија, могу се извести и аналогне једначине у којима фигуришу слободне енергије (G). У једначинама (34) – (38) поред енталпије антиоксиданта (ArOH), његовог радикала (ArO[•]), анјона (ArO⁻) и радикал катјона (ArOH^{+•}), уочавају се и енталпије атома водоника (H[•]), протона (H⁺) и електрона (e⁻). За разлику од осталих енталпија, енталпије протона и електрона није могуће израчунати. У случају када се прорачуни врше у гасовитој фази, термодинамичке параметре је могуће одредити на основу

прихваћених вредности које износе $6.197 \text{ kJ mol}^{-1}$ за енталпију протона ($5/2RT$, што представља вредност за идеални гас), $3.146 \text{ kJ mol}^{-1}$ за енталпију електрона, $-26.255 \text{ kJ mol}^{-1}$ за слободну енергију протона и $-3.633 \text{ kJ mol}^{-1}$ за слободну енергију електрона.⁸⁰ Вредности за $H(\text{H}^+)$, $H(\text{e}^-)$, $G(\text{H}^+)$ и $G(\text{e}^-)$ у гасовитој фази су недавно ревидиране.^{81,82} Под претпоставком да се протон не понаша као класична честица на свим температурама (температуре испод 120 K), помоћу процедуре засноване на Ферми-Дираковом (Fermi-Dirac) формализму добијене су вредности 6.1398 и $-26.3424 \text{ kJ mol}^{-1}$ за $H(\text{H}^+)$ и $G(\text{H}^+)$ на стандардном притиску од 1 bar .⁸¹ Термодинамичке величине за електрон су израчунате на основу процедуре за одређивање ентропије електрона у гасовитој фази. Вредност добијена за енталпију електрона износи $3.1351 \text{ kJ mol}^{-1}$, док вредност за слободну енергију електрона износи $-3.6160 \text{ kJ mol}^{-1}$.⁸²

Међутим, актуелна теоријска истраживања која се баве испитивањем антиоксидативне активности фокусирана су углавном на испитивање реакција које се одвијају у различитим растварачима. Енталпија и слободна енергија протона и електрона у растварачима може се добити из одговарајућих вредности енталпије и слободне енергије солватације. Енталпија (слободна енергија) солватације протона, $\Delta H_{\text{sol}}(\text{H}^+)$ или $\Delta G_{\text{sol}}(\text{H}^+)$, представља разлику енталпије (слободне енергије) солватисаног протона и протона у мировању у вакууму. Слично, енталпија (слободна енергија) солватације електрона, $\Delta H_{\text{sol}}(\text{e}^-)$ или $\Delta G_{\text{sol}}(\text{e}^-)$, представља разлику енталпије (слободне енергије) солватисаног електрона и електрона у мировању у вакууму.

Много је труда уложено како би се одредиле тачне вредности за енталпију хидратације протона и електрона, $\Delta H_{\text{hyd}}(\text{H}^+)$ и $\Delta H_{\text{hyd}}(\text{e}^-)$. У литератури су доступни поједини резултати, међутим, веома су ретки резултати који се односе на слободну енергију протона и електрона у другим растварачима. Предложене су различите вредности како за енталпију хидратације протона,⁸³⁻⁹¹ тако и за слободну енергију хидратације протона.^{89,91,92} Што се тиче енталпије хидратације електрона, најзначајнији резултати су добијени применом пулсне радиолизе у комбинацији са израчунатим вредностима за енталпију хидратације протона и водониковог атома.⁹³⁻⁹⁵ Будући да се могу узети различите вредности за $\Delta H_{\text{hyd}}(\text{H}^+)$, вредности за енталпије хидратације електрона добијене на овај начин су веома разнолике.

Фифен (Fifen), Ротманова (Rottmannová) и Шкорна (Škorňa) и њихови сарадници су објавили још неке од опсежних студија о солватационој енталпији протона и

електрона у различитим растварачима (циклохексан, бензен, хлороформ, ацетон, дихлорметан, метанол, етанол, DMSO и вода).⁹⁶⁻⁹⁸

Како бисмо одредили антиоксидативну активност хлорогенске киселине на основу термодинамичких параметара, а и допунили постојећу литературу, спровели смо систематично испитивање енталпије солватације протона и електрона, као и енталпије солватисаног протона и електрона у двадесет најчешће коришћених растварача различите поларности.⁹⁹

Одређивање енталпије солватисаног протона и електрона

У случају када су протон или електрон окружени одређеним растварачем, претпоставља се да ће се везати за молекулу растварача који је солватисан другим молекулима растварача (S_{sol}). На тај начин настају наелектрисане честице $(S-H)^+_{sol}$ или $(S-e)^-_{sol}$, које се налазе у раствору:⁹⁶⁻⁹⁸



Тада се енталпија солватације протона и електрона могу одредити помоћу следећих једначина:

$$\Delta H_{sol}(H^+) = H(S-H)^+_{sol} - H(S_{sol}) - H(H^+_{gas}) \quad (41)$$

$$\Delta H_{sol}(e^-) = H(S-e)^-_{sol} - H(S_{sol}) - H(e^-_{gas}) \quad (42)$$

Слободна енергија солватације протона и електрона се аналогно дефинише:

$$\Delta G_{sol}(H^+) = G(S-H)^+_{sol} - G(S_{sol}) - G(H^+_{gas}) \quad (43)$$

$$\Delta G_{sol}(e^-) = G(S-e)^-_{sol} - G(S_{sol}) - G(e^-_{gas}) \quad (44)$$

Енталпије и слободне енергије солватације протона и електрона израчунате су помоћу једначина (41) – (44) за следеће растваче: 1-бутанол (диелектрична константа, $\epsilon = 17.33$), сирћетна киселина ($\epsilon = 6.25$), ацетон ($\epsilon = 20.49$), ацетонитрил ($\epsilon = 35.69$), анилин ($\epsilon = 6.89$), бензалдехид ($\epsilon = 18.22$), бензен ($\epsilon = 2.27$), хлоробензен ($\epsilon = 5.70$), циклохексан ($\epsilon = 2.02$), диетилетар ($\epsilon = 4.24$), диметилформаид (DMF, $\epsilon = 37.22$), диметил сулфоксид (DMSO, $\epsilon = 46.83$), етанол ($\epsilon = 24.85$), метанол ($\epsilon = 32.61$), нитробензен ($\epsilon = 34.81$), пентил етаноат ($\epsilon = 4.73$), хинолин ($\epsilon = 9.16$), тетраhydroфуран (THF, $\epsilon = 7.43$), толуен ($\epsilon = 2.37$) и вода ($\epsilon = 78.35$). Структуре молекула растварача, као

и одговарајући протоновани молекул растварача и радикал анјон оптимизовани су помоћу 11 квантно механичких метода у комбинацији са 6-311++G(d,p) базисним скупом и SMD солватационим моделом. Како су за овај докторат неопходне вредности са енталпију солватисаног протона и електрона, ти резултати ће бити приказани и дискутовани. Резултати који се односе на слободну енергију протона и електрона приказани су у раду 99.

Добијени резултати за енталпије солватације протона и електрона приказани су у Табелама 10 и 11. За $H(\text{H}^+_{\text{gas}})$ и $H(\text{e}^-_{\text{gas}})$, употребљене су вредности које је предложио Бартмес.⁸¹ Приликом прорачуна наилазили смо на доста проблема. У појединим случајевима прорачун није могао да конвергира, док су у неким другим случајевима приликом прорачуна добијане имагинаре вибрације. Проблеми су били још израженији у случају оптимизације радикал анјона и то посебно када су за оптимизацију коришћене MP2, B2PLYP и B2PLYP-D3 методе. Из тог разлога није било могуће да се израчуна енталпија солватације електрона у хинолину помоћу MP2 методе (Табела 11). Бројни покушаји да се оптимизују DMSO и хлоробензен радикал анјони помоћу M06 и TPSS функционала такође су били неуспешни. По овом питању, као најуспешније методе су се показале B3LYP и M06-2X.

Резултати приказани у Табели 10 показују да све методе дају упоредиве вредности за енталпију солватације протона. То нам говори и вредност релативне стандардне девијације (*Relative Standard Deviation*, RSD) која не прелази 2 %. Са друге стране, Табела 11 открива да се вредности за енталпију солватације електрона у одређеном растварачу значајно разликују у зависности од методе којом су рачунате. Овај резултат потврђује добро познату чињеницу да су негативно наелектрисане врсте, као и врсте које садрже неспарени електрон, далеко захтевније за прорачуне од неутралних молекула и катјона. Посебно одступање се уочава у случају циклохексана, диетилетра и THF-а, што показују и RSD вредности које износе 90.11, 124.31 и 53.29 % за наведена три растварача. Вредности које су добијене помоћу метода MP2, B2PLYP и B2PLYP-D3 за бензен и толуен, као и вредност за пентил етаноат добијена помоћу MP2 методе, екстремно отступају од резултата које дају остале методе. Изненађујуће је да се најмање негативне (највише позитивне) вредности добијају помоћу MP2 методе, као и B2PLYP и B2PLYP-D3.

Табела 10. Енталпије солватације протона (kJ mol^{-1}). Резултати су добијени помоћу 6-311++G(d,p) базисног скупа и SMD солватационог модела. Скраћеница RSD (*Relative Standard Deviation*) се односи на релативну стандардну девијацију.

Растварачи	MP2	B2PLYP	B2PLYP-D3	B3LYP	B3LYP-D2	B3LYP-D3	M05-2X	M06	M06-2X	M06-HF	TPSS	RSD (%)
1-Бутанол	-1063.8	-1062.5	-1063.9	-1062.8	-1065.9	-1065.9	-1057.8	-1055.5	-1057.6	-1064.3	-1069.8	0.44
Сирћетна киселина	-1022.1	-1022.9	-1023.9	-1025.7	-1028.7	-1028.2	-1021.0	-1023.8	-1022.4	-1019.0	-1031.8	0.39
Ацетон	-1049.9	-1055.5	-1056.6	-1060.2	-1062.9	-1062.9	-1056.1	-1058.5	-1053.6	-1049.9	-1066.5	0.48
Ацетонитрил	-1032.9	-1038.2	-1039.1	-1043.8	-1044.7	-1045.6	-1030.7	-1045.4	-1032.4	-1025.3	-1050.7	0.81
Анилин	-1115.7	-1109.5	-1111.2	-1108.5	-1111.6	-1112.5	-1101.7	-1097.8	-1100.5	-1102.0	-1115.2	0.55
Бензалдеhid	-1032.3	-1044.7	-1045.7	-1051.7	-1053.8	-1054.0	-1040.3	-1044.1	-1036.3	-1031.1	-1058.6	0.87
Бензен	-869.6	-893.4	-894.7	-903.9	-908.2	-906.4	-879.3	-901.9	-877.4	-852.1	-913.6	2.22
Хлоробензен	-853.0	-850.4	-852.0	-853.6	-856.0	-856.9	-837.7	-850.3	-836.5	-829.1	-865.5	1.37
Циклохексан	-755.0	-760.2	-762.2	-766.2	-770.4	-769.6	-759.1	-762.4	-757.3	-760.7	-780.0	0.91
Диетилетар	-1012.1	-1013.2	-1015.1	-1014.3	-1020.0	-1018.7	-1011.6	-1001.7	-1007.7	-1019.8	-1022.1	0.65
DMF	-1109.1	-1105.5	-1106.5	-1105.5	-1108.0	-1107.8	-1105.8	-1095.0	-1104.7	-1114.9	-1109.3	0.47
DMSO	-1127.4	-1120.1	-1121.3	-1119.6	-1120.2	-1122.1	-1120.3	-1115.8	-1119.7	-1127.3	-1118.3	0.28
Етанол	-1070.5	-1068.5	-1069.8	-1068.4	-1071.6	-1071.4	-1064.5	-1063.3	-1064.0	-1068.6	-1076.0	0.39
Метанол	-1073.4	-1069.2	-1070.2	-1067.9	-1070.3	-1070.3	-1065.2	-1064.4	-1065.4	-1070.6	-1074.5	0.30
Нитробензен	-991.4	-999.5	-1000.5	-1007.4	-1009.5	-1009.7	-986.3	-999.9	-990.3	-980.1	-1018.7	1.26
Пентил етаноат	-1004.1	-1008.6	-1009.6	-1012.3	-1015.5	-1015.0	-1005.9	-1005.7	-1004.5	-1005.1	-1018.5	0.52
Хинолин	-1136.9	-1148.7	-1150.3	-1154.4	-1158.9	-1158.0	-1141.0	-1143.9	-1138.2	-1133.4	-1159.0	0.85
THF	-1042.1	-1043.8	-1045.5	-1044.7	-1049.6	-1048.6	-1040.6	-1034.0	-1036.6	-1046.0	-1051.4	0.56
Толуен	-895.8	-926.1	-927.4	-937.9	-942.5	-940.5	-913.7	-935.9	-911.7	-884.3	-946.5	2.17
Вода	-1062.5	-1056.9	-1057.4	-1055.4	-1055.9	-1056.6	-1052.0	-1056.6	-1055.7	-1054.9	-1064.0	0.30

Табела 11. Енталпије солватације електрона (kJ mol^{-1}). Резултати су добијени помоћу 6-311++G(d,p) базисног скупа и SMD солватационог модела. Скраћеница RSD (*Relative Standard Deviation*) се односи на релативну стандардну девијацију.

Растварачи	MP2	B2PLYP	B2PLYP-D3	B3LYP	B3LYP-D2	B3LYP-D3	M05-2X	M06	M06-2X	M06-HF	TPSS	RSD (%)
1-Бутанол	-11.0	-52.5	-52.4	-68.8	-68.5	-68.6	-40.1	-42.1	-52.3	-71.9	-64.0	20.18
Сирћетна киселина	-74.3	-99.9	-99.9	-120.9	-120.9	-121.1	-112.7	-103.0	-104.8	-124.6	-117.9	6.53
Ацетон	-89.2	-112.3	-112.3	-132.9	-133.2	-132.7	-119.8	-120.6	-116.6	-129.0	-131.6	5.07
Ацетонитрил	-69.3	-108.4	-108.5	-132.2	-133.2	-132.6	-116.7	-114.6	-113.0	-122.1	-129.7	6.51
Анилин	-23.9	-34.5	-34.4	-78.9	-79.7	-78.4	-77.2	-83.2	-77.4	-90.8	-73.5	6.06
Бензалдехид	-107.2	-209.8	-209.7	-236.6	-236.8	-236.3	-235.4	-235.7	-230.6	-238.5	-234.5	0.92
Бензен	38.0	5.0	4.7	-16.5	-17.5	-16.2	-8.7	-21.3	-10.5	-19.3	-13.5	25.99
Хлоробензен	-39.4	-77.9	-77.7	-105.0	-105.8	-104.5	-103.1	-108.9	-102.2	-110.3	/	2.59
Циклохексан	54.1	21.4	21.6	4.4	4.9	4.6	48.5	34.8	35.1	3.2	14.1	90.11
Диетилетар	8.1	-6.7	-6.7	-24.4	-24.5	-24.3	15.3	3.6	-0.7	-34.4	-14.3	124.31
DMF	-19.0	-74.2	-74.4	-92.1	-94.0	-92.5	-85.4	-88.1	-88.0	-95.5	-89.0	3.58
DMSO	-33.1	-42.3	-42.2	-53.0	-52.3	-52.5	-25.6	/	-42.9	-66.5	-49.0	23.61
Етанол	-45.1	-56.5	-56.4	-73.6	-73.5	-73.5	-43.6	-46.9	-56.3	-76.2	-68.8	19.22
Метанол	-49.0	-62.0	-62.0	-80.0	-80.0	-80.0	-48.7	-52.5	-61.4	-82.1	-74.6	18.24
Нитробензен	-134.6	-280.1	-280.0	-315.4	-315.6	-315.3	-320.7	-311.5	-313.5	-338.5	-300.9	3.13
Пентил етаноат	5.0	-44.3	-44.0	-66.0	-66.1	-65.7	-51.1	-51.1	-48.6	-61.1	-64.0	12.04
Хинолин	/	-183.5	-183.4	-205.0	-205.3	-204.6	-205.3	-209.9	-202.5	-207.8	-203.6	1.07
THF	-7.7	60.3	140.3	-42.2	-41.7	-41.9	1.3	-19.7	-16.2	-49.0	-32.0	53.29
Толуен	37.5	-0.5	0.1	-21.7	-22.5	-21.0	-13.9	-25.4	-15.2	-26.7	-18.5	20.56
Вода	-62.5	-81.4	-81.4	-101.0	-101.0	-100.9	-66.8	-66.2	-77.5	-66.3	-90.8	18.28

Највише негативне (најмање позитивне) вредности су добијене помоћу M06-HF функционала, који, међутим, подбацује када је у питању репродуковање $\Delta H_{\text{hyd}}(e^-)$ вредности. B3LYP, B3LYP-D2 и B3LYP-D3 такође дају значајно ниске $\Delta H_{\text{sol}}(e^-)$ вредности. Такође, вредности које дају ове три методе за енталпију солватације су међусобно врло сличне. Такав резултат није изненађујући с обзиром на то да дисперзне интеракције нису доминантне у случају када је молекул изолован. Како не постоје чисто експерименталне вредности за енталпију солватације протона и електрона, тешко је да се одреди која метода даје резултате који су најприближнији стварним вредностима.

За наредна испитивања, која су укључивала веће базисне скупове, изабрана је B3LYP метода из два разлога. Први је зато што је задавала најмање тешкоћа око оптимизације, док је други тај што је коришћена и у претходним истраживањима.⁹⁶⁻⁹⁸ Изабрана два базисна скупа 6-311++G(3df,3pd) и Aug-cc-pVTZ комбинована су са B3LYP методом како бисмо најпре добили енталпију солватације протона и електрона, а затим и енталпију солватисаног протона и електрона, $\Delta H(H^+_{\text{sol}})$ и $\Delta H(e^-_{\text{sol}})$. $\Delta H(H^+_{\text{sol}})$ и $\Delta H(e^-_{\text{sol}})$ се могу добити на тај начин што се на вредности за $\Delta H_{\text{sol}}(H^+)$ и $\Delta H_{\text{sol}}(e^-)$ додају $H(H^+_{\text{gas}})$ и $H(e^-_{\text{gas}})$ вредности. Резултати добијени помоћу два нивоа теорије су приказани у Табели 12. Из Табеле 12 се види да су вредности за $\Delta H_{\text{sol}}(H^+)$ и $\Delta H_{\text{sol}}(e^-)$, као и вредности за $\Delta H(H^+_{\text{sol}})$ и $\Delta H(e^-_{\text{sol}})$, израчунате помоћу два теоријска модела сагласне. Вредности добијене помоћу Aug-cc-pVTZ базисног скупа су генерално ниже. Разлог за овакве резултате је свакако чињеница да Поплови (Pople) базисни скупови подељене валенце садрже мање базисних функција, са само *s* дифузним функцијама додатим на атом водоника и *s* и *p* дифузним функцијама додатим на тешке атоме, док корелационо усаглашени базисни скупови садрже *s*, *p* и *d* дифузне функције на водонику и *s*, *p*, *d* и *f* дифузне функције на тешким атомима.

Уколико се упореде наше вредности и резултати које су добили Тисандиер (Tissandier),⁸⁹ Мехиас (Mejías)⁹⁰ и Коу (Coe),⁹¹ очигледно је да су наше вредности за $\Delta H_{\text{hyd}}(e^-)$ и $\Delta H_{\text{hyd}}(H^+)$ мање негативне, док су вредности за $\Delta H_{\text{sol}}(H^+)$ у метанолу мало негативније од резултата које је добио Фифен.¹⁰⁰ Уколико наше резултате упоредимо са резултатима који су добијени применом сличне методологије, увиђа се да су наше $\Delta H_{\text{sol}}(e^-)$ мало мање негативне, док су $\Delta H_{\text{sol}}(H^+)$ нешто ниже од вредности које су добили Ратманова и Шкорна.^{97,98}

Табела 12. Енталпије солватације $\Delta H_{\text{sol}}(\text{H}^+)$ и $\Delta H_{\text{sol}}(\text{e}^-)$ и енталпије солватисаног протона и електрона $\Delta H(\text{H}^+_{\text{sol}})$ и $\Delta H(\text{e}^-_{\text{sol}})$ (kJ mol^{-1}) израчунате помоћу B3LYP функционала у комбинацији са 6-311++G(3df,3pd) и Aug-cc-pVTZ базисним скуповима.

Растварачи	6-311++G(3df,3pd)				Aug-cc-pVTZ			
	$\Delta H_{\text{sol}}(\text{H}^+)$	$\Delta H_{\text{sol}}(\text{e}^-)$	$\Delta H(\text{H}^+_{\text{sol}})$	$\Delta H(\text{e}^-_{\text{sol}})$	$\Delta_{\text{sol}}H(\text{H}^+)$	$\Delta_{\text{sol}}H(\text{e}^-)$	$\Delta H(\text{H}^+_{\text{sol}})$	$\Delta H(\text{e}^-_{\text{sol}})$
1-Бутанол	-1065.3	-68.5	-1059.1	-65.3	-1065.9	-70.7	-1059.7	-67.6
Сирћетна киселина	-1033.2	-115.3	-1027.0	-112.1	-1033.8	-115.8	-1027.6	-112.6
Ацетон	-1065.8	-130.0	-1059.6	-126.9	-1066.4	-130.7	-1060.3	-127.6
Ацетонитрил	-1048.7	-129.1	-1042.5	-126.0	-1049.3	-128.7	-1043.1	-125.6
Анилин	-1108.8	-77.9	-1102.6	-74.7	-1110.3	-76.9	-1104.1	-73.8
Бензалдехид	-1056.8	-234.5	-1050.6	-231.3	-1057.7	-234.0	-1051.5	-230.8
Бензен	-904.1	-16.7	-897.9	-13.5	-904.9	-17.5	-898.7	-14.4
Хлоробензен	-863.1	-104.7	-856.9	-101.6	-862.1	-103.9	-855.9	-100.8
Циклохексан	-769.8	3.8	-763.7	6.9	-770.1	-6.0	-764.0	-2.9
Диетилетар	-1015.4	-24.7	-1009.2	-21.5	-1015.8	-31.1	-1009.6	-28.0
DMF	-1110.7	-89.2	-1104.6	-86.1	-1111.2	-89.9	-1105.0	-86.7
DMSO	-1109.2	-54.5	-1103.0	-51.3	-1116.6	-62.5	-1110.4	-59.4
Етанол	-1070.7	-73.6	-1064.5	-70.4	-1071.3	-75.3	-1065.1	-72.2
Метанол	-1069.9	-79.3	-1063.7	-76.2	-1070.8	-81.4	-1064.6	-78.3
Нитробензен	-1013.8	-309.4	-1007.6	-306.3	-1015.2	-309.2	-1009.0	-306.1
Пентил етаноат	-1019.7	-61.7	-1013.5	-58.6	-1020.0	-63.1	-1013.8	-59.9
Хинолин	-1158.3	-203.3	-1152.1	-200.2	-1159.6	-202.1	-1153.4	-199.0
THF	-1045.7	-42.2	-1039.5	-39.0	-1045.9	-48.2	-1039.7	-45.0
Толуен	-938.3	-21.5	-932.1	-18.3	-939.1	-22.7	-932.9	-19.5
Вода	-1058.0	-100.1	-1051.8	-96.9	-1058.9	-102.0	-1052.7	-98.8

Резултати добијени на B3LYP/Aug-cc-pVTZ нивоу теорије су у доброј сагласности са резултатима које је добио Фифен, иако није коришћен исти солватациони модел.⁹⁶ Изузетак је $\Delta H_{\text{sol}}(\text{H}^+)$ вредност за бензен, која је сличнија резултатима које су добили Ротманова и њени сарадници.⁹⁷

Узимајући све чињенице у обзир, као и чињеницу да у неким случајевима B3LYP/Aug-cc-pVTZ модел даје значајно негативније вредности (које су, надамо се, сличније стварним вредностима) у односу на B3LYP/6-311++G(3df,3pd) ниво теорије, наша је препорука да се B3LYP/Aug-cc-pVTZ резултати користе у случају проучавања антиоксидативне активности засноване на термодинамичким параметрима.⁹⁹

Конформациона анализа неохлорогенске и криптохлорогенске киселине

Истраживања која се односе на кафеоилхинске киселине су углавном усмерена на експериментално проучавање **5CQA**.^{23,101} Логично је да се претпостави да ће и друга два изомера, **3CQA** и **4CQA**, да поседују одређене биолошке ефекте, укључујући и антиоксидативну активност. Ипак, има веома мало резултата који се односе на антиоксидативну активност ове две киселине.^{23,102} Познато је из експерименталних резултата да кафеинска и кафеоилхинске киселине показују сличну антиоксидативну активност.¹⁰³ Намеће се логичан задатак да се рачунски упореде антиоксидативне активности ове четири киселине и да се по могућству објасни ова појава.

Како бисмо упоредили антиоксидативну активност изомерних кафеоилхинских киселина, најпре је потребно да се утврди најстабилнији конформер преостала два изомера, **3CQA** и **4CQA**.⁷¹ Као и у случају **5CQA**, испитивање конформационог простора је извршено помоћу MMFF методе. Након пажљивог прегледања и одбацавања дупликата добијена је серија која садржи 273 најстабилнија конформера молекула **3CQA**, односно 321 најстабилнији конформер молекула **4CQA**. Ови конформери су најпре оптимизовани помоћу квантно механичке методе на ниском нивоу теорије, а затим су по двадесет најстабилнијих конформера из обе серије оптимизовани уз присуство фреквенционог рачуна на вишем нивоу теорије (Слике 22 и 23). У оба најстабилнија конформера је, као и у случају **5CQA**, карбоксилни водоник окренут ка кисеонику из суседне хидроксилне групе, а не ка карбоксилном кисеонику.

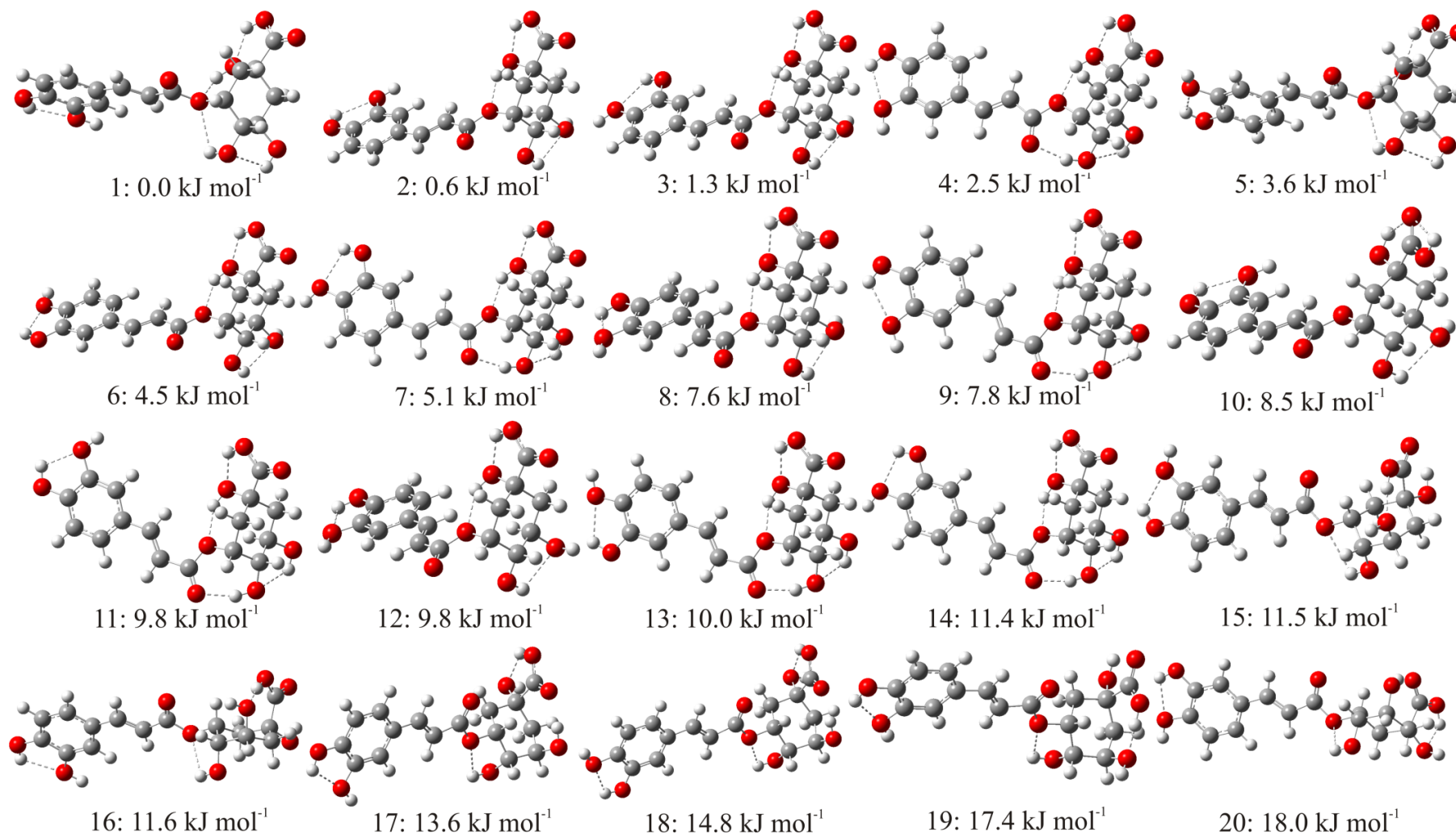
За најстабилније конформере молекула **3CQA** и **4CQA** израчуната су хемијска померања угљеникових атома у метанолу и упоређена су са експерименталним

вредностима пронађеним у литератури (Табела 13).²³ Као и у случају **5CQA** највећа одступања која се јављају између израчунатих и експерименталних вредности хемијских померања код обе изомерне киселине су уочена на атомима C2' и C6'. И у овим случајевима одступања се могу објаснити омогућеном ротацијом око C1'–C7' једноструке везе услед недостатка суседних водоничних веза које би фиксирале систем. Израчунати коефицијент корелације за оба изомера износи 0.997 док средња апсолутна грешка износи око 3 ppm. Добро слагање између експерименталних и симулираних ¹³C-NMR спектра указује да су и структуре молекула **3CQA** и **4CQA** исправно предвиђене.

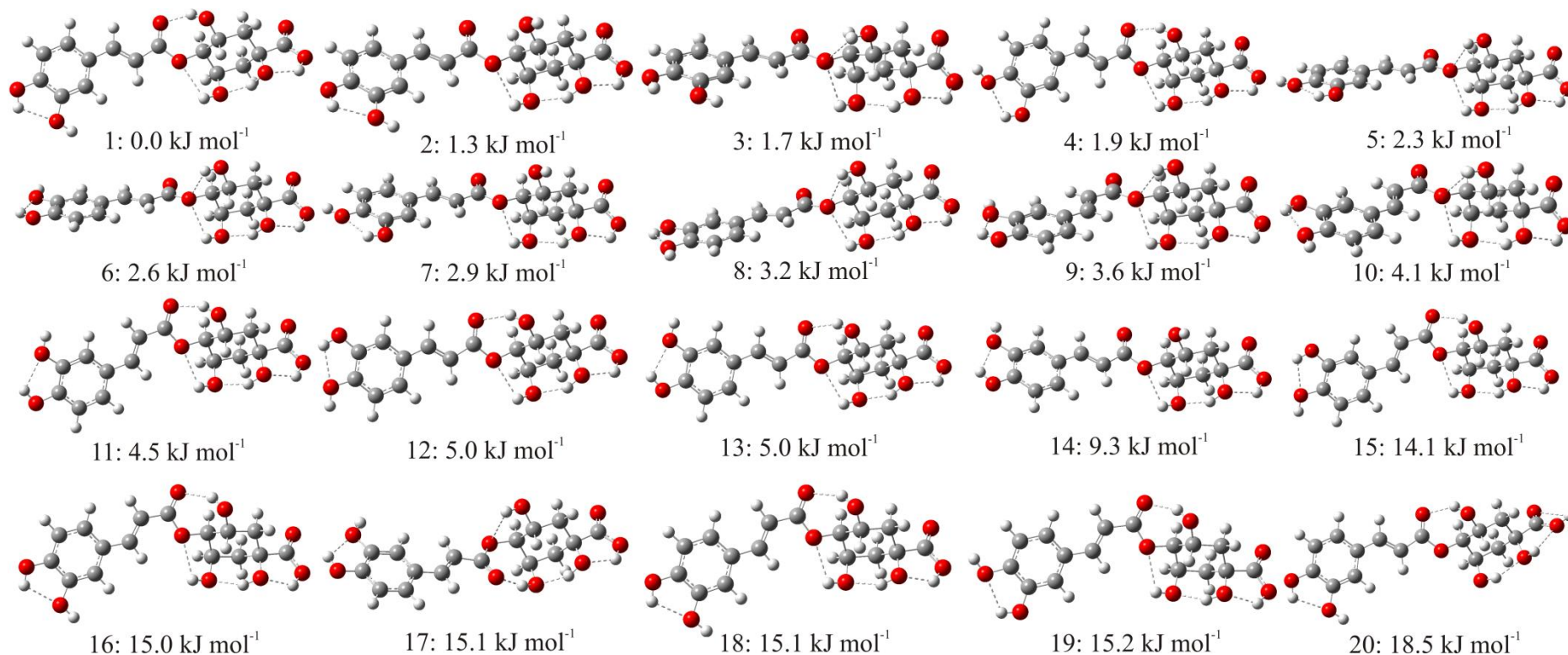
Табела 13. Израчунате и експерименталне вредности хемијских померања (ppm) молекула неохлорогенске и криптохлорогенске киселине у метанолу.

	3CQA		4CQA	
	Експ^a	Изр	Експ^a	Изр
C-2	36.70	39.44	38.40	39.47
C-6	41.50	41.90	42.70	45.76
C-5	68.50	70.97	65.50	69.20
C-3	73.00	75.72	69.60	74.33
C-1	74.80	77.71	76.60	79.93
C-4	75.40	80.60	79.30	80.99
C-2'	115.10	110.60	115.10	109.81
C-8'	115.80	109.23	115.40	109.94
C-5'	116.40	115.53	116.50	115.06
C-1'	127.90	127.15	127.80	126.46
C-6'	122.90	130.03	123.00	129.40
C-3'	146.79	144.32	146.80	143.03
C-4'	146.80	151.85	149.60	149.43
C-7'	149.40	150.05	147.10	150.65
C-9'	169.00	166.81	169.00	170.25
C-7	178.30	174.93	177.30	174.42

^aВредности су преузете из литературе²³



Слика 22. Двадесет најстабилнијих конформера неохлорогенске киселине са назначеним вредностима за релативне слободне енергије (kJ mol⁻¹). Резултати су добијени на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије у метанолу.



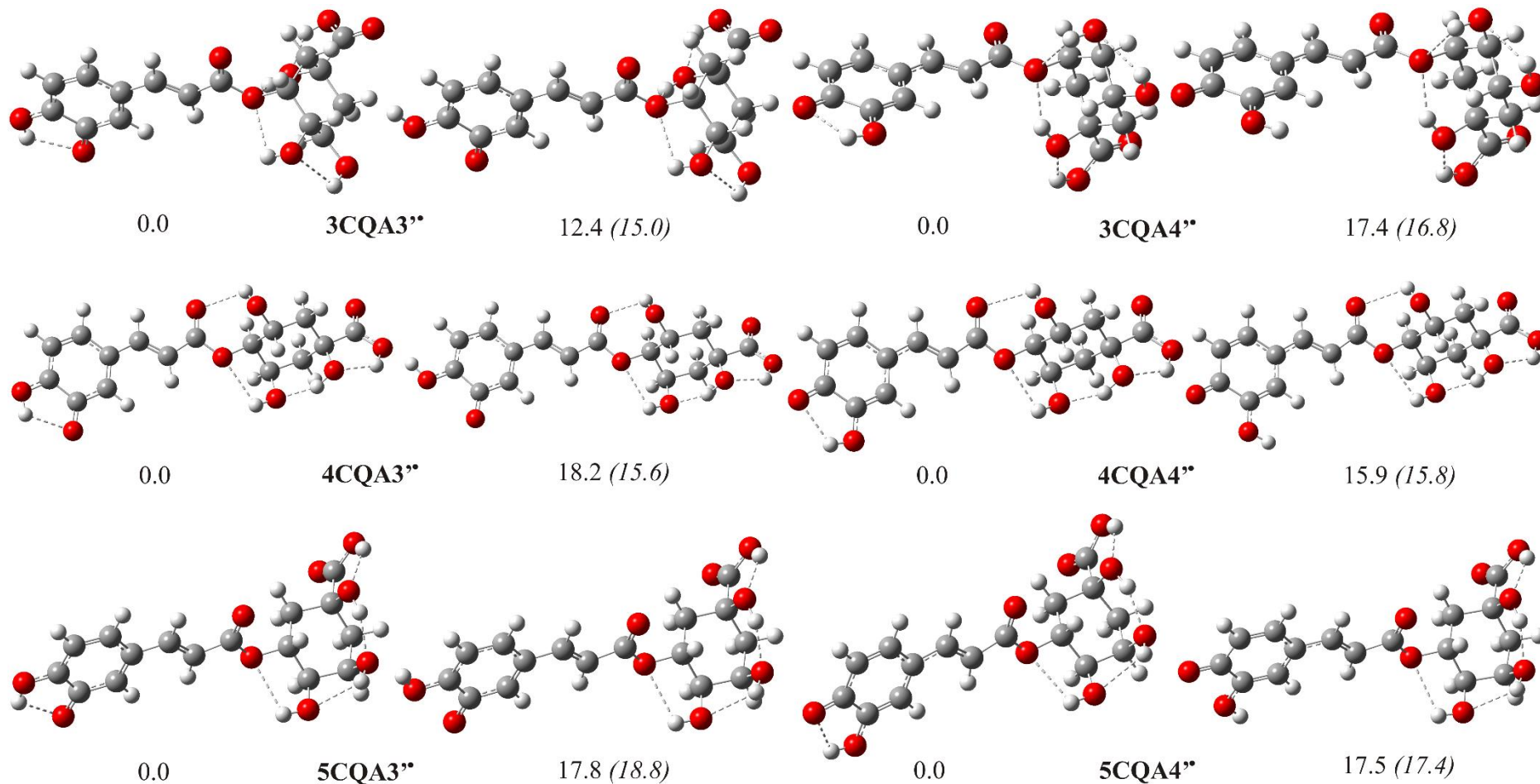
Слика 23. Двадесет најстабилнијих конформера криптохлорогенске киселине са назначеним вредностима за релативне слободне енергије (kJ mol⁻¹). Резултати су добијени на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије у метанолу.

Радикали, анјони и радикал катјони кафеинске и кафеоилхинских киселина

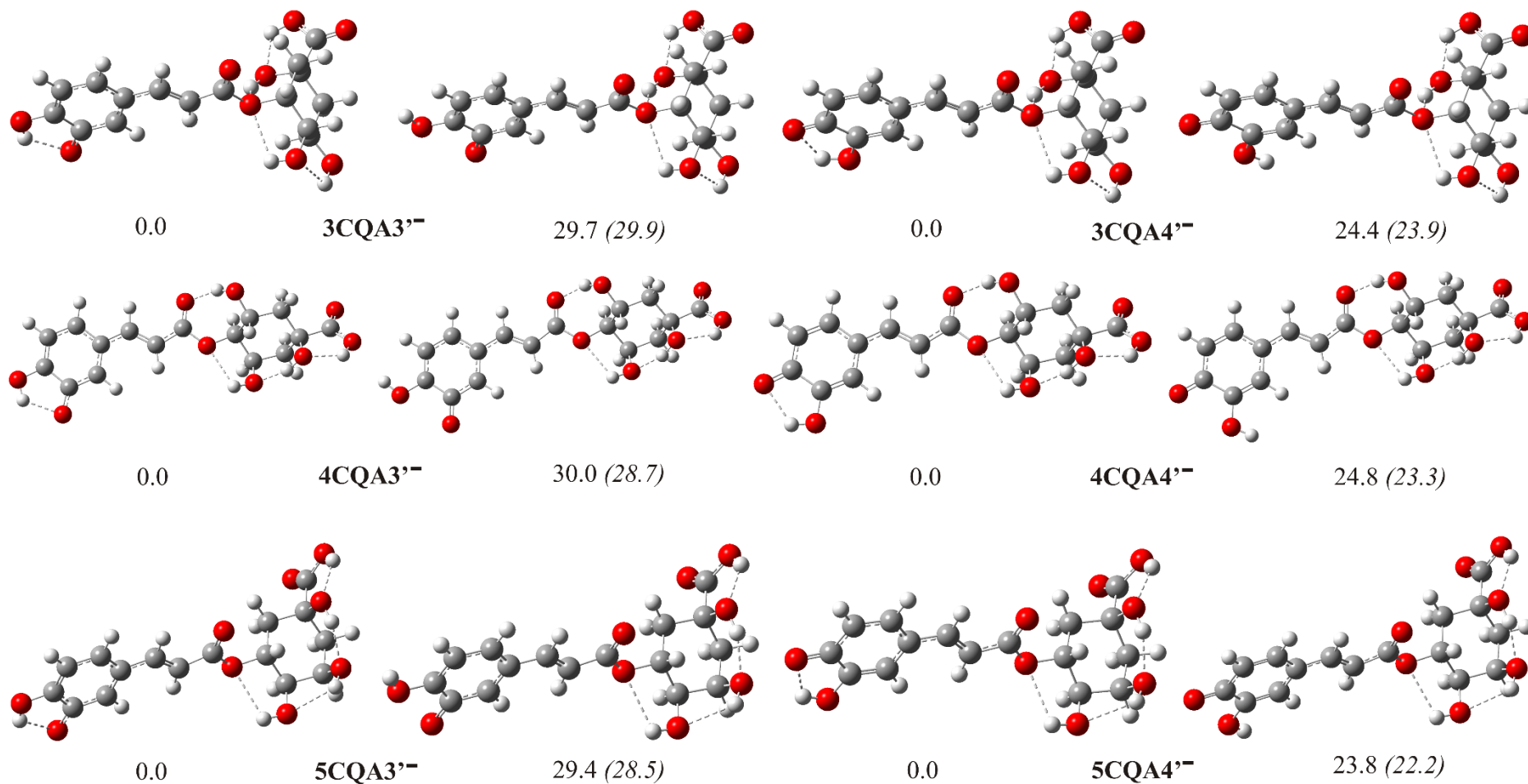
Радикали и анјони кафеинске и кафеоилхинских киселина настају хомолитичким и хетеролитичким раскидањем О–Н везе, док радикал катјони настају када молекул изгуби електрон. Хомолитичко раскидање О–Н везе у свакој од кафеоилхинских киселина води до настанка два радикала: $x\text{CQA}3^{\bullet}$ и $x\text{CQA}4^{\bullet}$ ($x = 3, 4$ или 5), при чему сваки радикал може да заузме две конформације (Слика 24). Слично, хетеролитичким раскидањем О–Н везе настају два анјона: $x\text{CQA}3^{-}$ и $x\text{CQA}4^{-}$ ($x = 3, 4$ или 5), при чему се анјони такође могу наћи у две конформације (Слика 25).⁷² Као што је и очекивано, ротамери који садрже водоничну везу на ароматичном прстену су значајно стабилнији, тако да ће се о њима даље дискутовати. На потпуно исти начин настају $\text{CA}3^{\bullet}$ и $\text{CA}4^{\bullet}$ радикали као и $\text{CA}3^{-}$ и $\text{CA}4^{-}$ анјони кафеинске киселине.

Релативне енталпије и слободне енергије радикала, анјона и радикал катјона насталих из кафеинске и кафеоилхинских киселина, као и самих киселина, дате су у Табелама 14 и 15. Из Табела 14 и 15 (као и са Слика 24 и 25) је очигледно да две потпуно различите методе дају веома упоредиве резултате. Треба нагласити да су вредности енергија приказаних у овим Табелама резултат изодезмичких процеса, тако да се у том случају очекује најмања грешка приликом прорачуна. Такође, вредности за одговарајуће енталпије и слободне енергије су међусобно врло сличне, што је последица прилично уједначеног доприноса ентропије (око 0.7 kJ mol^{-1}) слободној енергији.

Односи у релативним енталпијама, као и слободним енергијама, показују да је редослед стабилности у одређеном растварачу следећи: $5\text{CQA} > 4\text{CQA} > 3\text{CQA}$. Овакав редослед се може објаснити чињеницом да О–Н \cdots О ланац у молекулима 5CQA и 4CQA садржи четири, односно три водоничне везе, док у случају молекула 3CQA постоје два ланца која садрже по две водоничне везе. Стабилност свих испитиваних врста, укључујући и саме киселине, расте са порастом поларности растварача, тј. са повећањем јачине интермолекулских водоничних веза. Као што је и очекивано, стабилизација у поларним растварачима, метанолу и води, израженија је у случају наелектрисаних врста, радикал катјона и анјона.



Слика 24. Ротамери радикала изведених из кафеоилхинских киселина у метанолу. За сваки пар конформера су представљене разлике у слободним енергијама (kJ mol⁻¹) израчунате помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела су представљени фонтом *Italic*.



Слика 25. Ротамери анјона изведених из кафеоилхинских киселина у метанолу. За сваки пар конформера су представљене разлике у слободним енергијама (kJ mol^{-1}) израчунате помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела су представљени фонтом *Italic*.

Табела 14. Релативне енталпије^a кафеинске и кафеилхинских киселина, њихових радикала, анјона и радикал катјона у три различита растварача израчунатих помоћу ВЗLYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела (kJ mol⁻¹). Резултати израчунати на М06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије су приказани у фонту *Italic*.

	СА	СА3 [•]	СА4 [•]	СА3 ⁻	СА4 ⁻	СА ^{+•}
бензен	0.0	0.0	-11.1	0.0	-18.8	0.0
	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>	<i>-9.3</i>	<i>0.0</i>	<i>-17.4</i>	<i>0.0</i>
метанол	-18.0	-15.9	-26.7	-85.8	-100.5	-89.5
	<i>-18.3</i>	<i>-16.0</i>	<i>-25.0</i>	<i>-89.2</i>	<i>-102.0</i>	<i>-91.6</i>
вода	-18.9	-16.7	-27.5	-89.7	-104.2	-93.5
	<i>-19.1</i>	<i>-16.8</i>	<i>-25.7</i>	<i>-93.2</i>	<i>105.8</i>	<i>-95.7</i>
	3CQA	3CQA3 ^{••}	3CQA4 ^{••}	3CQA3 ^{'-}	3CQA4 ^{'-}	3CQA ^{+•}
бензен	0.0	0.0	-10.3	0.0	-21.6	0.0
	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>	<i>-8.8</i>	<i>0.0</i>	<i>-21.2</i>	<i>0.0</i>
метанол	-35.0	-34.0	-44.5	-89.5	-105.4	-118.0
	<i>-34.6</i>	<i>-32.8</i>	<i>-41.7</i>	<i>-92.4</i>	<i>-106.8</i>	<i>-116.6</i>
вода	-36.7	-35.6	-46.1	-93.6	-109.3	-123.4
	<i>-36.2</i>	<i>-34.4</i>	<i>-43.3</i>	<i>-96.6</i>	<i>-110.8</i>	<i>-122.0</i>
	4CQA	4CQA3 ^{••}	4CQA4 ^{••}	4CQA3 ^{'-}	4CQA4 ^{'-}	4CQA ^{+•}
бензен	-6.3	-7.4	-18.1	-7.3	-29.4	-16.8
	<i>-7.3</i>	<i>-8.6</i>	<i>-17.2</i>	<i>-5.5</i>	<i>-26.7</i>	<i>-16.2</i>
метанол	-39.6	-38.0	-48.7	-95.4	-112.3	-124.6
	<i>-40.0</i>	<i>-38.9</i>	<i>-47.8</i>	<i>-97.4</i>	<i>-112.3</i>	<i>-124.8</i>
вода	-41.4	-39.4	-50.2	-99.5	-116.1	-129.5
	<i>-41.6</i>	<i>-40.4</i>	<i>-49.3</i>	<i>-101.7</i>	<i>-116.3</i>	<i>-129.8</i>
	5CQA	5CQA3 ^{••}	5CQA4 ^{••}	5CQA3 ^{'-}	5CQA4 ^{'-}	5CQA ^{+•}
бензен	-13.9	-15.7	-26.6	-4.7	-24.3	-26.4
	<i>-14.5</i>	<i>-16.0</i>	<i>-25.5</i>	<i>-5.5</i>	<i>-23.9</i>	<i>-25.8</i>
метанол	-45.1	-45.3	-56.1	-97.9	-112.5	-132.3
	<i>-45.9</i>	<i>-45.4</i>	<i>-54.7</i>	<i>-102.3</i>	<i>-115.3</i>	<i>-132.0</i>
вода	-46.5	-46.7	-57.5	-102.2	-116.6	-137.1
	<i>-47.4</i>	<i>-46.8</i>	<i>-56.1</i>	<i>-106.7</i>	<i>-119.5</i>	<i>-136.9</i>

^a Енталпије молекула су израчунате у односу на молекул СА (3CQA) у бензену; енталпије радикала су израчунате у односу на СА3[•] (3CQA3^{••}) радикал у бензену; енталпије анјона су израчунате у односу на СА3⁻ (3CQA3^{'-}) анјон у бензену; енталпије радикал катјона су израчунате у односу на СА^{+•} (3CQA^{+•}) радикал катјон у бензену.

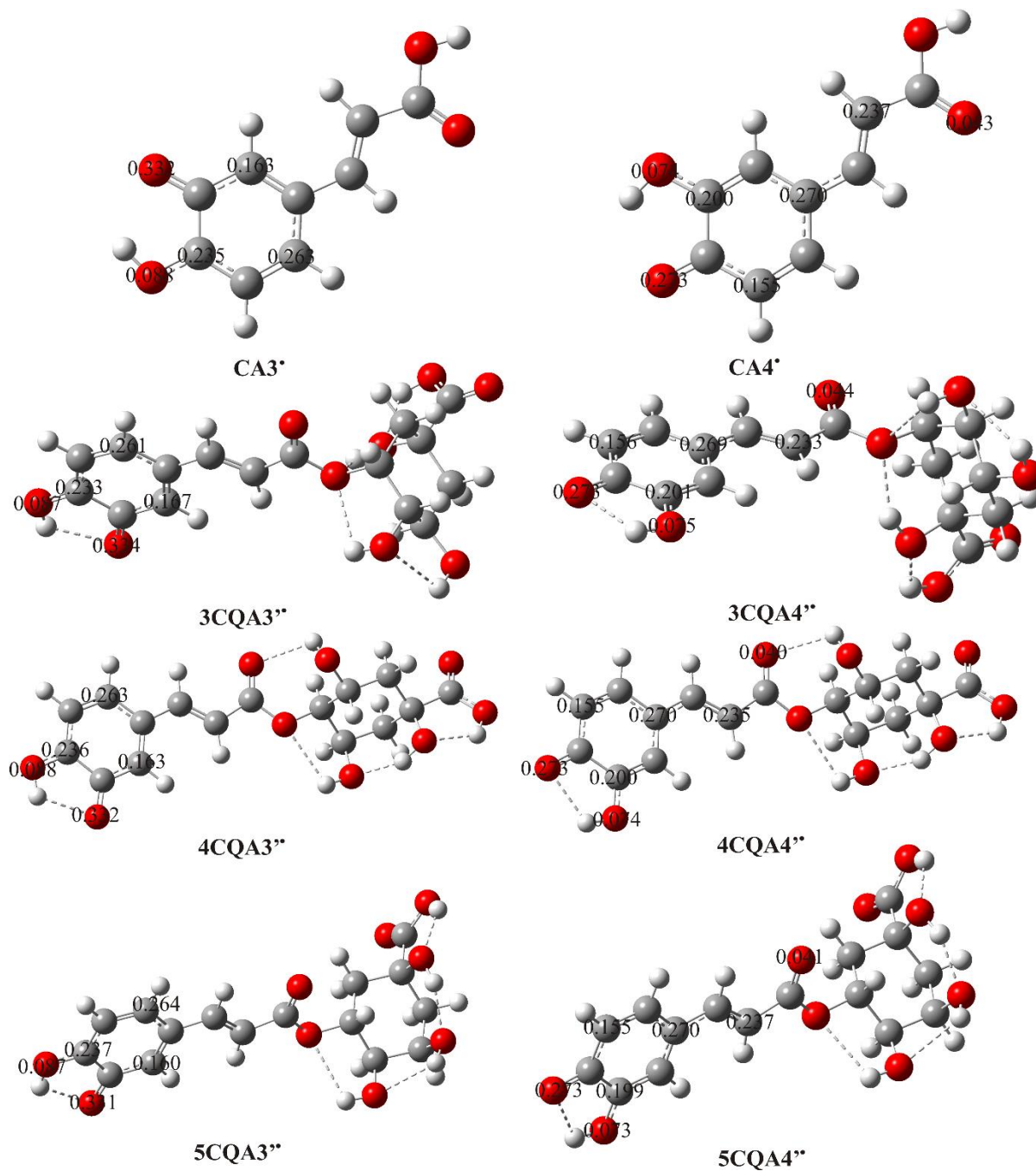
У одређеном растварачу радикали, анјони и радикал катјони проистекли из молекула 5CQA, стабилнији су од оних који су проистекли из молекула 4CQA, а они су даље стабилнији од оних проистеклих из молекула 3CQA. СА4[•] и хCQA4^{••} радикали и СА4⁻ и хCQA4^{'-} анјони су у одређеном растварачу стабилнији од одговарајућих СА3[•] и хCQA3^{••} радикала и СА3⁻ и хCQA3^{'-} анјона. Логично је да се претпостави да је овакво понашање последица боље делокализације неспареног електрона и негативног наелектрисања у СА4[•] и хCQA4^{••} радикалима и СА4⁻ и

$x\text{CQA}^{4-}$ анјонима. Претпоставка је и потврђена након детаљно урађене NBO анализе. Показало се да спинска густина у одређеном радикалу, као и расподела наелектрисања у одређеном анјону, не зависе много од поларности растварача. Резултати NBO анализе су приказани на Сликама 26–30.

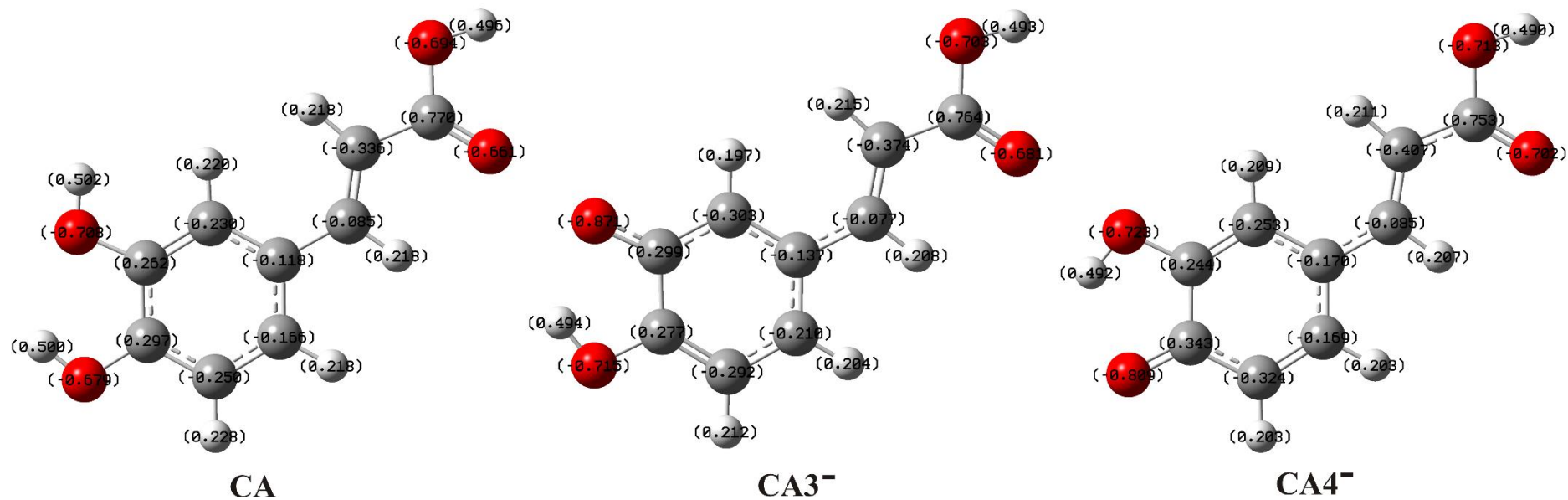
Табела 15. Релативне слободне енергије^a кафеинске и кафеоилхинских киселина, њихових радикала, анјона и радикал катјона у три различита растварача израчунатих помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела (kJ mol^{-1}). Резултати израчунати на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије су приказани у фонту *Italic*.

	CA	CA3*	CA4*	CA3 ⁻	CA4 ⁻	CA ^{+*}
бензен	0.0	0.0	-9.1	0.0	-17.7	0.0
	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>	<i>-9.1</i>	<i>0.0</i>	<i>-17.7</i>	<i>0.0</i>
метанол	-17.8	-16.0	-25.0	-85.8	-99.7	-89.7
	<i>-17.6</i>	<i>-15.7</i>	<i>-24.9</i>	<i>-88.9</i>	<i>-100.1</i>	<i>-93.6</i>
вода	-18.6	-16.7	-25.8	-89.7	-103.3	-93.7
	<i>-18.4</i>	<i>-16.5</i>	<i>-25.6</i>	<i>-92.9</i>	<i>103.9</i>	<i>-98.7</i>
	3CQA	3CQA3**	3CQA4**	3CQA3 ⁻	3CQA4 ⁻	3CQA ^{+*}
бензен	0.0	0.0	-9.3	0.0	-21.4	0.0
	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>	<i>-8.8</i>	<i>0.0</i>	<i>-21.0</i>	<i>0.0</i>
метанол	-36.7	-33.9	-45.7	-91.9	-107.2	-113.8
	<i>-35.1</i>	<i>-30.8</i>	<i>-40.5</i>	<i>-93.8</i>	<i>-107.0</i>	<i>-114.5</i>
вода	-38.2	-35.4	-47.3	-96.2	-111.2	-119.1
	<i>-36.7</i>	<i>-32.4</i>	<i>-42.2</i>	<i>-98.2</i>	<i>-111.0</i>	<i>-119.8</i>
	4CQA	4CQA3**	4CQA4**	4CQA3 ⁻	4CQA4 ⁻	4CQA ^{+*}
бензен	-10.5	-8.0	-16.7	-5.8	-27.5	-15.9
	<i>-4.4</i>	<i>-6.8</i>	<i>-12.9</i>	<i>-3.1</i>	<i>-23.8</i>	<i>-12.4</i>
метанол	-39.8	-40.7	-48.7	-95.9	-112.1	-120.5
	<i>-36.7</i>	<i>-35.3</i>	<i>-43.3</i>	<i>-95.9</i>	<i>-110.5</i>	<i>-122.1</i>
вода	-42.0	-41.3	-50.1	-100.0	-116.0	-125.3
	<i>-38.2</i>	<i>-36.7</i>	<i>-44.8</i>	<i>-100.2</i>	<i>-114.6</i>	<i>-127.0</i>
	5CQA	5CQA3**	5CQA4**	5CQA3 ⁻	5CQA4 ⁻	5CQA ^{+*}
бензен	-12.6	-14.3	-24.2	-4.3	-24.1	-22.8
	<i>-13.3</i>	<i>-14.7</i>	<i>-24.1</i>	<i>-3.9</i>	<i>-22.1</i>	<i>-23.4</i>
метанол	-43.5	-44.4	-54.0	-98.4	-112.6	-127.9
	<i>-43.8</i>	<i>-44.2</i>	<i>-52.9</i>	<i>-102.1</i>	<i>-114.5</i>	<i>-128.5</i>
вода	-44.9	-45.8	-55.4	-102.8	-116.7	-132.7
	<i>-45.3</i>	<i>-45.5</i>	<i>-54.3</i>	<i>-106.7</i>	<i>-118.8</i>	<i>-133.3</i>

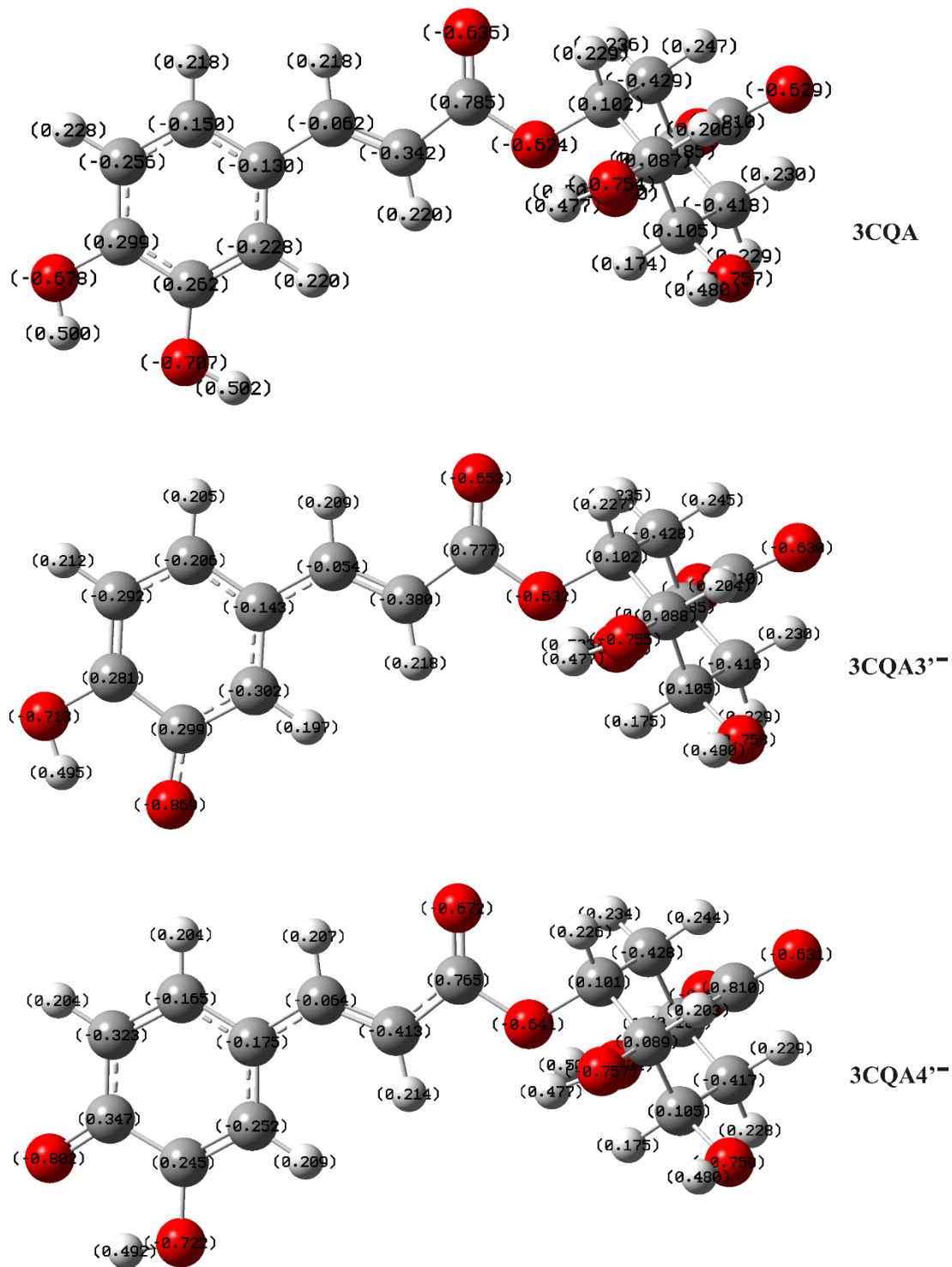
^a Слободне енергије молекула су израчунате у односу на молекул CA (3CQA) у бензену; слободне енергије радикала су израчунате у односу на CA3* (3CQA3**) радикал у бензену; слободне енергије анјона су израчунате у односу на CA3⁻ (3CQA3⁻) анјон у бензену; слободне енергије радикал катјона су израчунате у односу на CA^{+*} (3CQA^{+*}) радикал катјон у бензену.



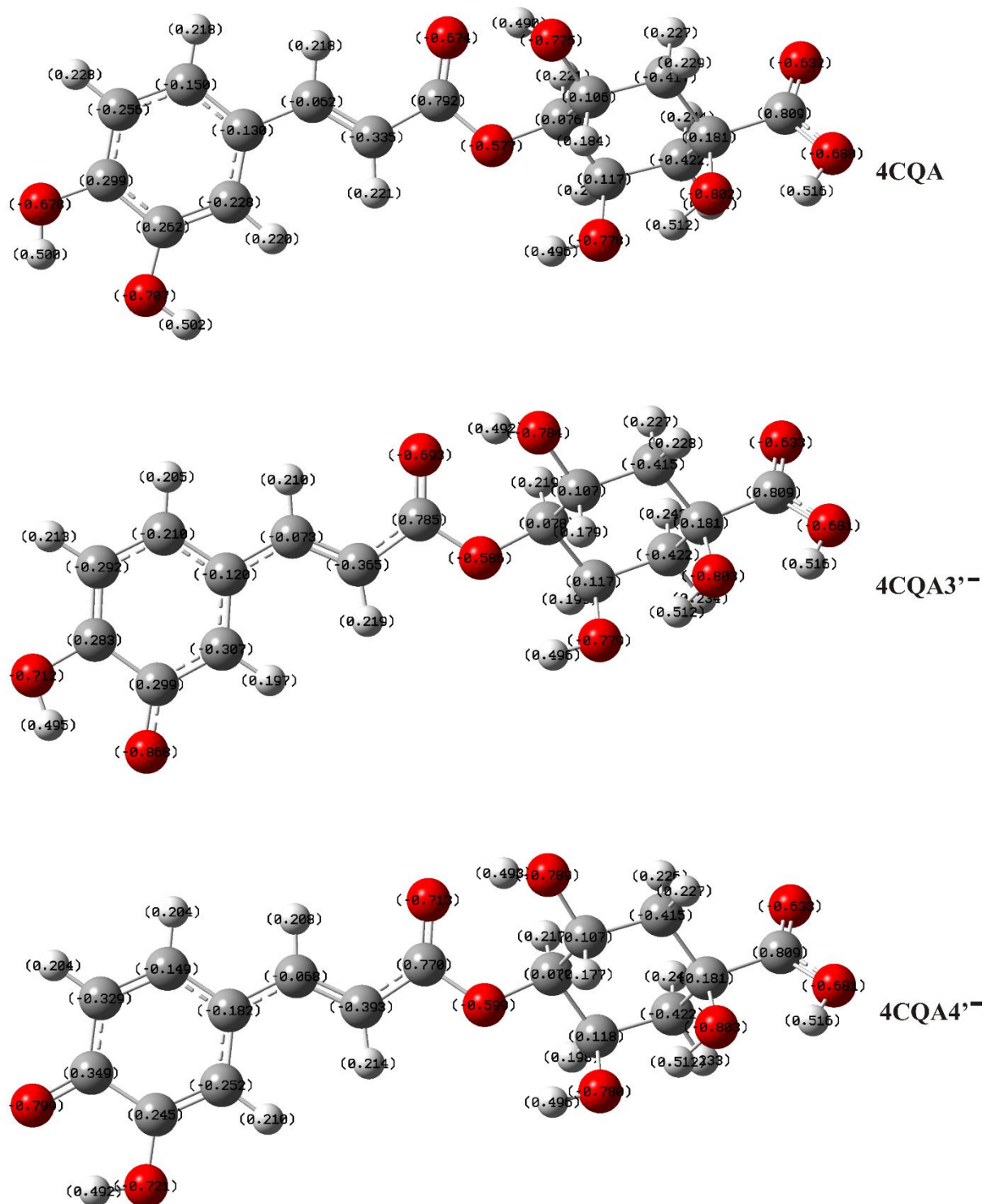
Слика 26. Распореда спинске густине у радикалима изведеним из кафеинске, неохлорогенске, криптохлорогенске и хлорогенске киселине у метанолу израчуната на V3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.



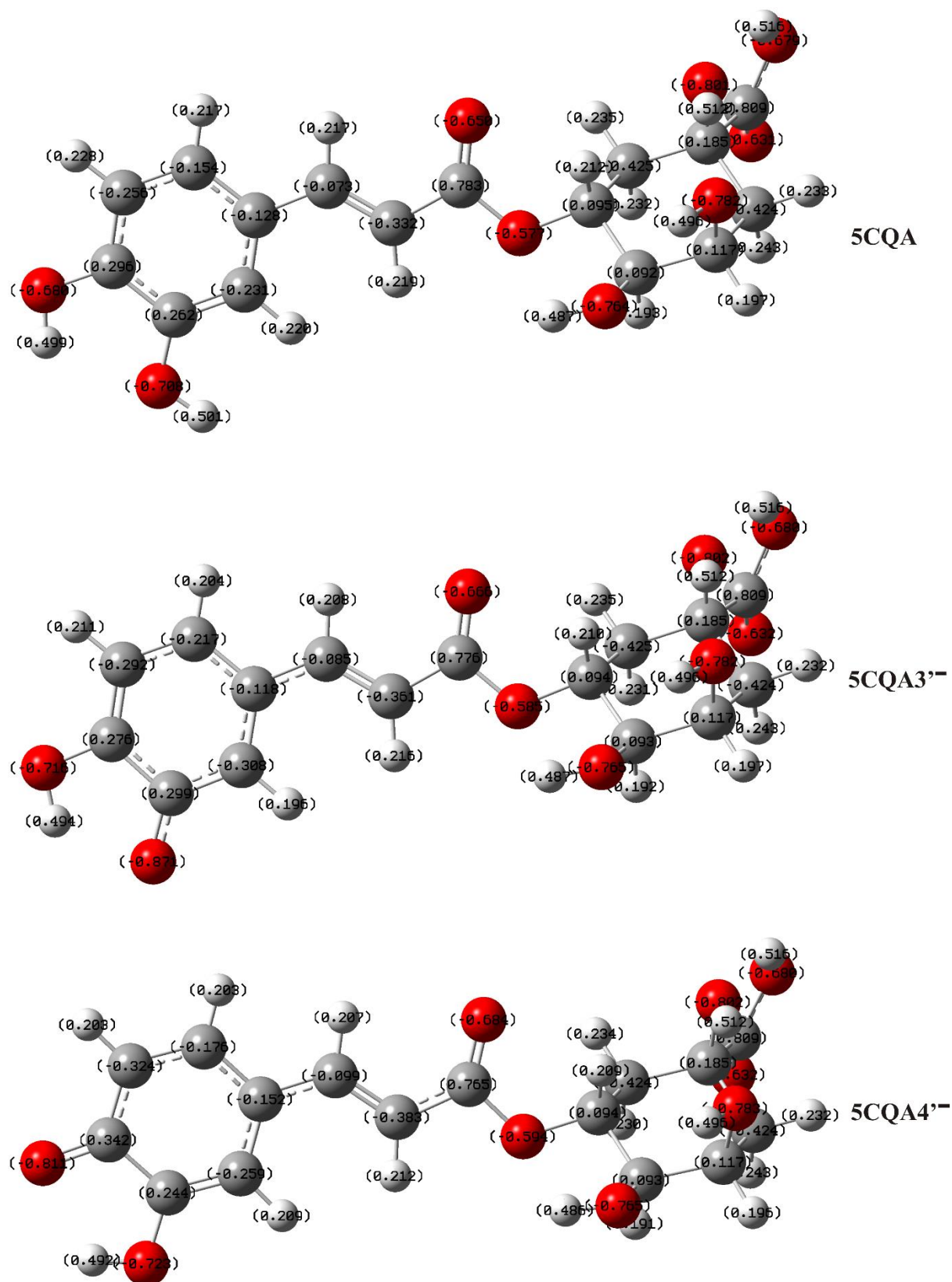
Слика 27. Распдела NBO наелектрисања у кафеинској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.



Слика 28. Распдела NBO наелектрисања у неохлорогенској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на V3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.



Слика 29. Распдела NBO наелектрисања у криптохлорогенској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.

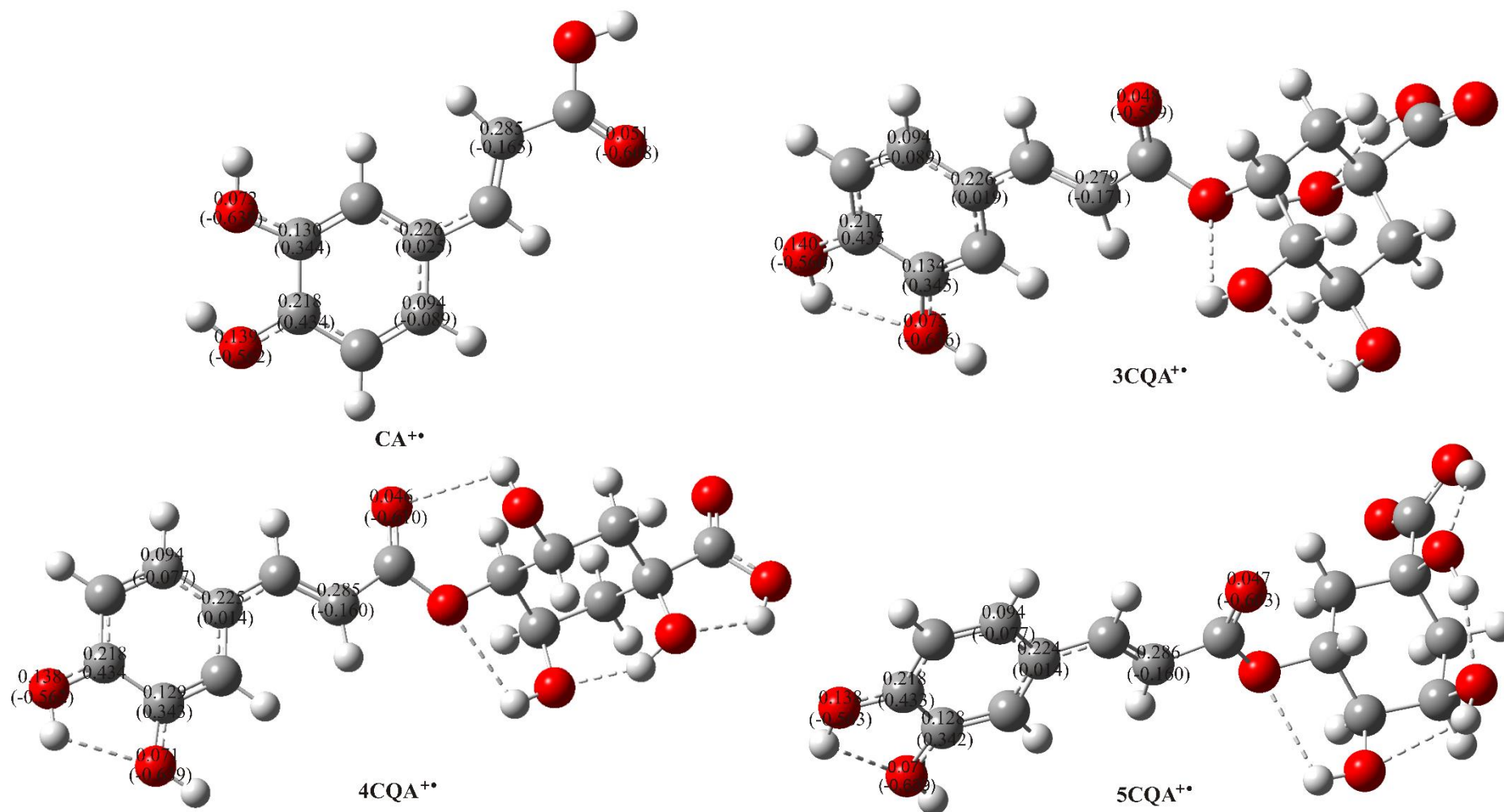


Слика 30. Распдела NBO наелектрисања у хлорогенској киселини и одговарајућим анјонима израчуната на B3LYP-D2/6-311++G(d,p) нивоу теорије.

Слика 26 открива да је у CA3^\bullet и xCQA3^\bullet радикалима спинска густина делокализована преко *орто* и *пара* угљеникових атома у односу на атом C3 у CA3^\bullet , односно C3' у xCQA3^\bullet , и преко оба кисеоника на ароматичном прстену, док је у CA4^\bullet и xCQA4^\bullet радикалима делокализацијом захваћен и ациклични ланац, прецизније C8 и O9 (C8' и O9') атоми. Слична је ситуација и са анјонима. Уколико упоредимо NBO наелектрисања на Сликама 27–30 долазимо до закључка да је у случају CA3^- и xCQA3^- анјона парцијално негативно наелектрисање увећано на оба кисеоникова атома у ароматичном прстену, на *орто* угљениковом атому везаном за водоник и *пара* угљениковом атому у односу на C3 (C3') атом. У CA4^- и xCQA4^- поред кисеоникових атома у ароматичном прстену, *орто* угљениковог атома везаног за водоник и *пара* угљениковог атома у односу на C4 (C4'), парцијално негативно наелектрисање је повећано и на C8 и O9 (C8' и O9') атомима. У случају *орто* угљеникових атома који су везани за хидроксилне групе у CA3^- , xCQA3^- , CA4^- и xCQA4^- анјонима долази до благог смањивања позитивног наелектрисања што се може приписати негативном индуктивном ефекту атома кисеоника.

Када се све чињенице узму у обзир, може се закључити да су у случају кафеоилхинских киселина најмање стабилни 3CQA3^\bullet радикал и 3CQA3^- анјон у бензену, док су најстабилнији 5CQA4^\bullet радикал и 5CQA4^- у води.

Радикал катјони настали из кафеинске и три изомерне кафеоилхинске киселине су приказани на Слици 31. У сваком од ових радикал катјона неспарени електрон је делокализован преко ароматичног прстена, кисеоникових атома на ароматичном прстену и C8 и O9 (C8' и O9') атома. Када се упореде NBO наелектрисања радикал катјона и самих киселина (Слике 27–31) очигледно је да су електрон дефицитарни атоми радикал катјона претрпели или смањење негативног наелектрисања или повећање позитивног наелектрисања.



Слика 31. Оптимизоване структуре радикал катјона кафеинске и кафеоилхинских киселина у метанолу. Вредности спинске густине као и карактеристична NBO наелектрисања су израчуната помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела.

Антиоксидативни механизми кафеинске и кафеоилхинских киселина

На основу једначина (34) – (38) израчунати су термодинамички параметри за све четири испитиване киселине (Табела 16). Као што је већ и написано, енталпије BDE, IP и PDE, и PA и ETE могу да се искористе за термодинамичко описивање НАТ, SET-РТ и SPLET антиоксидативних механизма. Упоредивањем ових вредности може се закључити који је од испитиваних антиоксидативних путева најдоминантнији. Наиме, уколико је одређени реакциони пут окарактерисан најнижом вредношћу за енталпију реакције, може се претпоставити да ће преовладати антиоксидативни механизам коме одговара тај реакциони пут.

Из Табеле 16 се види да, за разлику од резултата приказаних у Табелама 14 и 15, слагање између резултата добијених помоћу две методе није тако идеално. Разлог је свакако у чињеници да вредности у Табели 16 представљају енталпије неизодезмичких реакција, при чему се у обзир узимају и енталпије солватисаног протона и електрона, тако да се и очекују веће грешке приликом прорачуна. Иако постоје извесне нумеричке разлике, трендови које показују резултати добијени помоћу две различите методе су исти. Најзначајнији резултат је да су вредности реакционих енталпија за све четири фенолне киселине веома сличне. Дакле, без обзира на то преко којег механизма остварују активност, СА и кафеоилхинске киселине имају веома сличне антиоксидативне особине.⁷¹ Ово откриће је у сагласности са експерименталним резултатима добијеним применом DPPH, ABTS и FRAP тестова, као и хелирањем металних јона и анализом избељивања β -каротена.¹⁰³ Може се закључити да су антиоксидативни капацитети све четири киселине упоредиви због тога што су особине хидроксициментог дела у радикалима, анјонима и радикал катјонима веома сличне и не зависе од положаја у којем је извршена естерификација.

Као што је и очекивано, енталпије реакције (29), тј. BDE вредности, практично не зависе од поларности растварача зато што стабилизација и молекула и његовог радикала у различитим растварачима прати сличан тренд (Табеле 14 и 15). Из истог разлога, тј. зато што анјон и електрон у различитим растварачима прате сличан тренд, ETE вредности, тј. енталпије реакције (31), такође имају упоредиве вредности. На пример, $3\text{CQA}3^{\cdot-}$ и електрон су за 93.6 kJ mol^{-1} (Табела 14) и 84.4 kJ mol^{-1} (Табела 12) стабилнији у води него у бензену. Са друге стране, енталпије реакција (30), (32) и (33)

у којима су присутне наелектрисане врсте, IP, PDE и PA вредности су драстично мање у поларним растварачима метанолу и води него у бензену.

Први корак SET-PT механизма је изражено ендотерман, чак и у поларним растварачима, док је други корак енергетски мање захтеван, и чак постаје егзотерман у метанолу и води. Међутим, на основу веома високих IP вредности може се претпоставити да ни једна од испитиваних киселина не подлеже SET-PT механизму без обзира у којем растварачу се одвија реакција. BDE вредности у бензену су мање од PA и ETE вредности, што указује на то да ће у случају када се реакција одвија у неполарном растварачу доминантан бити HAT механизам. Са друге стране, у метанолу и води су PA вредности знатно мање у односу на BDE, док су ETE вредности нешто више, али су ипак упоредиве са BDE вредностима. На основу овог резултата се може закључити да ће у случају поларних растварача HAT и SPLET механизми бити компетитивни.

Наведене претпоставке је свакако неопходно потврдити и кинетичким испитивањима. Наиме, неки термодинамички неповољни процеси могу да захтевају минималне енергије активације. Из тог разлога не треба из даљег испитивања одбацити ендотермне процесе у којима су реакционе енталпије мање од $40\text{--}45 \text{ kJ mol}^{-1}$.¹⁰⁴ Овакво резонување је посебно важно у случају када се посматра разлика у реактивности између 3' и 4' положаја. Уколико се упореде реакционе енталпије, независно од реакционог механизма или поларности растварача, реакције у положају 4' су повољније од реакција у положају 3', углавном зато што су $x\text{CQA4}^{\bullet}$ и $x\text{CQA-A4}^{\bullet}$ стабилнији од $x\text{CQA3}^{\bullet}$ и $x\text{CQA3}^{\bullet}$. Међутим, реакције у положају 3' су веома мало ендотермније од оних у положају 4', тако да је могуће да је енергија активације, односно кинетика реакције, пресудни фактор за одређивање најповољнијег положаја.

У литератури постоји неколико радова који су се бавили теоријским испитивањем антиоксидативне активности SA и кафеолихинских киселина. Леополдини (Leopoldini) и њени сарадници су вршили кинетичка испитивања антиоксидативне активности SA, док су испитивања Гонсалеса Мое (González Moa) и Чена (Chen) фокусирана на термодинамичко испитивање антиоксидативних механизма полифенола укључујући и SA у гасовитој фази и SA и 5CQA у различитим растварачима.^{105–107}

Табела 16. Термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) који описују антиоксидативне механизме за кафеинску и кафеоилхинске киселине у различитим растварачима израчунати помоћу B3LYP-D2/6-311++G(d,p) теоријског модела. Резултати добијени помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела су приказани у фонту *Italic*.

Положај	БЕНЗЕН					МЕТАНОЛ					ВОДА				
	НАТ	SET-PT		SPLET		НАТ	SET-PT		SPLET		НАТ	SET-PT		SPLET	
	BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE
	СА														
3'	321.1		79.8	361.3	359.3	323.3		-9.6	124.9	368.0	323.4		5.7	133.7	350.8
	<i>343.4</i>	<i>640.7</i>	<i>63.1</i>	<i>367.9</i>	<i>364.3</i>	<i>345.7</i>	<i>502.5</i>	<i>-24.3</i>	<i>128.3</i>	<i>376.4</i>	<i>345.8</i>	<i>478.7</i>	<i>-8.9</i>	<i>136.8</i>	<i>359.4</i>
4'	309.6	<i>669.1</i>	68.3	341.8	367.2	312.1	<i>529.0</i>	-20.8	109.6	372.1	312.2	<i>505.1</i>	-5.5	118.6	354.7
	<i>333.7</i>		<i>53.4</i>	<i>349.8</i>	<i>372.7</i>	<i>336.4</i>		<i>-33.6</i>	<i>115.0</i>	<i>380.4</i>	<i>336.5</i>		<i>-18.1</i>	<i>123.8</i>	<i>363.1</i>
	3CQA														
3'	322.9		66.9	345.9	376.5	323.9		-11.7	123.4	370.2	324.0		4.1	132.7	352.3
	<i>345.0</i>	<i>655.4</i>	<i>55.4</i>	<i>352.4</i>	<i>381.4</i>	<i>346.8</i>	<i>505.3</i>	<i>-23.4</i>	<i>126.4</i>	<i>379.4</i>	<i>346.9</i>	<i>480.9</i>	<i>-7.5</i>	<i>135.5</i>	<i>361.7</i>
4'	312.2	<i>678.3</i>	56.2	323.4	388.2	313.0	<i>529.1</i>	-22.6	106.8	375.9	313.1	<i>504.7</i>	-6.8	116.4	357.7
	<i>335.8</i>		<i>46.3</i>	<i>330.4</i>	<i>394.2</i>	<i>337.6</i>		<i>-32.6</i>	<i>111.4</i>	<i>385.2</i>	<i>337.6</i>		<i>-16.7</i>	<i>120.9</i>	<i>367.1</i>
	4CQA														
3'	321.7		76.7	344.9	376.3	324.6		-8.9	122.0	372.3	325.0		6.6	131.5	354.5
	<i>343.6</i>	<i>644.5</i>	<i>63.4</i>	<i>354.2</i>	<i>378.2</i>	<i>346.1</i>	<i>503.2</i>	<i>-21.2</i>	<i>126.8</i>	<i>378.3</i>	<i>346.2</i>	<i>479.5</i>	<i>-5.6</i>	<i>135.8</i>	<i>360.8</i>
4'	310.7	<i>669.0</i>	65.6	321.8	388.3	313.5	<i>526.3</i>	-20.1	104.4	378.7	313.8	<i>502.2</i>	-4.6	114.2	366.7
	<i>334.7</i>		<i>54.5</i>	<i>332.2</i>	<i>391.2</i>	<i>336.9</i>		<i>-30.4</i>	<i>111.3</i>	<i>384.5</i>	<i>337.0</i>		<i>-14.9</i>	<i>120.7</i>	
	5CQA														
3'	321.0		77.9	355.4	365.0	322.7		-8.5	125.1	367.3	322.8		7.0	134.0	349.8
	<i>343.4</i>	<i>642.5</i>	<i>65.6</i>	<i>361.7</i>	<i>370.5</i>	<i>345.5</i>	<i>500.8</i>	<i>-20.5</i>	<i>127.9</i>	<i>376.6</i>	<i>345.6</i>	<i>476.8</i>	<i>-4.9</i>	<i>136.7</i>	<i>359.3</i>
4'	309.7	<i>666.6</i>	66.7	335.0	374.1	311.4	<i>524.9</i>	-19.7	109.8	371.3	311.5	<i>500.9</i>	-4.3	119.0	353.5
	<i>333.6</i>		<i>55.8</i>	<i>342.7</i>	<i>379.7</i>	<i>335.8</i>		<i>-30.1</i>	<i>114.3</i>	<i>380.5</i>	<i>335.9</i>		<i>-14.6</i>	<i>123.4</i>	<i>362.9</i>

BDE вредности за **CA** у гасовитој фази израчунате на B3LYP/6-311++G(2d,2p)6d нивоу теорије¹⁰⁶ су упоредиви са нашим резултатима,⁷¹ док су IP вредности у гасовитој фази значајно веће него у било ком растварачу, укључујући и бензен. Такав резултат је очекиван зато што су, као што је већ написано, BDE вредности независне од поларности растварача, док IP вредности веома зависе од поларности растварача. Уколико упоредимо наше резултате за бензен и воду са резултатима које су добили Чен и његови сарадници, израчунатим на B3LYP/6-311++G(d,p) нивоу теорије,¹⁰⁷ увиђају се значајна одступања. Најјучљивија разлика је у PA и PDE вредностима, при чему су наше PA вредности за молекуле **CA** и **5CQA** између оних које су добили Чен и сарадници, док су нам PDE вредности драстично мање. Према Ченовим резултатима, све вредности термодинамичких параметара (изузев IP вредности) израчунате за молекуле **CA** и **5CQA** се драстично разликују.¹⁰⁷ Њихови резултати нису у сагласности са експериментално доказаном чињеницом да **CA** и кафеоилхинске киселине остварују врло сличну антиоксидативну активност.¹⁰³ Како су укупне реакције код SPLET и SET-PT механизма једнаке, зборови PA + ETE и IP + PDE морају бити једнаки. У случају резултата који су добили Чен и сарадници није тако. На пример, за молекул **CA** у бензену PA + ETE = 746.8 kJ mol⁻¹, док је IP + PDE = 864.0 kJ mol⁻¹. Сва ова опажања објашњавају разлику у нашим резултатима и резултатима које су објавили Чен и његови сарадници.^{71,107}

Утицај слободних радикала на антиоксидативну активност хлорогенске киселине

Следећи корак у испитивању антиоксидативних механизма подразумева проучавање реакција у присуству слободних радикала.

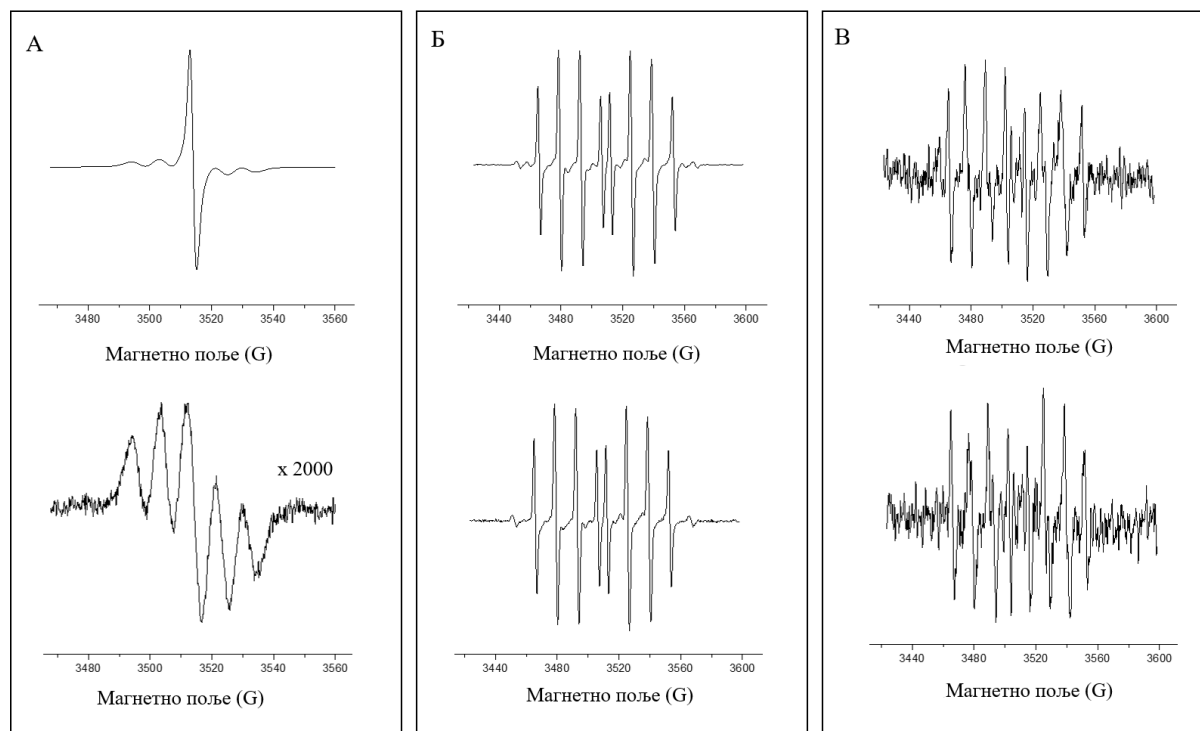
Реактивност **5CQA** према DPPH•, HO• и O₂^{-•} радикалима испитивали смо на два начина: експериментално помоћу ESR (*Electron Spin Resonance*) спектроскопије и теоријски помоћу DFT метода.¹⁰⁸ DPPH• је изабран зато што се најчешће користи у тестовима за проучавање антиоксидативне активности, док су O₂^{-•} и HO• изабрани због свог биолошког значаја.

Треба напоменути да је O₂^{-•} на pH=4.8 у равнотежи са реактивнијим хидропероксил радикалом:



Узимајући у обзир чињеницу да су ESR експерименти извођени у киселој средини,

равнотежа у једначини (45) је померена у десно, тако да супероксил радикал анјон заправо постоји као $\text{HO}\cdot/\text{O}_2^{\cdot-}$ смеша.



Слика 32. ESR спектар контролних узорка (горе) и узорка у којима је присутна 1 mM хлорогенска киселина (доле): (A) $\text{DPPH}\cdot$, (Б) $\text{DERPMO}/\text{HO}\cdot$ производ, (B) $\text{DERPMO}/\text{HOO}\cdot$ производ.

Изведени експерименти показују да је **5CQA** селективна према сва три испитивана радикала (Слика 32). Са Сlike 32 се примећује да **5CQA** у различитим односима смањује почетне ESR сигнале који потичу од радикала, што указује на то да ово једињење са различитом успешношћу хвата слободне радикале. Редукција сигнала у случају $\text{DPPH}\cdot$ износи 95.1 %, затим 68.4 % у случају $\text{HO}\cdot$ и 34.4 % у случају $\text{HOO}\cdot/\text{O}_2^{\cdot-}$. Резултати показују да **5CQA** показује највећу активност према $\text{DPPH}\cdot$ радикалу. Са друге стране, најслабија реактивност према $\text{HOO}\cdot/\text{O}_2^{\cdot-}$ је очекивана. Реактивност $\text{DPPH}\cdot$ и $\text{HO}\cdot$ према молекулу **5CQA** је у сагласности са резултатима сличних истраживања у којима су испитивани екстракти који су богати молекулом **5CQA**, као и другим полифенолним једињењима.^{109,110} И у овим студијама $\text{DPPH}\cdot$ показује већу реактивност од $\text{HO}\cdot$ радикала.

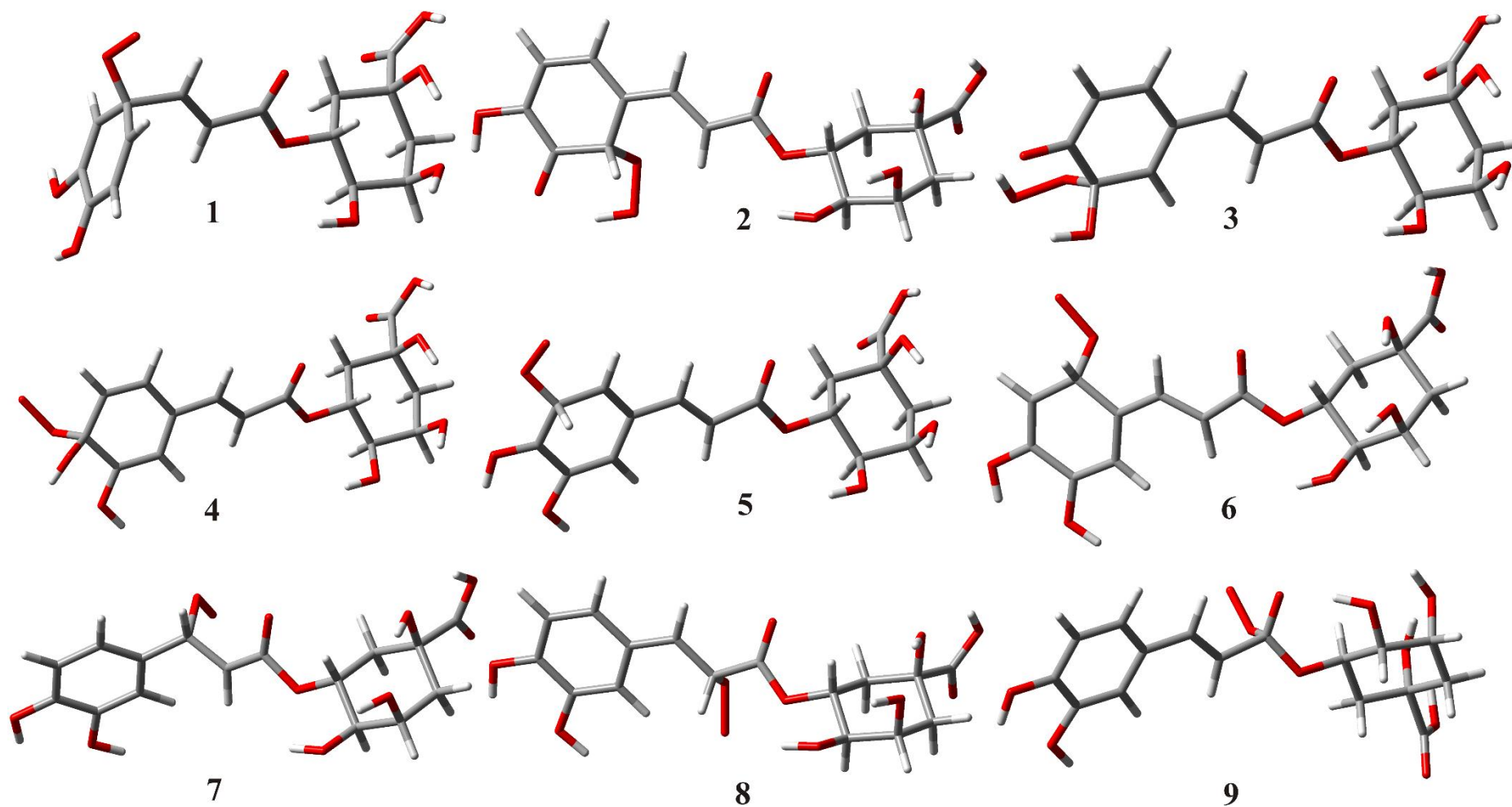
Како бисмо добили јаснији увид у реактивност **5CQA** према изабраним радикалима, испитивани су НАТ (једначина (46)), RAF (једначина (47)), SPLET (једначине (48) – (50)) и SET-PT (једначина (51) и (52)) механизми молекула **5CQA**.



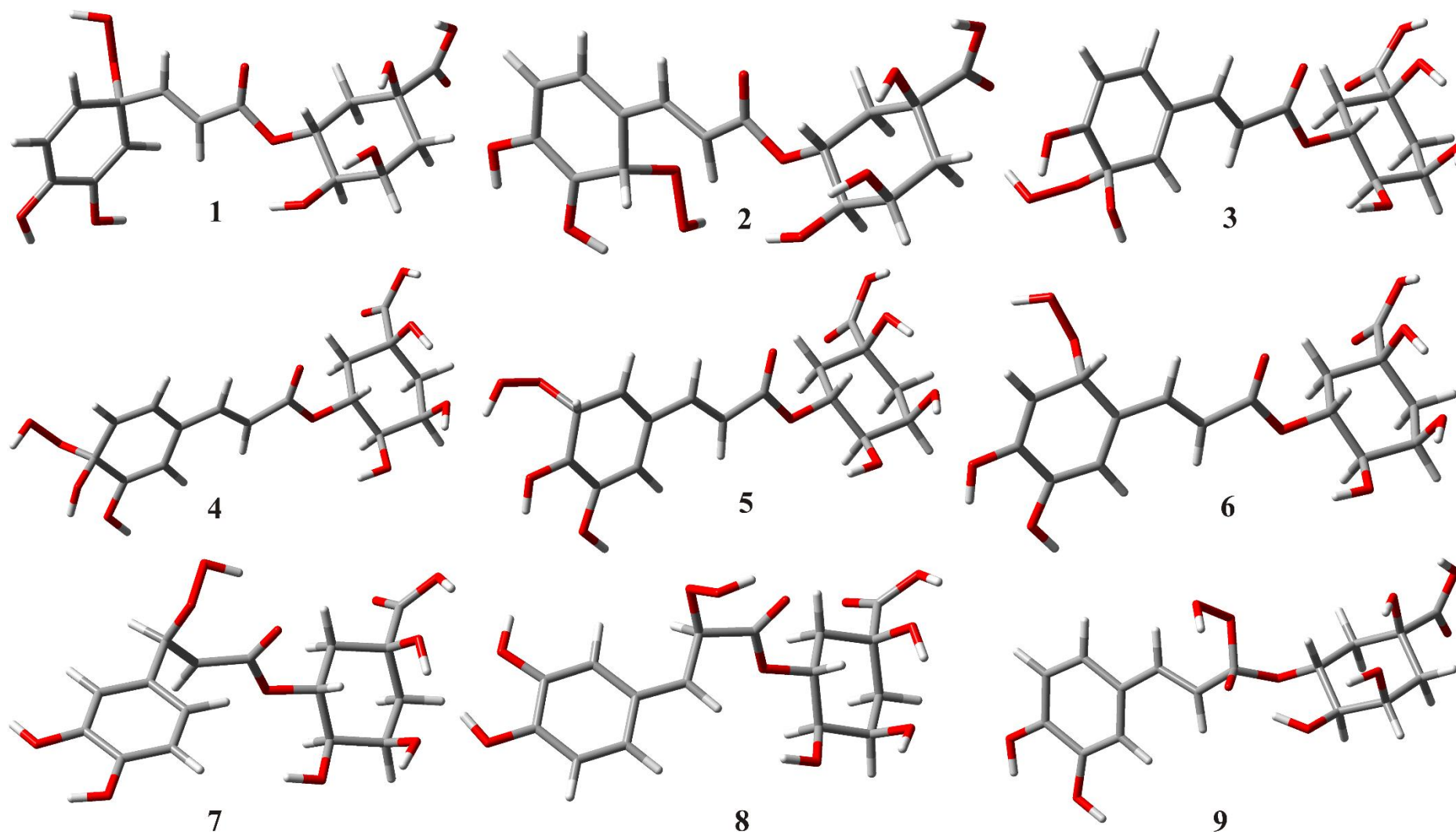
У једначинама (46) – (52) 5CQA^\bullet , $(5\text{CQA-R})^\bullet$, 5CQA^- и $5\text{CQA}^{+\bullet}$ означавају радикал, радикалски адукт, анјон и радикал катјон који су настали из молекула 5CQA ; R^\bullet и R^- означавају слободни радикал и одговарајући анјон.

За реакције (46) – (52) израчунате су слободне енергије и енталпије у бензену, етанолу и води.¹⁰⁸ О слободним радикалима ($5\text{CQA3}^{\bullet\bullet}$ и $5\text{CQA4}^{\bullet\bullet}$), анјонима ($5\text{CQA3}^{\bullet-}$ и $5\text{CQA4}^{\bullet-}$) и радикал катјону ($5\text{CQA}^{+\bullet}$) претходно је било речи. На овом месту ће детаљно бити описани радикалски адукти који настају у реакцији између 5CQA и $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOO^\bullet и HO^\bullet . Како су и DPPH^\bullet и 5CQA волуминозни молекули, може се претпоставити да због изражених стерних сметњи неће доћи до њихове интеракције. Из тог разлога (5CQA-DPPH^\bullet) радикалски адукти нису испитивани.

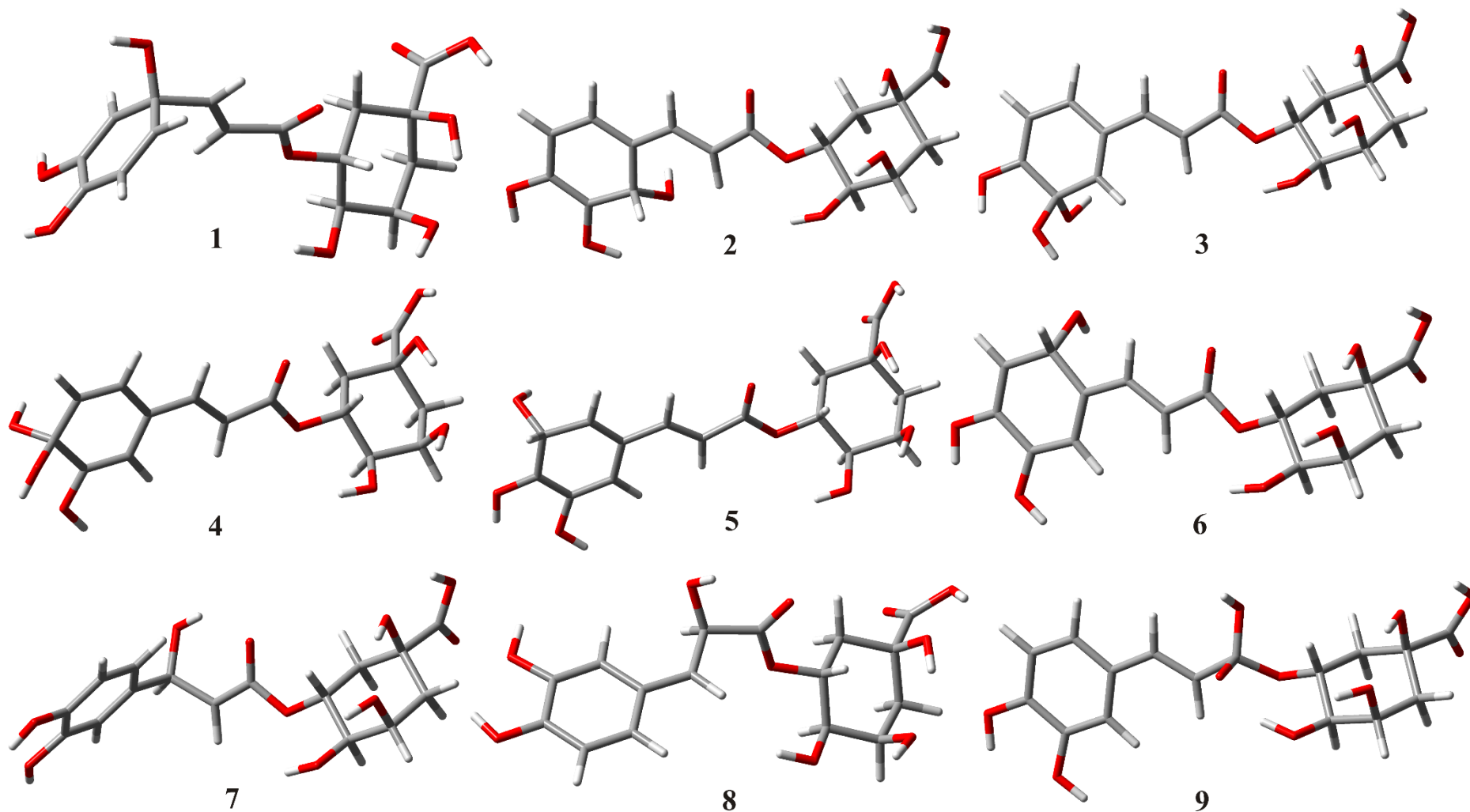
У молекулу 5CQA постоји девет повољних положаја на којима се може везати слободни радикал. Одређене су структуре радикалских адуката, $(5\text{CQA-O}_2)^{\bullet-}$, $(5\text{CQA-HOO})^\bullet$ и $(5\text{CQA-HO})^\bullet$, које одговарају RAF реакцијама у поменутим положајима и за те реакције су израчунате одговарајуће енергије у бензену, етанолу и води. На Сликама 33–35 су приказане геометрије радикалских адуката у води, док су слободне енергије и енталпије реакција приказане у Табели 17. Адиција $\text{O}_2^{\bullet-}$ на молекул 5CQA у положајима 2' и 3' не води до стварања продуката које бисмо очекивали као резултат RAF механизма. У ова два случаја долази до тога да радикал анјон узима протон са суседне фенолне групе, па заправо настаје производ у коме се HOO^\bullet везује за 5CQA^- (Слика 33). Резултати приказани у Табели 17 показују да су $\Delta_r G$ вредности значајно више од одговарајућих $\Delta_r H$ вредности. Наиме, RAF механизам укључује реакцију између два реактанта која дају један производ, што узрокује негативну промену ентропије, која се јавља услед веће уређености система. Како је и очекивано, положаји 1'–6' нису повољни за адицију радикала јер таква адиција води до нарушавања ароматичности система.



Слика 33. Оптимизоване структуре $(5CQA-O_2)^{\bullet}$ радикалских адуката у води. Структуре 2 и 3 нису адукти адиције $O_2^{\bullet-}$ на 5CQA.



Слика 34. Оптимизоване структуре (5CQA-NOO)[•] радикалских адуката у води.



Слика 35. Оптимизоване структуре (5CQA-НО)[•] радикалских адуката у води.

Адиција на $C7'=C8'$ двоструку везу је термодинамички мање неповољна. Негативно наелектрисан $C8'$ је посебно повољан за напад електрофилних HO^\bullet и HOO^\bullet радикала (Слика 30). Са друге стране, позитивно наелектрисани карбонилни $C9'$ атом је у случају напада HO^\bullet и HOO^\bullet радикала најнеповољнији, док је у случају негативно наелектрисаног $O_2^{\bullet-}$ најповољнији положај.

Табела 17. Слободне енергије (фонт *Regular*) и енталпије (фонт *Italic*) реакција у којима настају $(5CQA-O_2)^{\bullet-}$,* $(5CQA-HOO)^\bullet$ и $(5CQA-HO)^\bullet$ радикалски адукти у воденом раствору. Вредности енергија су дате у kJ mol^{-1} .

Положаји у молекулу хлорогенске киселине									
Адукти	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'
$(5CQA-O_2)^{\bullet-}$	164.4	11.3	26.5	103.9	156.3	134.5	62.4	89.2	33.3
	<i>121.3</i>	<i>-37.6</i>	<i>-16.9</i>	<i>62.1</i>	<i>113.2</i>	<i>90.8</i>	<i>18.7</i>	<i>44.1</i>	<i>-12.1</i>
$(5CQA-HOO)^\bullet$	93.7	58.9	68.8	42.4	79.9	60.0	27.1	16.1	135.3
	<i>42.3</i>	<i>6.4</i>	<i>17.3</i>	<i>-9.2</i>	<i>32.5</i>	<i>12.1</i>	<i>-25.3</i>	<i>-37.7</i>	<i>76.9</i>
$(5CQA-HO)^\bullet$	-21.8	-53.3	-46.3	-70.3	-27.9	-49.9	-79.5	-100.3	22.1
	<i>-63.0</i>	<i>-97.6</i>	<i>-86.7</i>	<i>-112.7</i>	<i>-68.5</i>	<i>-90.3</i>	<i>-124.9</i>	<i>-139.6</i>	<i>-25.5</i>

* Адиција $O_2^{\bullet-}$ на молекул **5CQA** у положајима 2' и 3' доводи до настанка производа у коме је HOO^\bullet везан за **5CQA**⁻

У Табелама 18 и 19 су приказане слободне енергије и енталпије реакција које описују четири испитивана механизма у бензену, етанолу и води. У случају RAF механизма приказани су резултати за два најповољнија положаја (8' и 7' код HOO^\bullet и HO^\bullet радикала, и 9' и 7' код $O_2^{\bullet-}$). Генерални утисак је да је, за разлику од других радикала, $O_2^{\bullet-}$ реактивнији у бензену, док му у поларним растварачима реактивност опада услед солватације. Резултати у обе Табеле показују да НАТ и RAF механизми веома мало зависе од поларности растварача. Изузетак је RAF у случају $O_2^{\bullet-}$ који је мање повољан у поларним растварачима. Како је и очекивано, у реакцији друга два радикала са **5CQA** долази до везивања, при чему је добијање $(5CQA-HO)^\bullet$ и егзергон и егзотерман процес. НАТ механизам је термодинамички повољан механизам у случају свих радикала, осим у случају $O_2^{\bullet-}$. Благо позитивне Δ_rG и Δ_rH вредности добијене за реакцију (46) са $DPPH^\bullet$ су последица боље делокализације неспареног електрона у $DPPH^\bullet$ радикалу (велики молекул са три ароматична прстена) него у молекулу **5CQA**.

Први корак SPLET механизма је ендергон и ендотерман, што значи да је чак и у поларним растварачима хетеролитичко раскидање $O-H$ веза неповољно. Дакле, у

случају реакција које се одвијају у киселој средини, SPLET механизам не треба разматрати. Са друге стране, како у молекулу **5CQA** постоји шест киселих водоникових атома (Слика 30), може се претпоставити да ће у присуству базе доћи до настанка различитих анијона **5CQA**.

Различите реактивне врсте се у реакцијама описаним једначинама (49) и (50) различито понашају. $O_2^{\bullet-}$ може да се понаша као база у реакцији са **5CQA**, при чему као производи настају **5CQA⁻** и HO_2^{\bullet} (50), тако да у овом случају први корак SPLET механизма може да се избегне. Табеле 18 и 19 показују да су ове реакције енергетски повољне, посебно у бензену, али треба имати на уму да је висока рН вредност услов да $O_2^{\bullet-}$ постоји као такав у раствору. Тако добијени **5CQA⁻** може даље да реагује са $O_2^{\bullet-}$ (изузетно неповољно) или HO_2^{\bullet} (мање неповољно) (једначина (49)). Други корак SPLET механизма је генерално олакшан у поларним растварачима у којима долази до стабилизације наелектрисаних врста. На основу енергетике реакција, које одговарају трећем кораку овог механизма, може се увидети да је реактивност $R^{\bullet-}$ анијона као базе повољна. Благо позитивне $\Delta_r G$ и $\Delta_r H$ вредности у једначинама (50) са $DPPH^{\bullet-}$ су последица боље делокализације негативног наелектрисуња у $DPPH^{\bullet-}$ него у **5CQA⁻**. За други корак SET-PT механизма израчунате вредности за реакционе енергије су изражено негативне. Међутим, први корак је екстремно енергетски захтеван, при чему $\Delta_r G$ и $\Delta_r H$ вредности опадају са повећањем поларности растварача.

Узимајући у обзир услове под којима је извођен ESR експеримент, као и резултате термодинамичких испитивања, може се закључити да ни један од испитиваних радикала не подлеже ни SPLET ни SET-PT механизму. Откривено је да ни један механизам није повољан за хватање $O_2^{\bullet-}$ у воденом раствору и тиме је потврђена чињеница да у киселој средини преовладава HO_2^{\bullet} радикал. У случају реакције **5CQA** са HO_2^{\bullet} и HO^{\bullet} радикалима може се претпоставити да су могући механизми NAT и RAF. Упркос малој ендотермности, која може да се припише бољој делокализацији неспареног електрона у $DPPH^{\bullet}$ радикалу, NAT представља једини могући механизам за хватање овог радикала. Као што је напоменуто, неке термодинамички неповољне реакције (код којих реакционе енергије не прелазе 40–45 kJ mol⁻¹) одигравају се преко прелазних стања ниске енергије, тако да је у тим случајевима пресудни фактор кинетика испитиване реакције.⁵³

Табела 18. Слободне енергије реакција (46) – (52) у kJ mol^{-1} .

Положај*	Радикал	НАТ	RAF	SPLET			SET-PT	
		(46)	(47)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)
Бензен								
3'/7'	O_2^{\bullet}	73.5	7.6	3'/4' 363.5/ 344.5	586.9	-40.6	887.6	-814.0
4'/9'		63.8	-22.6		596.1	-59.5		-823.8
3'/7'	HO_2^{\bullet}	-18.6	26.1		114.1	-132.7	414.8	-433.4
4'/8'		-28.4	11.4		123.3	-151.6		-443.1
3'/7'	HO^{\bullet}	-150.7	-81.8		38.8	-189.5	339.4	-490.1
4'/8'		-160.5	-101.8		47.9	-208.4		-499.9
3'	DPPH^{\bullet}	13.3	/		-33.8	47.1	266.8	-253.6
4'		3.5	/		-24.7	28.2		-263.3
Етанол								
3'/7'	O_2^{\bullet}	64.2	59.1	3'/4' 131.2/ 118.1	302.8	5.7	458.1	-539.5
4'/9'		55.1	30.5		306.7	-7.4		-548.6
3'/7'	HO_2^{\bullet}	-19.0	27.0		58.5	-77.5	213.8	-232.8
4'/8'		-28.0	15.7		62.5	-90.5		-241.9
3'/7'	HO^{\bullet}	-152.8	-79.6		-28.3	-124.5	127.0	-279.8
4'/8'		-161.9	-99.7		-24.4	-137.5		-288.9
3'	DPPH^{\bullet}	15.4	/		-16.8	32.2	138.5	-123.1
4'		6.3	/		-12.8	19.1		-132.2
Вода								
3'/7'	O_2^{\bullet}	63.5	62.4	3'/4' 135.0/ 122.4	283.5	8.5	428.3	-364.8
4'/9'		54.4	33.3		287.0	-4.0		-373.9
3'/7'	HO_2^{\bullet}	-19.0	27.1		54.9	-73.9	199.8	-218.8
4'/8'		-28.1	16.1		58.4	-86.5		-227.9
3'/7'	HO^{\bullet}	-152.9	-79.5		-32.7	-120.3	112.2	-265.1
4'/8'		-162.0	-100.3		-29.2	-132.8		-274.2
3'	DPPH^{\bullet}	15.5	/		-15.4	30.9	129.4	-114.0
4'		6.4	/		-11.9	18.3		-123.0

* Положаји 3' и 4' се односе на НАТ, SPLET и SET-PT механизме, док се 7', 8' и 9' односе на RAF механизам.

Резултати у Табелама 18 и 19 показују да се у већини реакција са HO^{\bullet} радикалом добијају негативне $\Delta_r G$ и $\Delta_r H$ вредности, укључујући и RAF механизам у свим растварачима, као и оба корака (једначине (49) и (50)) SPLET механизма у поларним растварачима. Такође, енергије у реакцијама (51) са HO^{\bullet} износе око 120 и 110 kJ mol^{-1} у етанолу и води, тако да чак и SET-PT механизам заслужује додатно испитивање.

Табела 19. Енталпије реакција (46) – (52) у kJ mol^{-1} .

Положај*	Радикал	НАТ	RAF	SPLET		SET-PT		
		(46)	(47)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)
Бензен								
3'/7'	O_2^{\bullet}	81.5	-38.2	3'/4' 361.7/ 342.7	592.3	-37.9	888.4	-806.9
4'/9'		71.6	-70.4		601.5	-57.0		-816.8
3'/7'	HOO^{\bullet}	-15.9	-27.7		119.4	-135.3	415.5	-431.4
4'/8'		-25.8	-42.4		128.6	-154.4		-441.3
3'/7'	HO^{\bullet}	-146.2	-127.8		43.2	-189.4	339.3	-485.5
4'/8'		-156.0	-144.4		52.4	-208.5		-495.4
3'	DPPH^{\bullet}	11.8	–		-31.1	43.0	265.0	-253.2
4'		2.0	–		-21.9	23.9		-263.0
Етанол								
3'/7'	O_2^{\bullet}	72.9	15.2	3'/4' 129.0/ 115.3	306.7	10.6	458.6	-532.2
4'/9'		63.3	-15.5		310.8	-3.1		-541.8
3'/7'	HOO^{\bullet}	-15.7	-25.5		62.3	-78.0	214.3	-230.0
4'/8'		-25.4	-38.0		66.4	-91.8		-239.6
3'/7'	HO^{\bullet}	-147.4	-125.1		-25.3	-122.1	126.6	-274.0
4'/8'		-157.0	-139.9		-21.2	-135.8		-283.7
3'	DPPH^{\bullet}	15.7	–		-17.4	33.1	134.6	-118.8
4'		6.1	–		-13.3	19.4		-128.4
Вода								
3'/7'	O_2^{\bullet}	72.3	18.7	3'/4' 136.7/ 123.4	287.2	13.7	428.8	-356.5
4'/9'		62.7	-12.1		290.9	0.4		-366.2
3'/7'	HOO^{\bullet}	-15.7	-25.3		58.6	-74.3	200.2	-215.9
4'/8'		-25.4	-37.7		62.3	-87.6		-225.5
3'/7'	HO^{\bullet}	-147.5	-124.9		-29.8	-117.7	111.8	-259.3
4'/8'		-157.1	-139.6		-26.1	-131.0		-268.9
3'	DPPH^{\bullet}	16.0	–		-16.3	32.3	125.3	-109.3
4'		6.4	–		-12.6	10.0		-118.9

* Положаји 3' и 4' се односе на НАТ, SPLET и SET-PT механизме, док се 7', 8' и 9' односе на RAF механизам.

Приступ заснован на израчунавању константи брзина

Као што је већ поменуто, QM-ORSA протокол се заснива на термодинамичком и кинетичком испитивању свих могућих реакција које су укључене у антиоксидативне процесе. Наиме, овај приступ подразумева да се у растварачима различите поларности израчунају константе брзине за све повољне реакционе путеве проучаваног антиоксиданта, узимајући у обзир и утицај рН вредности средине. Као и у експерименталним истраживањима, и овде је могуће да се одреди релативна антиоксидативна активност, при чему се као референтно једињење узима **Tx**. Однос између укупне константе брзине, k_{overall} , испитиваног антиоксиданта и **Tx** указује на већу или мању активност антиоксиданта у односу на **Tx**.

Одређивање релативне антиоксидативне активности хлорогенске киселине у неполарним растварачима

Како би се одредила релативна антиоксидативна активност молекула **5CQA** у неполарној средини, испитивани су сви могући антиоксидативни путеви у реакцији **5CQA** и **Tx** са два радикала: HO^\bullet (изузетно реактиван) и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ (умерено реактиван).¹¹¹ О значају HO^\bullet радикала је већ било речи, док је $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ изабран како би симулирао понашање већих липидних радикала. Испитиване су реакције:



у бензену и пентил етаноату. У једначинама (53) – (56) **ArOH** представља **5CQA** или **Tx**, док R^\bullet означава HO^\bullet или $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикале. Сходно томе, ArO^\bullet , $(\text{ArOH-R})^\bullet$, ArO^- и $\text{ArOH}^{\bullet+}$ су ознаке за слободни радикал, радикалски адукт, анјон и радикал катјон добијен из одговарајућег фенолног једињења. **RH** је једињење које настаје из радикала R^\bullet , а R^- је одговарајући анјон. Једначине (53) и (54) описују **HAT** и **RAF** механизам, док једначине (55) и (56) представљају први корак **SPLET** (губитак протона) и **SET-PT** (пренос електрона) механизма.

Први део истраживања је посвећен термодинамичком испитивању једначина (55) – (56) како би се одредиле све егзергоне реакције које ће се даље испитивати

кинетички. Узимајући у обзир да су константе брзина у реакцијама хомолитичког раскидања C–H веза, као и релативне количине проивода (Γ), значајно мање у односу на вредности добијене за хомолитичко раскидање O–H веза,^{112–116} у случају НАТ механизма испитиване су само оне реакције које укључују апстракцију водониковог атома из фенолних група. У случају RAF механизма симулиране су реакције у којима се два радикала везују за sp^2 хибридлизоване угљеникове атоме. Резултати су приказани у Табели 20 и илустровани су Схемама 1 и 2. На први поглед је очигледно да је слагање између $\Delta_r G$ вредности за два растварача веома добро. Као што је и очекивано, у случају оба једињења су добијене изразито позитивне $\Delta_r G$ вредности за реакцију губитка карбоксилног протона (једначина (55)), као и за реакцију преноса електрона на HO^\bullet или CH_3OO^\bullet радикал (једначина (56)). Добијени резултати, који показују да ни **5CQA** ни **Tx** не подлежу SPLET и SET-PT механизмима у неполарним растварачима, у сагласности су са резултатима из претходних истраживања.^{71,72,107,108,114} Из тог разлога нису испитивани наредни кораци који описују два антиоксидативна механизма.

Са друге стране, НАТ је термодинамички повољан механизам у реакцији између оба једињења са оба радикала, при чему су реакције са HO^\bullet значајно егзергоније. Што се тиче RAF механизма, $\Delta_r G$ вредности за реакције са HO^\bullet су већином негативне, сем у положајима 9' у молекулу **5CQA** и 1 у молекулу **Tx** (Табела 20). Ова два угљеникова атома су позитивно наелектрисана, тако да нису повољна за напад јако електрофилног HO^\bullet радикала. За RAF реакције између оба фенолна једињења са CH_3OO^\bullet добијају се ендергоне вредности, што се може приписати знатно слабијој реактивности овог радикала и, у извесној мери, његовој волуминозности. На Схемама 1 (за **5CQA**) и 2 (за **Tx**) приказани су производи који настају у егзергоним реакцијама које описују НАТ и RAF механизме.

Табела 20. Гибсове енергије (kJ mol^{-1}) реакција (53) – (56) хлорогенске киселине и тролокса израчунате на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом. Скраћеница PL (*Proton Loss*) се односи на реакцију губитка протона, док се ET (*Electron Transfer*) односи на реакцију преноса електрона. Ове реакције представљају први корак SPLET и SET-PT механизма. На Схемама 1 и 2 је представљена нумерација атома.

Механизам	Положај	5CQA		Положај	Tx	
		HO•	CH ₃ OO•		HO•	CH ₃ OO•
Бензен						
HAT	3'	-150.7	-9.2	6	-167.2	-25.7
	4'	-160.5	-18.9			
RAF	1'	-18.2	104.2	1	25.7	166.5
	2'	-53.0	66.8			
	3'	-37.9	84.6			
	4'	-77.3	52.1			
	5'	-33.7	83.1			
	6'	-55.6	65.6			
	7'	-81.8	37.0			
	8'	-101.8	23.9			
	9'	24.6	150.1			
PL	7	339.4		1	374.1	
ET	/	339.4	418.8	/	260.1	339.5
Пентил етаноат						
HAT	3'	-151.9	-8.8	6	-169.1	-26.0
	4'	-161.4	-18.3			
RAF	1'	-16.1	106.2	1	32.2	168.2
	2'	-51.2	69.6			
	3'	-37.1	86.1			
	4'	-75.5	53.9			
	5'	-30.0	87.7			
	6'	-54.6	66.5			
	7'	-80.5	38.4			
	8'	-99.9	25.2			
	9'	25.9	151.0			
PL	7	182.0		1	209.5	
ET	/	217.7	306.6	/	150.6	239.5

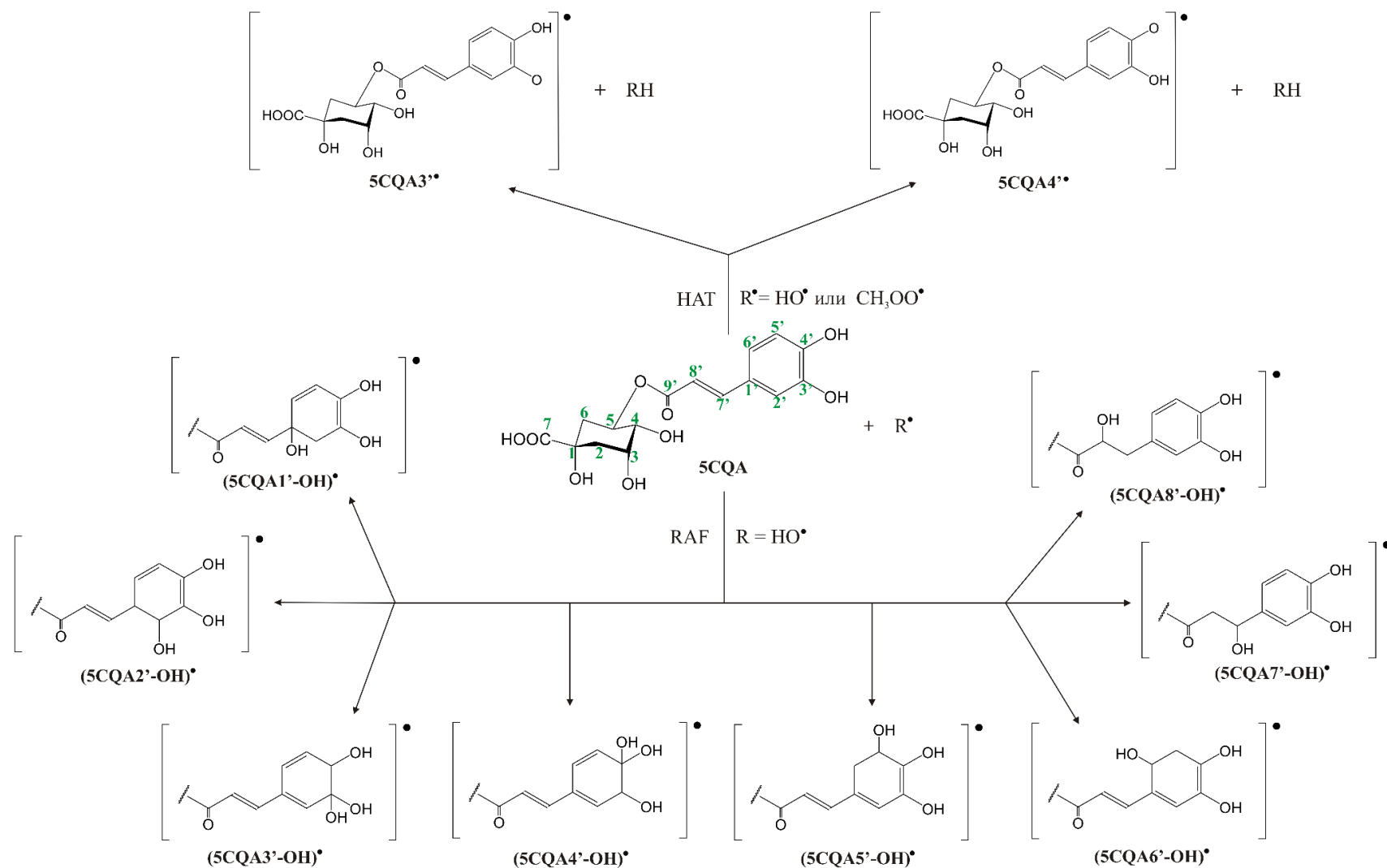


Схема 1. Могући антиоксидативни реакциони путеви хлорогенске киселине у неполярним растварачима. Дате су ознаке за атоме као и за производе приказаних реакција.

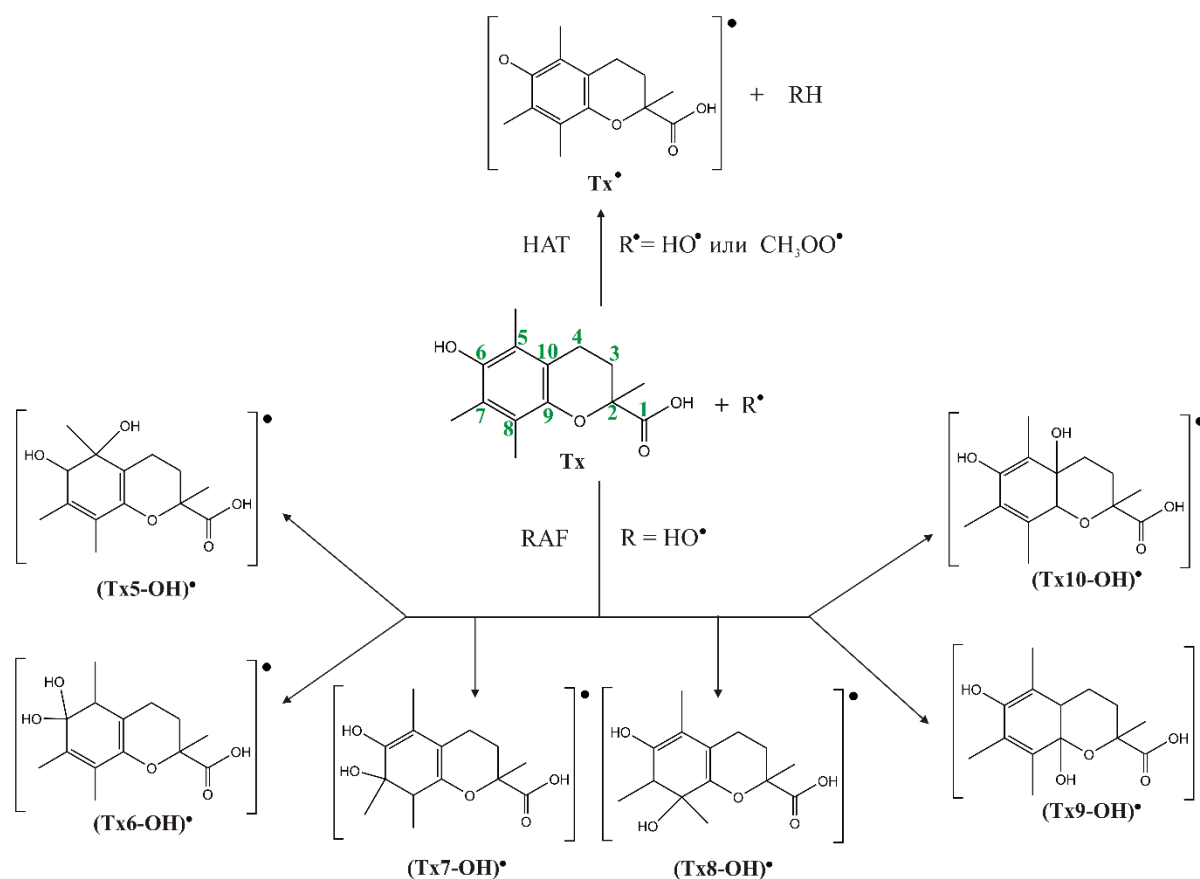
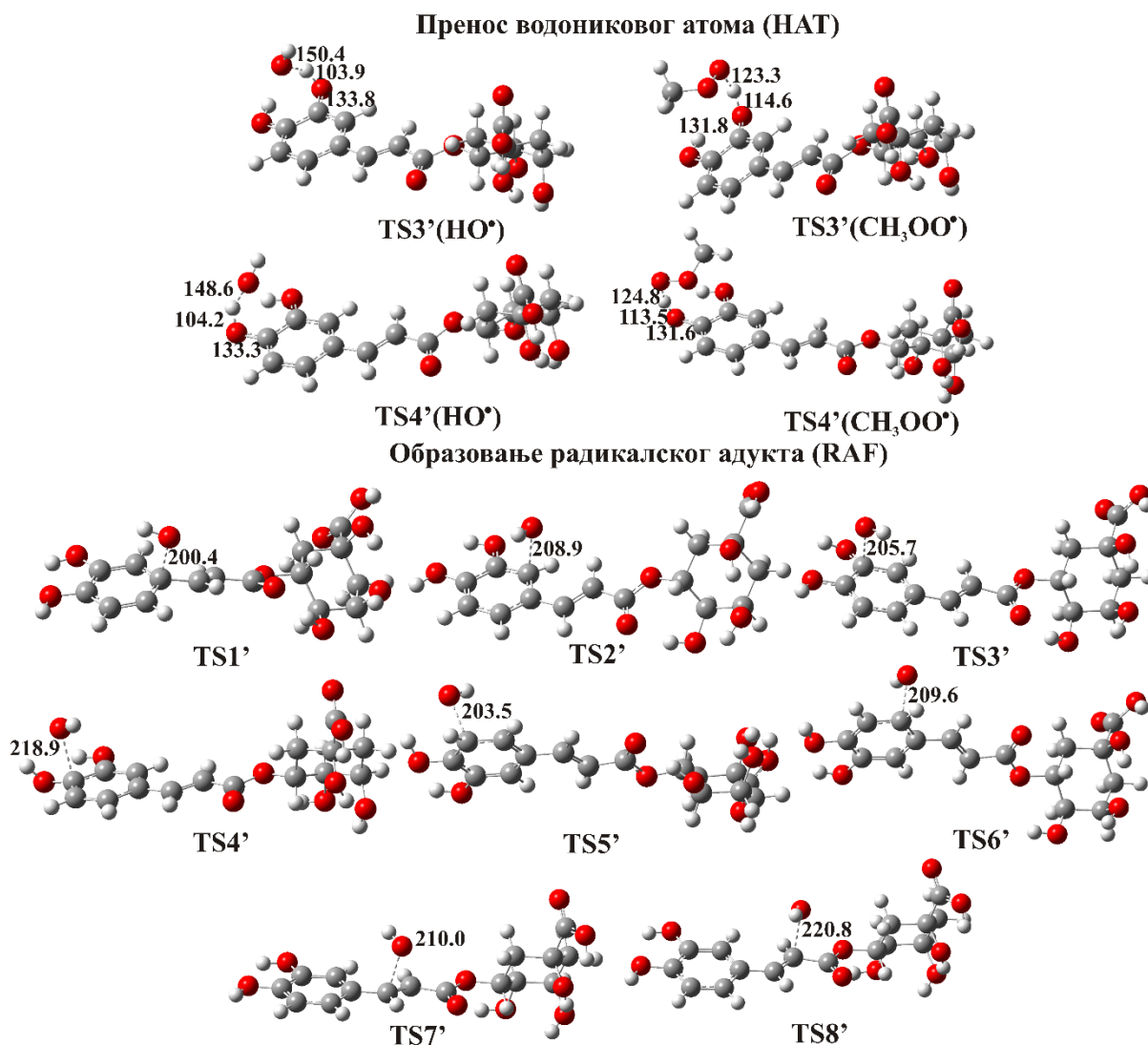


Схема 2. Могући антиоксидативни реакциони путеви тролокса у неполарним растварачима. Дате су ознаке за атоме као и за производе приказаних реакција.

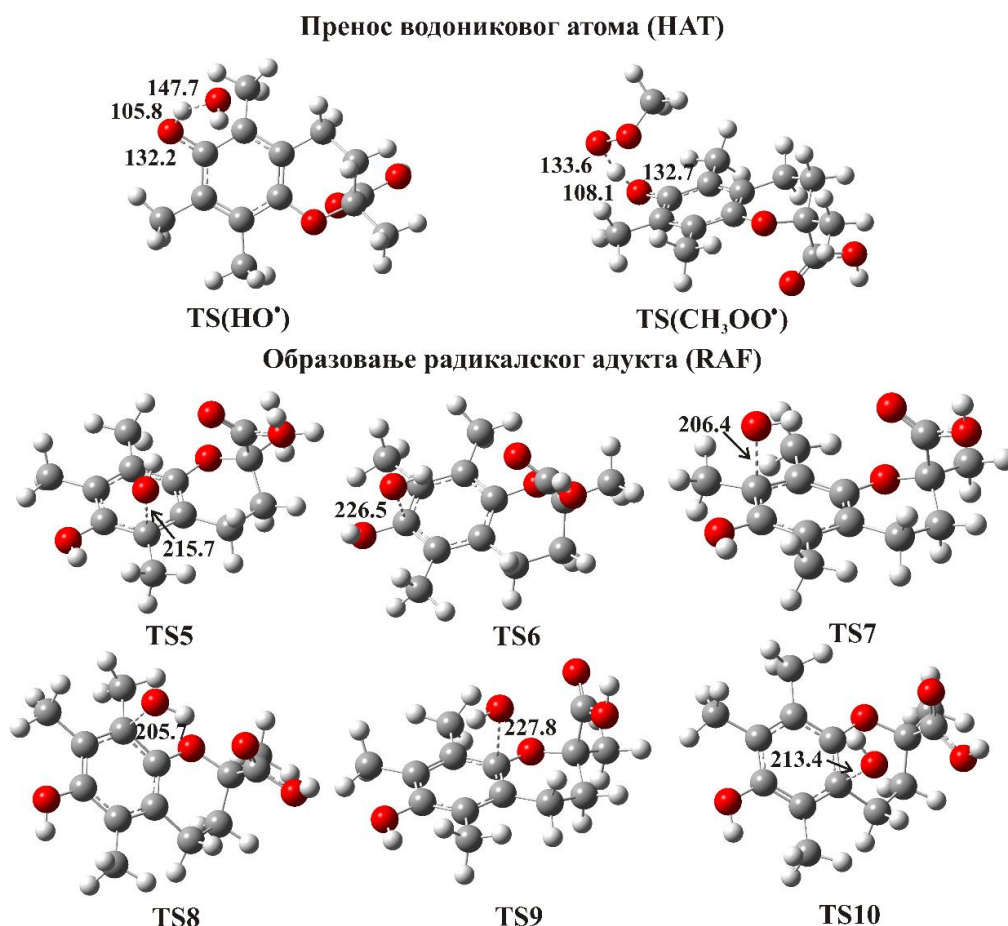
Све егзергоне реакције су даље подвргнуте кинетичким испитивањима, како би се одредила прелазна стања и израчунале одговарајуће константе брзине, као и r^T вредности. Добијена прелазна стања су приказана на Сликама 36 и 37, док су вредности за енергије активације, као и k и r^T вредности израчунате у оба растварача дате у Табели 21. Два примера IRC (*Intrinsic Reaction Coordinate*) прорачуна за реакцију **5CQA** са HO^{\bullet} радикалом у бензену су приказана на Слици 38.

За повољне антиоксидативне реакционе путеве израчунате су и kt_{ST} (једначина (11)) и $kz_{\text{CT-0}}$ (једначина (12)) вредности. На Сликама 39 и 40 приказана је зависност $\ln kt_{\text{ST}}$ и $\ln kz_{\text{CT-0}}$ од реципрочне температуре за реакције **5CQA** и **Tx** са HO^{\bullet} преко NAT и RAF механизма у најповољнијим положајима. Као што је и очекивано, у случају **5CQA** две константе брзине су готово идентичне на собној температури (Слика 39), што указује на то да су обе константе брзине погодне за репродуковање брзина ових реакција на температури од 298 К. Са друге стране, kt_{ST} и $kz_{\text{CT-0}}$ вредности за реакцију **5CQA** преко RAF механизма у положају 4', као и за реакције **Tx** преко NAT и RAF механизма у положају 6 (Слика 40), значајно одступају једне од других на свим

температурама. У ове три реакције повећање температуре води чак до смањивања k_{TST} вредности. Ова необична појава указује на то да k_{TST} вредности нису погодне за процењивање брзина у наведеним случајевима. Специфично за све три реакције је да имају веома малу енергију активације, тј. одликују се равном површином потенцијалне енергије, што може бити разлог за подбацавање конвенцијалне теорије прелазног стања при процењивању константи брзина. Све реакције између 5CQA и T_x са HO• радикалом које захтевају малу енергију активације понашају се на сличан начин.



Слика 36. Оптимизоване геометрије прелазних стања која се јављају у реакцијама хлорогенске киселине са HO• и CH₃OO• радикалима у бензену. Назначене су кључне дужине веза у Å. Прорачуни су извршени на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом.



Слика 37. Оптимизоване геометрије прелазних стања која се јављају у реакцијама тролокса са HO[•] и CH₃OO[•] радикалима у бензену. Назначене су кључне дужине веза у Å. Прорачуни су извршени на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом.

Добро је познато да НАТ и RAF веома мало зависе од поларности растварача.^{71,72,108} На пример, из резултата приказаних у раду 108 лако се може израчунати да укупна константа брзине за реакцију **5CQA** са HO[•] у поларним растварачима, етанолу и води, износи 9.46×10^8 и 9.60×10^8 M⁻¹s⁻¹ (исти је ред величине као и добијене k_{overall} вредности за реакцију у бензену). Будући да су бензен и пентил етаноат растварачи сличне поларности, логично је да се претпостави да ће k_{overall} и r^{T} вредности за реакције са одабраним радикалом бити веома сличне. Из резултата приказаних у Табели 21 се види да су r^{T} вредности за реакције са CH₃OO[•] готово идентичне. На наше велико изненађење, у случају HO[•] радикала r^{T} вредност је много већа у пентил етаноату него у бензену. Како бисмо разјаснили овај неочекивани резултат, спровели смо додатна истраживања. Поновили смо сва кинетичка испитивања која се односе на НАТ и RAF реакционе путеве за молекуле **5CQA** и **Tx** помоћу M05-2X/6-311++G(d,p) теоријског модела у комбинацији са SMD солватационим моделом. Добијени резултати су приказани у Табели 22.

Табела 21. Гибсове енергије активације ΔG_a^\ddagger (kJ mol⁻¹) и константе брзине k (M⁻¹s⁻¹) за НАТ и RAF реакције хлорогенске киселине и тролокса са HO• и CH₃OO• радикалима. r^T означава релативну антиоксидативну активност хлорогенске киселине. Резултати су добијени на M06-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са CPCM солватационим моделом.

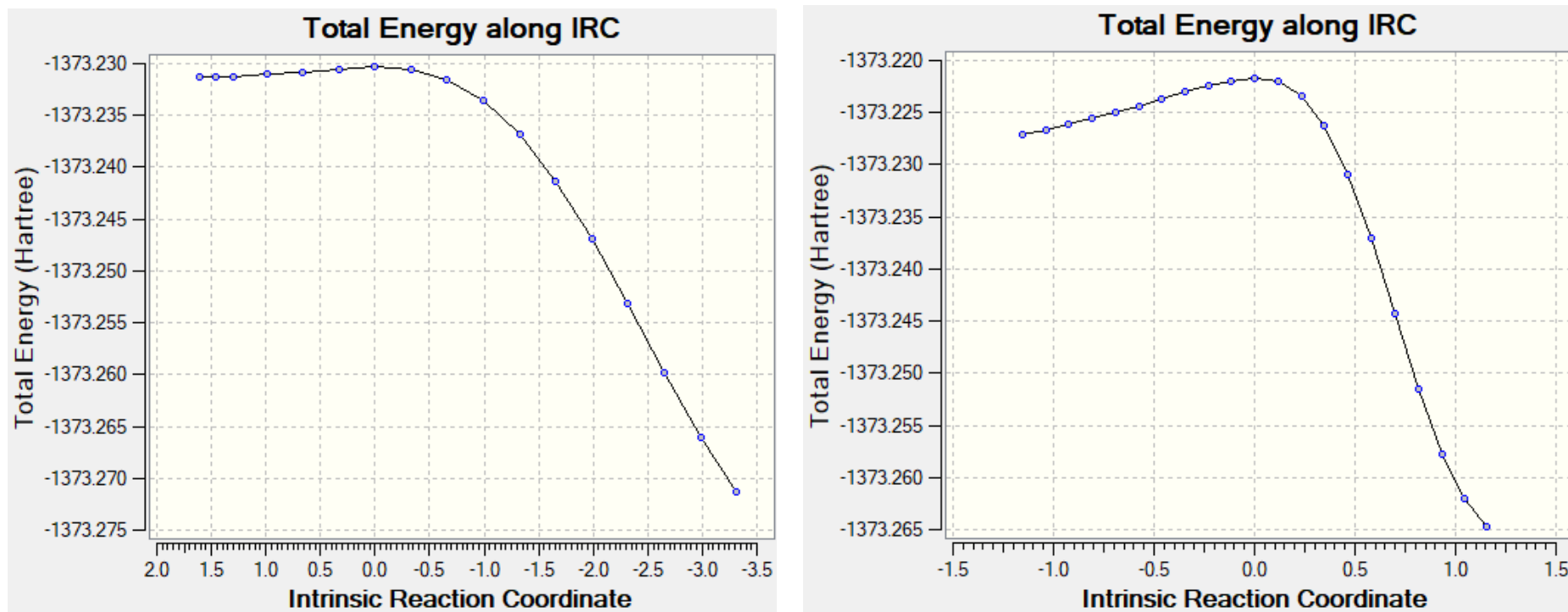
Једињење		5CQA				Тх				
Радикал		HO•		CH ₃ OO•		HO•		CH ₃ OO•		
		ΔG_a^\ddagger	k	ΔG_a^\ddagger	k	ΔG_a^\ddagger	k	ΔG_a^\ddagger	k	
Бензен										
НАТ	3'	41.5	1.61×10 ⁷	70.9	2.47×10 ³	6	25.3	6.49×10 ⁶	57.1	4.17×10 ⁴
	4'	45.5	4.54×10 ⁶	69.3	3.49×10 ³					
RAF	1'	52.7	1.21×10 ⁵			5	18.5	1.33×10 ⁷		
	2'	36.8	2.89×10 ⁷							
	3'	40.3	1.55×10 ⁷							
	4'	26.5	8.44×10 ⁷							
	5'	36.9	3.73×10 ⁷ ^a							
	6'	36.6	6.82×10 ⁷ ^a							
	7'	39.9	1.94×10 ⁷							
	8'	25.4	5.82×10 ⁷							
k_{overall}			3.33×10 ⁸		5.96×10 ³			1.31×10 ⁸		4.17×10 ⁴
r^T			2.5		0.14					
Пентил етаноат										
НАТ	3'	43.2	9.35×10 ⁶	73.4	1.53×10 ³	6	27.0	7.05×10 ⁶	59.4	2.47×10 ⁴
	4'	47.1	2.46×10 ⁶	72.3	1.75×10 ³					
RAF	1'	52.6	1.21×10 ⁵			5	23.3	6.42×10 ⁶		
	2'	35.9	5.87×10 ⁷							
	3'	40.0	1.81×10 ⁷							
	4'	27.7	8.43×10 ⁸							
	5'	38.3	3.73×10 ⁷							
	6'	33.9	1.97×10 ⁸							
	7'	38.9	2.78×10 ⁷							
	8'	24.5	9.01×10 ⁷							
k_{overall}			1.28×10 ⁹		3.28×10 ³			9.43×10 ⁷		2.47×10 ⁴
r^T			13.6		0.13					

Важно је напоменути да применом M05-2X/6-311++G(d,p)/SMD теоријског модела нисмо успели да лоцирамо већину прелазних стања за НАТ реакције молекула **5CQA** у пентил етаноату. Наиме, приликом оптимизације геометрије није долазило до конвергенције. Из тог разлога није било могуће да се израчунају ни k_{overall} вредности, ни одговарајуће r^T вредности за реакције **5CQA** са оба слободна радикала у пентил етаноату. За разлику од пентил етаноата, у бензену су успешно оптимизоване све структуре и израчунате су одговарајуће k_{overall} и r^T вредности. Дакле, могу да се пореде

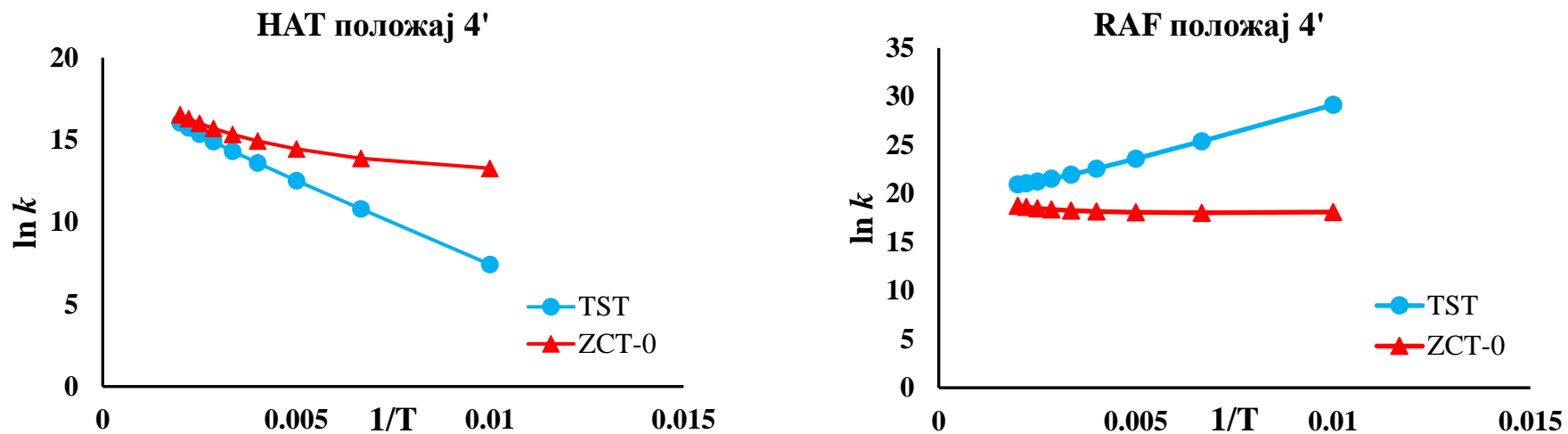
три скупа резултата приказаних у Табелама 21 и 22 и да се одреде вредности за релативну количину производа Γ (Табела 23).

Анализа резултата приказаних у Табелама 21–23 показује да, упркос нумеричким разликама, све три оперативне рачунарске методологије: M06-2X–CPCM у бензену и пентил етаноату и M05-2X–SMD у бензену (базисни скуп је исти) показују сличне трендове. У неполарним растварачима два антиоксиданта приликом реакције са HO^\bullet подлежу НАТ и RAF механизмима, док у случају $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ реагују само преко НАТ механизма. У случају реакције оба фенолна једињења са HO^\bullet радикалом RAF реакциони путеви су бржи. Најбржи RAF реакциони путеви су у положају 4' код молекула **5CQA** и у положају 6 код молекула **Tx**. Заједничка особина прелазних стања $\text{TS4}'$ и TS6 (Слике 36 и 37) је та да су оба стабилизована водоничним везама које се остварују између HO^\bullet и фенолних група, и због тога реакције у ова два положаја захтевају нижу енергију активације. Са друге стране, привлачне интеракције у НАТ реакцијама (водонична веза између кисеоника у хидроксил радикалу и суседне фенолне групе у $\text{TS3}'(\text{HO}^\bullet)$ и $\text{TS4}'(\text{HO}^\bullet)$), као и π -интеракције између водоника из HO^\bullet и ароматичног прстена у $\text{TS}(\text{HO}^\bullet)$) успоравају образовање молекула воде, као и његово напуштање реакционог система.

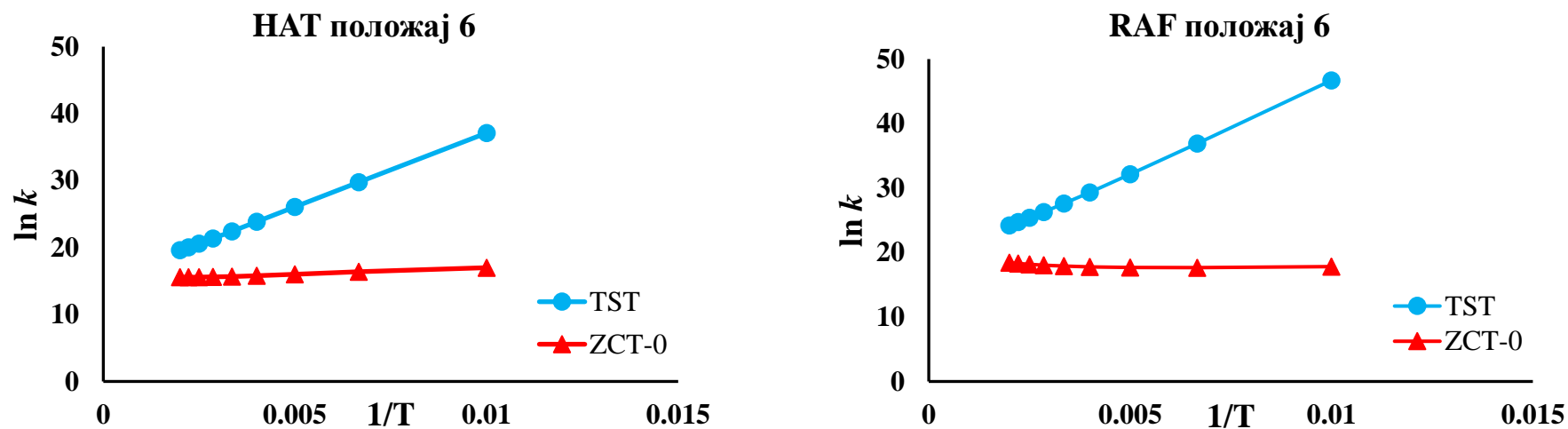
Упркос чињеници да је адиција HO^\bullet на двоструку везу молекула **5CQA** термодинамички најповољнија (Табела 20), највећа Γ вредност се добија у случају RAF реакције у положају 4'. Што се тиче НАТ реакција са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$, Γ вредности су веће у положају 4', док је у случају SMD солватационог модела разлика између вредности за релативну количину производа већа. **5CQA** је према HO^\bullet радикалу реактивнија од **Tx** ($r^T > 1$), али је мање реактивна према $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикалу ($r^T < 1$). Већа реактивност **5CQA** према HO^\bullet је последица веома брзих RAF реакција. У поређењу са **Tx**, **5CQA** има повољније положаје за адицију HO^\bullet . Према три оперативне методологије најбржи реакциони пут је онај преко RAF механизма у положају 4' у молекулу **5CQA**. У случају $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ r^T вредности су у сагласности, док се у случају HO^\bullet ове вредности разликују, при чему посебно одступа r^T вредност у пентил етаноату (Табеле 21 и 22).



Слика 38. Резултати IRC рачуна за реакцију хлорогенске киселине са HO^\bullet преко HAT механизма у положају 3' у бензену (лево); Резултати IRC рачуна за реакцију хлорогенске киселине са HO^\bullet преко RAF механизма у положају 8' у бензену (десно).



Слика 39. Зависност $\ln k_{\text{TST}}$ и $\ln k_{\text{ZCT-0}}$ од реципрочне температуре за реакције хлорогенске киселине са HO^\bullet преко НАТ и RAF механизма.



Слика 40. Зависност $\ln k_{\text{TST}}$ и $\ln k_{\text{ZCT-0}}$ од реципрочне температуре за реакције тролокса са HO^\bullet преко НАТ и RAF механизма.

Табела 22. Гибсове енергије активације ΔG_a^\ddagger (kJ mol^{-1}) и константе брзине k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) за НАТ и RAF реакције хлорогенске киселине и тролокса са HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикалима. r^T означава релативну антиоксидативну активност хлорогенске киселине. Резултати су добијени на M05-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије у комбинацији са SMD солватационим моделом.

Једињење		5CQA				Tx				
Радикал	HO [•]		CH ₃ OO [•]		HO [•]		CH ₃ OO [•]			
	ΔG_a^\ddagger	k	ΔG_a^\ddagger	k	ΔG_a^\ddagger	k	ΔG_a^\ddagger	k		
Бензен										
НАТ	3 [•]	43.3	8.01×10^6	76.7	3.29×10^2	6	17.1	1.29×10^7	60.4	2.78×10^4
	4 [•]	42.7	1.27×10^7	70.5	2.60×10^3					
RAF	1 [•]	52.8	1.17×10^5			5	16.8	5.03×10^7		
	2 [•]	36.4	4.39×10^7							
	3 [•]	41.2	1.08×10^7							
	4 [•]	23.6	2.64×10^8							
	5 [•]	35.0	2.49×10^7							
	6 [•]	38.9	2.81×10^7							
	7 [•]	39.9	1.94×10^7							
	8 [•]	25.7	5.50×10^7							
k_{overall}		4.67×10^8		2.93×10^3			2.87×10^8		2.78×10^4	
r^T		1.63		0.11						
Пентил етаноат										
НАТ	3 [•]	/	/	/	/	6	24.0	5.54×10^6	68.0	2.39×10^3
	4 [•]	46.6	2.81×10^6	/	/					
RAF	1 [•]	52.7	1.20×10^5			5	23.2	2.03×10^7		
	2 [•]	37.7	3.75×10^7							
	3 [•]	40.0	1.75×10^7							
	4 [•]	29.3	1.27×10^8							
	5 [•]	38.5	3.09×10^7							
	6 [•]	37.7	4.69×10^7							
	7 [•]	40.1	1.78×10^7							
	8 [•]	25.0	7.09×10^7							
k_{overall}		/	/	/	/		1.88×10^8		2.39×10^3	
r^T		/	/	/	/					

Добијене разлике у r^T вредностима за реакције са HO^\bullet радикалом су највероватније последица изузетне реактивности овог радикала коју је тешко нумерички изразити, без обзира коју компјутерску методологију применили. Из тог разлога је практичније да се за одређивање релативне антиоксидативне активности користи неки мање реактивни радикал.⁵² Међутим, уколико се као циљ истраживања постави испитивање свих могућих антиоксидативних путева, потребно је изабрати веома реактивне слободне радикале.

Табела 23. Релативна количина производа (Γ) за све повољне реакционе путеве хлорогенске киселине. У свим случајевима је коришћен базисни скуп 6-311++G(d,p).

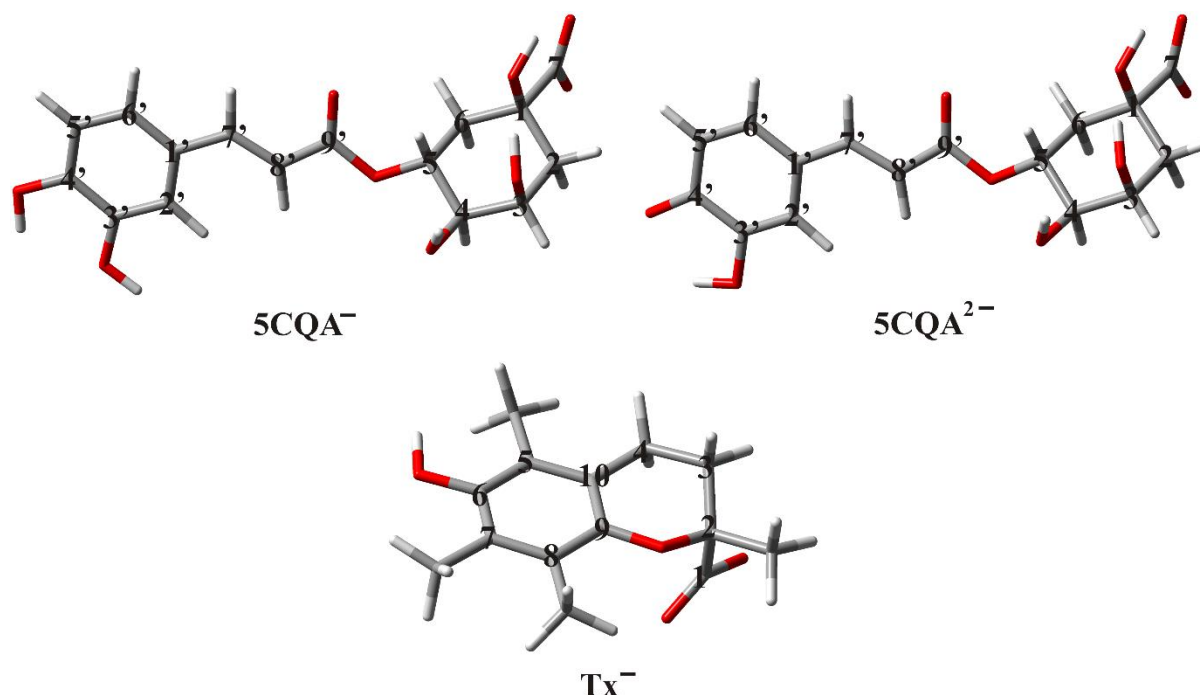
Механизам	Положај	Γ (%)		
		M06-2X – CPCM		M05-2X – SMD
		Бензен	Пентил етаноат	Бензен
HO•				
HAT	3'	4.8	0.7	1.7
	4'	1.4	0.2	2.7
RAF	1'	~0.0	~0.0	~0.0
	2'	8.7	4.6	9.4
	3'	4.7	1.4	2.3
	4'	25.4	65.7	56.5
	5'	11.2	2.9	5.3
	6'	20.5	15.3	6.0
	7'	5.8	2.2	4.2
	8'	17.5	7.0	11.8
CH₃OO•				
HAT	3'	41.5	46.6	11.2
	4'	58.5	53.4	88.8

Реакције **5CQA** са два једноставна слободна радикала у пентил етаноату указују на недостатак M05-2X фукционала у комбинацији са SMD солватационим моделом када треба да се обави неки једноставни рачунарски задатак, као што је налажење енергетског максимума. Насупрот томе, k_{overall} вредности добијене помоћу овог теоријског модела за реакције **Tx** са оба слободна радикала међусобно су упоредиве (Табеле 21 и 22). Можемо још и да упоредимо наше вредности за константе брзине и k_{overall} вредности за реакције са HO• (Табела 22), са резултатима приказаним у раду 114. Општи утисак је да су наше вредности за два реда величине ниже од резултата које су добили Алберто (Alberto) и његови сарадници.¹¹⁴ Највећа разлика је у томе да смо ми успешно одредили прелазно стање за реакцију хомолитичког раскидања O–H везе у фенолној групи. За разлику од резултата који је добијен у цитираном раду, који предвиђа да је поменута реакција контролисана дифузијом са процењеном константом брзине од $1.91 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, наша израчуната вредност износи $5.54 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Несагласност два скупа резултата је свакако последица примене различитих методологија. Ми препоручујемо приступ који се заснива на оптимизацији геометрије уз укључивање фреквенционог рачуна у комбинацији са неким солватационим моделом, јер се данас такви задаци обављају рутински. Следећи логичан корак је да се одреди релативна антиоксидативна активност **5CQA** у води.

Одређивање релативне антиоксидативне активности хлорогенске киселине при физиолошким условима

Експериментална истраживања Олтхофове и њених сарадника, у којима су људи конзумирали суплементе **5CQA**, имала су за циљ да се испитају могући ефекти овог једињења на здравље.^{39,117} Откривено је да се **5CQA** највећим делом разлаже до метаболита под дејством микроорганизама који се налазе у цревима. Међутим, претпоставља се да трећина апсорбоване неразложене **5CQA** доспева у крвоток, где може да остварује биолошке ефекте.

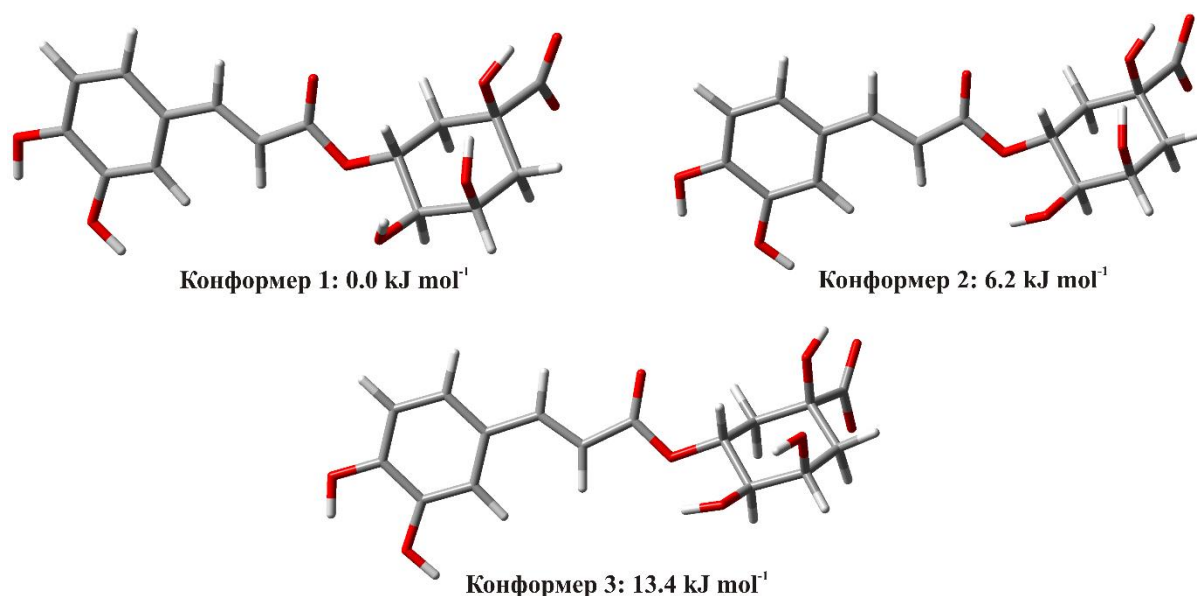
Према pK_a вредностима водени раствор **5CQA** садржи 87% моноанјона (**5CQA⁻**) и 13% дианјона (**5CQA²⁻**) на физиолошкој рН вредности (7.4) (Слика 41). Прва pK_a вредност износи 3.35 и одговара депротоновању карбоксилне групе, док друге две вредности, 8.21 и 12.5, одговарају депротоновању фенолних група.¹¹⁸ При истим условима, доминантан облик молекула **Tx** је карбоксилатни ањон (**Tx⁻**, Слика 41).¹¹⁴



Слика 41. Структуре карбоксилатног ањона (**5CQA⁻**) и дианјона (**5CQA²⁻**) хлорогенске киселине и карбоксилатног ањона (**Tx⁻**) тролокса.

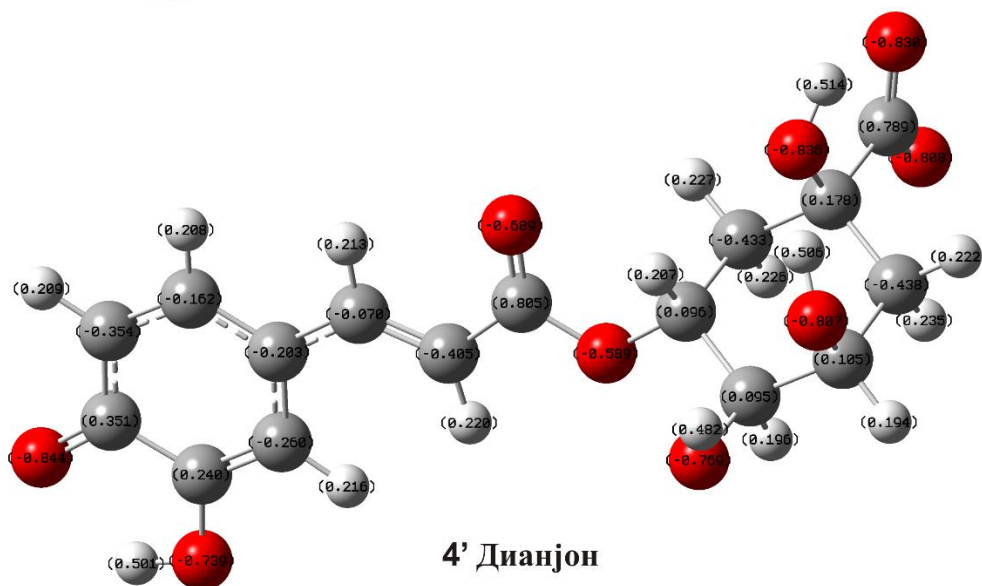
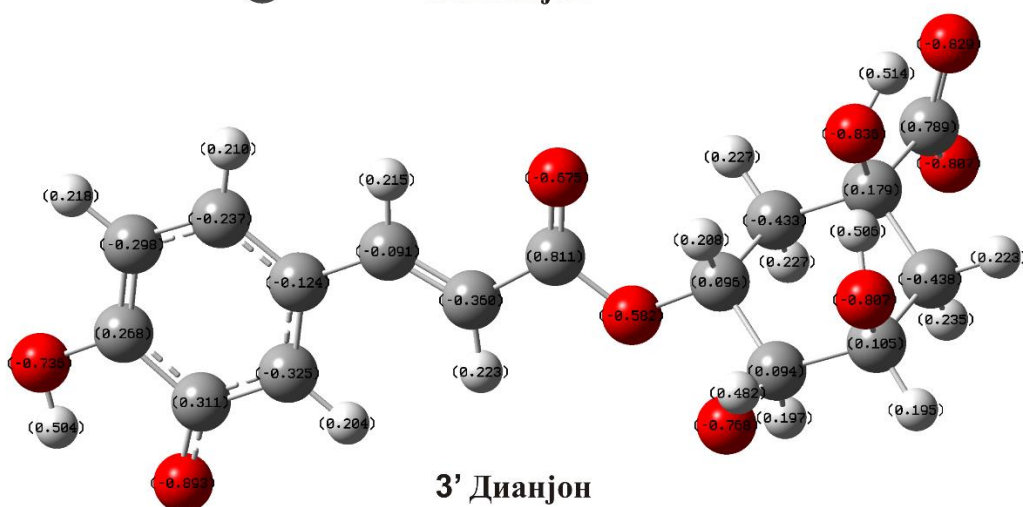
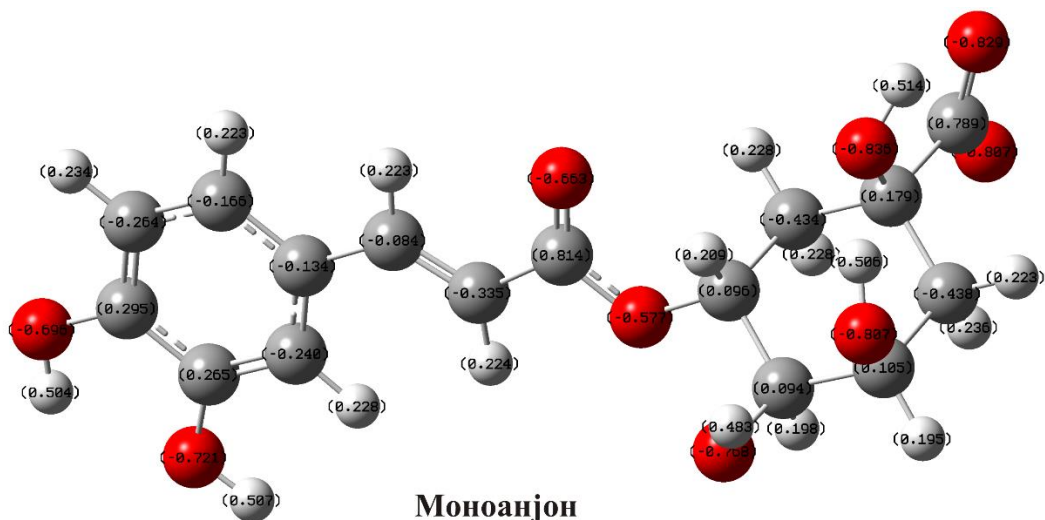
Испитивање моноанјона и дианјона хлорогенске киселине

Структуре моноанјона и дианјона су добијене депротонавањем молекула **5CQA**, чија је структура у раствору претходно одређена.^{69–72} Како бисмо установили који је најстабилнији моноанјонски облик, конструисани су сви конформери карбоксилатног анјона који се међусобно разликују у оријентацији хидроксилних група на хинском делу молекула (Слика 42). Карактеристично за најстабилнији конформер је да су све водоничне везе усмерене ка депротонованој карбоксилној групи. Да бисмо идентификовали која се од две фенолне групе прва депротонује, испитана су оба дианјона: 3' (депротонована фенолна група у положају 3') и 4' (депротонована фенолна група у положају 4'). 4' дианјон је за 11.7 kJ mol^{-1} стабилнији од 3' дианјона.



Слика 42. Три најстабилнија конформера моноанјона хлорогенске киселине. Приказане релативне енергије су у kJ mol^{-1} .

Већа стабилност се може објаснити бољом делокализацијом негативног наелектрисања у 4' дианјону (Слика 43). Најстабилнији конформери карбоксилатног анјона (**5CQA⁻**) и 4' дианјона (**5CQA²⁻**) (Слика 41) искоришћени су за даља испитивања антиоксидативних механизма **5CQA** при физиолошким условима.



Слика 43. Расподела NBO наелектрисања у моноањјону и дианјонима хлорогенске киселине.

Термодинамичка испитивања

Како бисмо одредили егзергоне реакционе путеве за кинетичка испитивања, најпре смо израчунали Гибсове енергије реакција приказаних на Схеми 3.¹¹⁹ Резултати су приказани у Табели 24.

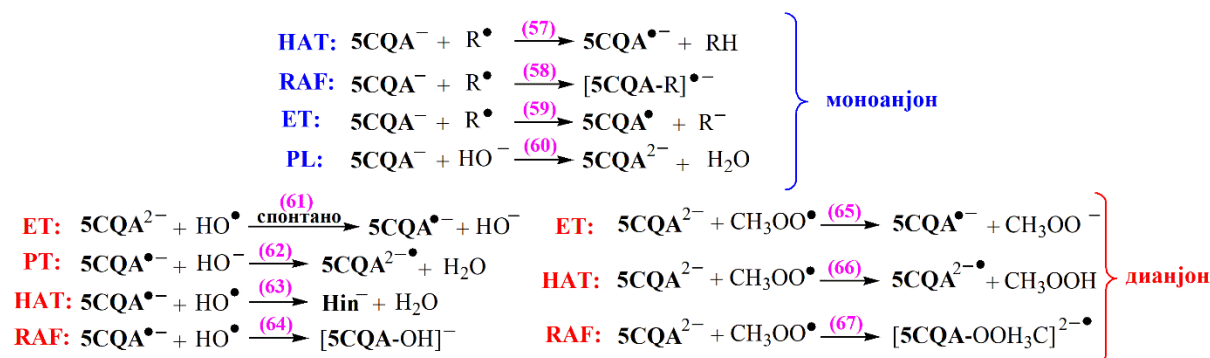


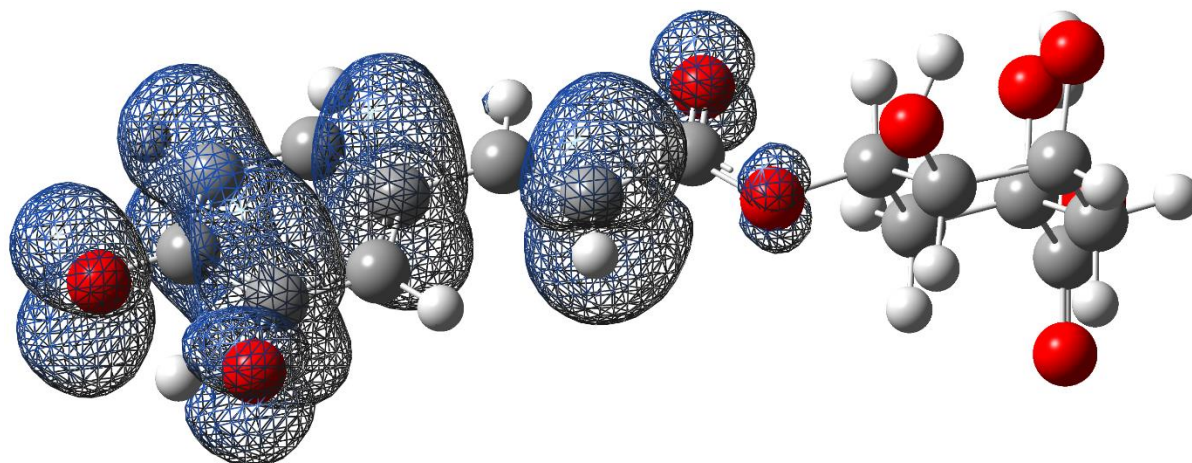
Схема 3. Могући антиоксидативни реакциони путеви хлоргенске киселине у базном воденом раствору; $\text{R}^\bullet = \text{HO}^\bullet$ или $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$; Hin^- се односи са хинон анјон хлоргенске киселине.

$\Delta_r G$ вредности за реакције (57) показују да 5CQA^- може да реагује са оба радикала у оба положаја преко НАТ механизма, при чему су реакције са HO^\bullet далеко егзергоније. РАФ реакције (58) са HO^\bullet су термодинамички повољне у свим положајима изузев у положају 9'. Као и у случају код неполарних растварача,¹¹¹ најегзергоније реакције су у положајима 7' и 8', које одговарају адицији HO^\bullet радикала на двоструку везу. Све РАФ реакције у присуству $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ су ендергоне, што се може приписати мањој реактивности и већој волуминозности овог радикала. Први корак SET-РТ механизма (реакција (59)) је изражено ендергон, тако да се овај механизам не одиграва. Са друге стране, у егзергоној реакцији (60), HO^- одузима протон од 5CQA^- , при чему настаје 5CQA^{2-} . Понашање дианјона се прилично разликује у присуству HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$. Наиме, у присуству HO^\bullet радикала, 5CQA^{2-} спонтано предаје електрон HO^\bullet , при чему настају $5\text{CQA}^{\bullet-}$ и HO^- (реакција (61)). Егзергона реакција преноса електрона је такође омогућена и чињеницом да је енергија НОМО орбитале (-0.21982 au) 5CQA^{2-} виша у односу на енергију SOMO орбитале (-0.4423 au) HO^\bullet радикала. Трансформација $5\text{CQA}^{\bullet-}$ и HO^- у $5\text{CQA}^{2-\bullet}$ и H_2O (реакција (62)) је такође егзергона. Може се закључити да ће у базној средини анјонске форме 5CQA реаговати са HO^\bullet преко SPLET (реакције (60) и (61)) и SET-РТ (реакције (61) и (62)) механизма. Откриће да 5CQA^{2-} не постоји у присуству HO^\bullet јер се спонтано претвара у $5\text{CQA}^{\bullet-}$ указује на то да НАТ и РАФ

механизме треба заправо испитивати као реакције $5CQA^{\bullet-}$ и HO^{\bullet} . У егзергоној НАТ реакцији (63) између $5CQA^{\bullet-}$ и HO^{\bullet} настаје одговарајући производ, $5CQA$ хинон анјон (Hin^-). У случају RAF механизма (реакције (64)), добијени су одговарајући радикалски адукти за реакције у положајима 1', 3', 5' и 8'. Спинска густина, која је делокализована тачно преко 1', 3', 5' и 8' sp^2 хибридованих С атома (Слика 44), показује да су искључиво ови угљеникови атоми подложни за напад слободних радикала. Наши многобројни покушаји да симулирамо адицију слободних радикала у преосталим положајима су били неуспешни.

Табела 24. Гибсове енергије реакција (57) – (67) у $kJ mol^{-1}$.

Радикал	HO^{\bullet}		CH_3OO^{\bullet}	
Положај	Реакција	$\Delta_r G$	Реакција	$\Delta_r G$
3'	(57)	-150.9	(57)	-7.0
4'	(57)	-161.0	(57)	-17.1
1'	(58)	-19.2	(58)	101.7
2'	(58)	-52.8	(58)	72.5
3'	(58)	-45.2	(58)	85.0
4'	(58)	-69.3	(58)	57.5
5'	(58)	-24.3	(58)	92.3
6'	(58)	-48.8	(58)	70.9
7'	(58)	-78.4	(58)	43.1
8'	(58)	-100.7	(58)	26.4
9'	(58)	34.5	(58)	163.0
/	(59)	107.1	(59)	203.6
4'	(60)	-128.0	(60)	-128.0
/	(61)	-33.0	(65)	63.5
3'	(62)	-145.3	/	/
3'	(63)	-194.4	(66)	-34.5
1'	(64)	-165.3	(67)	90.8
2'	(64)	/	(67)	70.8
3'	(64)	-171.7	(67)	55.8
4'	(64)	/	(67)	80.2
5'	(64)	-178.0	(67)	72.2
6'	(64)	/	(67)	65.8
7'	(64)	/	(67)	58.1
8'	(64)	-211.7	(67)	28.1
9'	(64)	/	(67)	84.6



Слика 44. Површина спинске густине у радикал анјону хлорогенске киселине.

У реакцији 5CQA^{2-} са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ пренос електрона (реакција (65)) је ендергон процес, што значи да у овом случају не долази до спонтаног преласка 5CQA^{2-} у $5\text{CQA}^{\bullet-}$. Добијени резултат открива да у случају реакције између 5CQA^{2-} и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ ни SPLET ни SET-PT нису оперативни механизми. Вредности за Гибсове енергије у реакцији (66) која представља НАТ механизам и реакције (67) које представљају RAF механизам показују да је НАТ реакциони пут једини термодинамички повољан пут за хватање $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикала.

Кинетичка испитивања

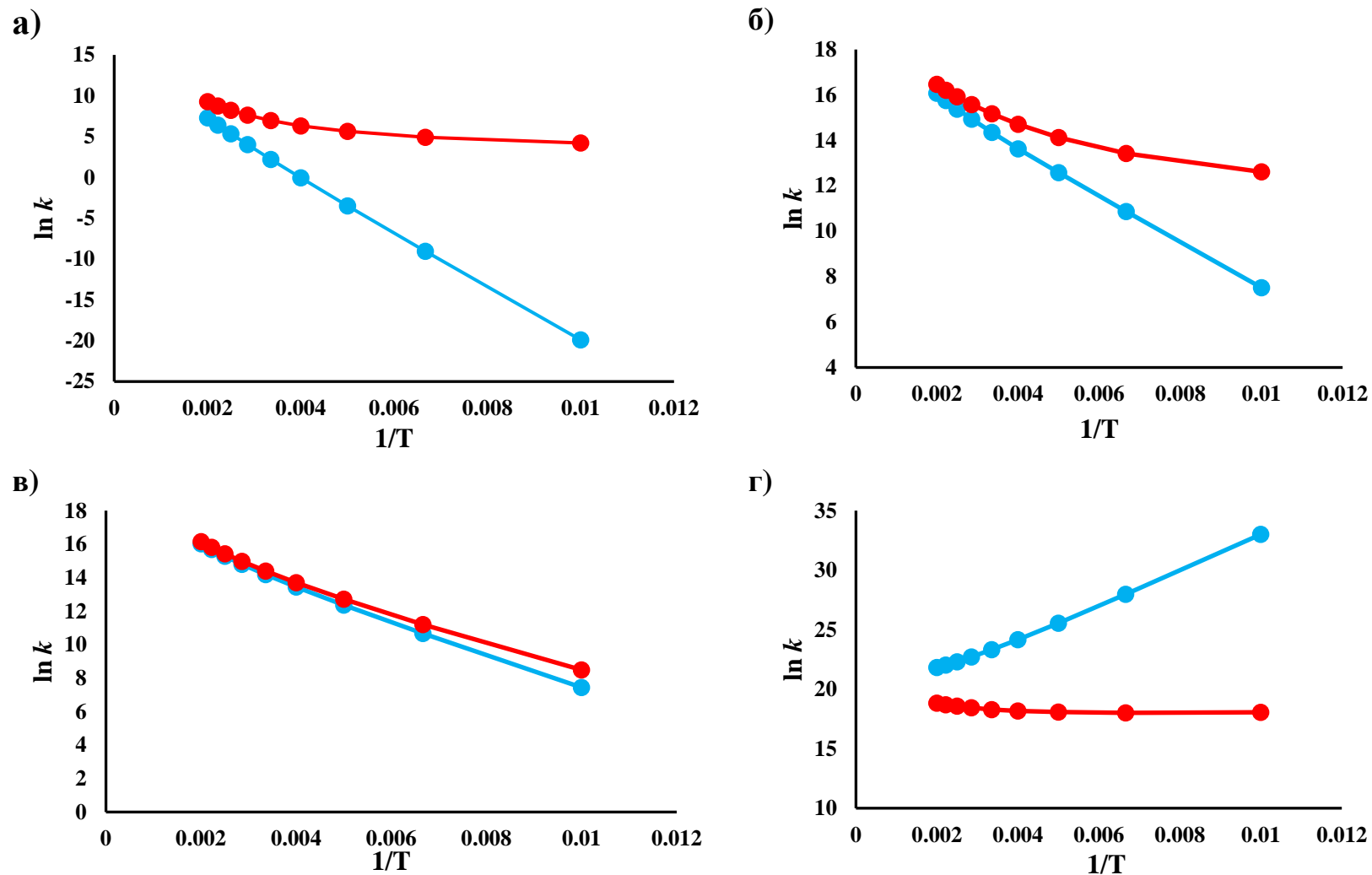
Све егзергоне реакције из Табеле 24 су подвргнуте даљим кинетичким испитивањима. Вредности за енергије активације, константе брзине и релативну количину производа су приказане у Табели 25. Зависност k_{TST} и $k_{\text{ZCT-0}}$ константи брзина од температуре су приказане на Слици 45. Уочљива је разлика између вредности на ниским температурама, која се јавља услед ефекта тунеловања. Ефекат тунеловања је омогућен чињеницом да НАТ механизам укључује размену лаког водониковог атома. Ефекат слаби са повећањем температуре, тако да на собној температури постаје занемарљив. У већини RAF реакција два скупа константи брзина су међусобно козистентна, што се види и на Слици 45 под в). У ретким случајевима, као што је нпр. реакција у положају 8' (Слика 45 под г)), k_{TST} опада са повећањем температуре и $k_{\text{ZCT-0}}$ вредности су на свим температурама значајно ниже. Очигледно је да у оваквим случајевима конвенционална TST теорија није погодна за одређивање брзина. Као и у случају код испитивања најповољнијих реакција 5CQA и Tx са HO^\bullet у неполарним

растварачима (Слике 39 и 40), и реакција у положају 8' се одвија преко мале енергетске баријере, тако да се подбацивање TST приписује равној површини потенцијалне енергије.

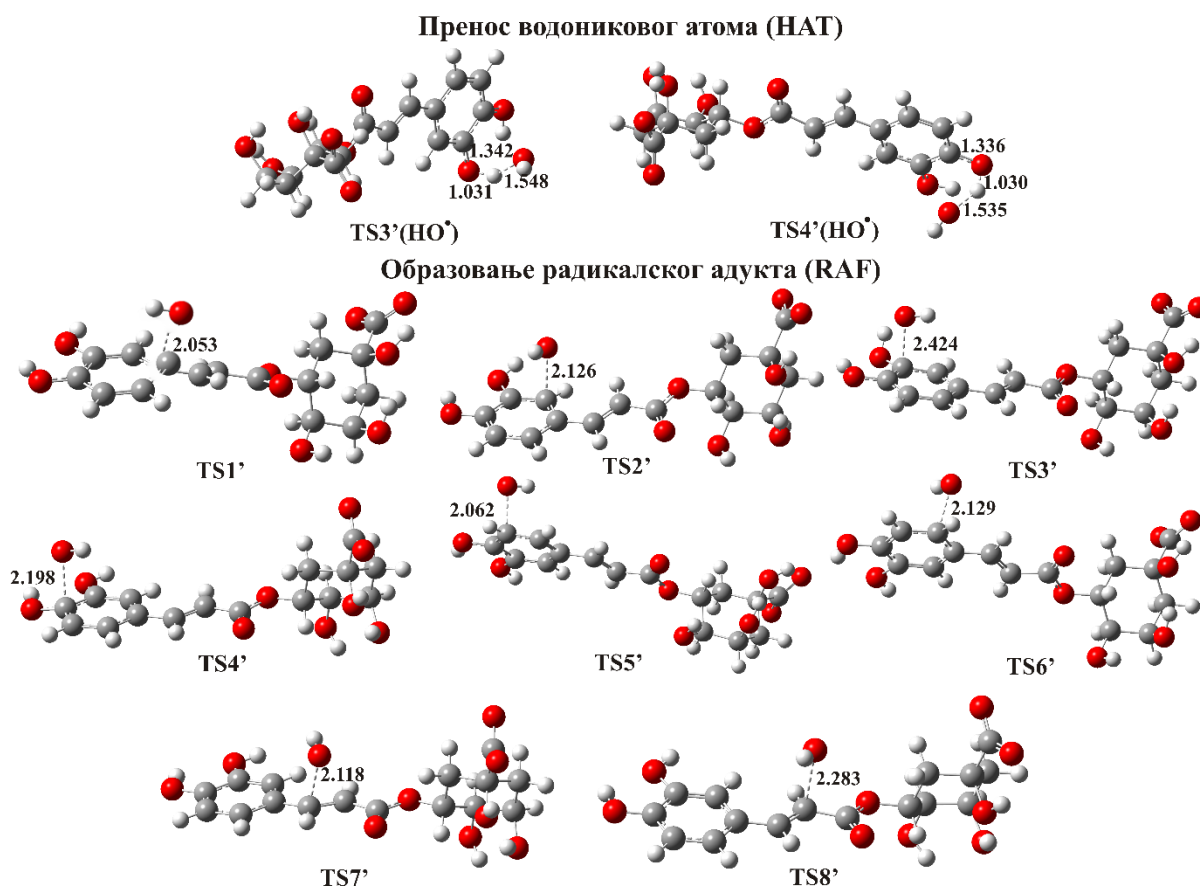
Табела 25. Енергије активације ΔG_a^\ddagger у kJ mol^{-1} , константе брзине k у $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и релативна количина производа Γ у % за реакције моноањона и дианјона хлорогенске киселине са HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$.

Радикал		HO^\bullet			$\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$			
Положај	Реакција	ΔG_a^\ddagger	k	Γ	Реакција	ΔG_a^\ddagger	k	Γ
3'	(57)	45.4	3.87×10^6	0.10	(57)	75.5	1.05×10^3	55.50
4'	(57)	47.5	1.93×10^6	0.05	(57)	75.1	8.45×10^2	44.50
1'	(58)	45.8	1.78×10^6	0.04				
2'	(58)	30.3	1.41×10^8	3.55				
3'	(58)	30.5	1.36×10^8	3.43				
4'	(58)	32.1	7.18×10^7	1.81				
5'	(58)	38.2	3.82×10^7	0.96				
6'	(58)	36.2	7.79×10^7	1.96				
7'	(58)	36.7	5.52×10^7	1.39				
8'	(58)	23.2	8.84×10^7	2.23				
4'	(60)	~0.0	1.91×10^9	7.45				
/	(61)	6.7	8.28×10^9	32.31				
3'	(62)	~0.0	1.91×10^9	7.45				
3'	(63)	~0.0	1.91×10^9	7.45	(66)	123.0	1.49×10^{-7}	0.00
1'	(64)	~0.0	1.91×10^9	7.45				
3'	(64)	~0.0	1.91×10^9	7.45				
5'	(64)	~0.0	1.91×10^9	7.45				
8'	(64)	~0.0	1.91×10^9	7.45				
k_{overall}		4.83×10^9			1.64×10^3			

Најпре ће бити дискутовани резултати који се односе на веома комплексну реактивност HO^\bullet радикала са 5CQA^- и 5CQA^{2-} . Пронађена су сва прелазна стања за НАТ и RAF реакционе путеве молекула 5CQA^- (реакције (57) и (58)) (Слика 46). Као што је и очекивано, НАТ механизам је бржи у положају 3'.^{108,111} Уколико се упореде вредности за константе брзине, примећује се да су RAF реакције за један или два реда величине брже од НАТ реакција. Највеће константе брзине су израчунате за RAF реакције у положајима 2' и 3'. Заједничка особина за два прелазна стања је постојање водоничне везе између HO^\bullet и Н3' која стабилизује систем (Слика 46).



Слика 45. Зависност $\ln k_{ZCT-0}$ (црвена) и $\ln k_{TST}$ (плава) од реципрочне температуре за реакције моноањона хлорогенске киселине са: а) $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ у положају 4' (НАТ), б) $\text{HO}\cdot$ у положају 3' (НАТ), в) $\text{HO}\cdot$ у положају 1' (РАФ) и г) $\text{HO}\cdot$ у положају 8' (РАФ).

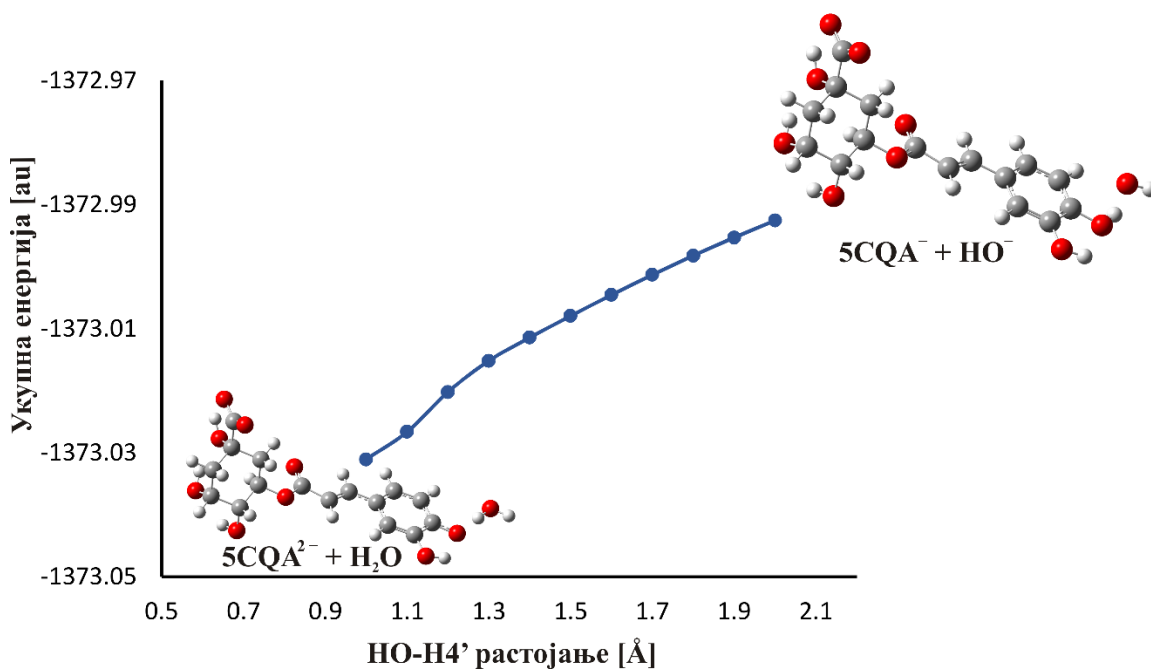


Слика 46. Оптимизоване геометрије прелазних стања за НАТ и RAF реакције моноанјона хлорогенске киселине са HO^\bullet .

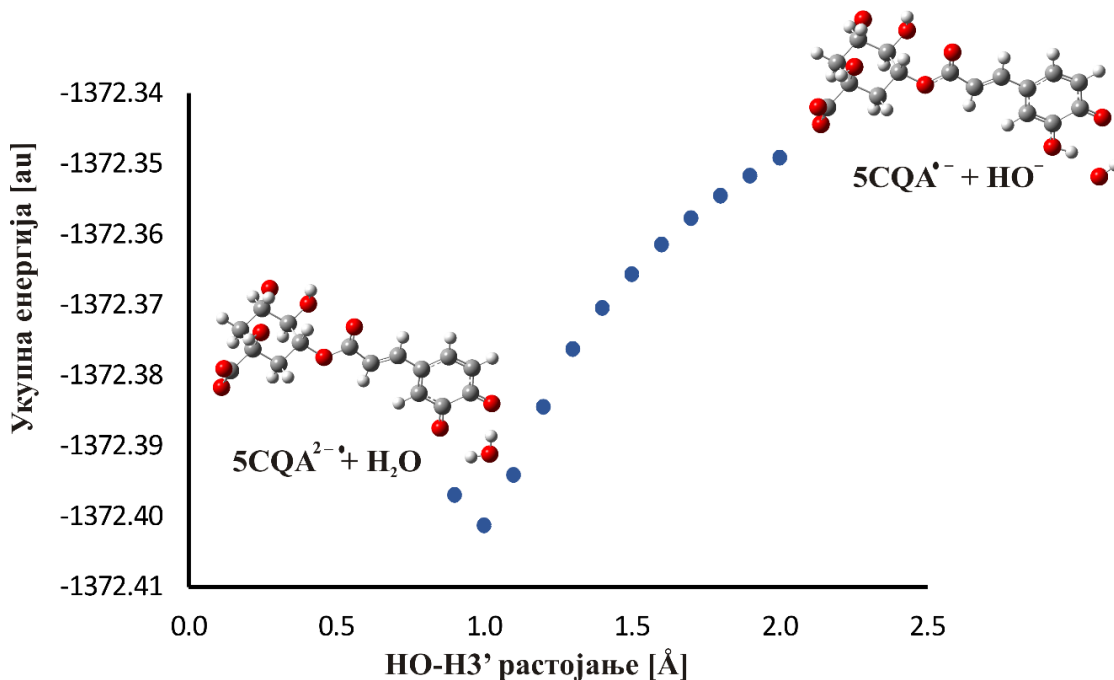
Такође, велико парцијано негативно NBO наелектрисање чини $\text{C}2'$ атом веома погодним за напад електрофилног HO^\bullet . Иако се реакција у положају $8'$ одликује најнижом енергијом активације, ово није најбржи RAF реакциони пут.

Узимајући у обзир да су реакције (60) – (64) изражено егзергоне и да су сви наши покушаји да одредимо прелазна стања за реакције (60) и (62) – (64) били неуспешни, логично је да се претпостави да су ови процеси спонтани. Како бисмо потврдили претпоставку, сваку од наведених реакција смо испитивали на следећи начин. Испитивана је зависност укупне енергије од одговарајуће реакционе координате (нпр. $\text{HO}^\bullet\text{--X}$ растојање). За ту сврху, HO^\bullet је постављан у близини X атома и затим је постепено приближаван све док се не награде производи. У случају реакције преноса протона са 5CQA^- на HO^\bullet (реакција (60)) и са $5\text{CQA}^{\bullet-}$ на HO^\bullet (реакција (62)) као реакциона координата су изабрана $\text{HO--H}4'$ и $\text{HO--H}3'$ растојања. Са Слика 47 и 48 се види да са смањивањем изабраних растојања долази до константног опадања укупне енергије, па се може закључити да су ове реакције контролисане дифузијом и њима су додељене константе брзине од $1.91 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. С обзиром на то да константа брзине за

реакцију преноса електрона (61) износи $8.28 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, може се сматрати да је и ова реакција контролисана дифузијом.

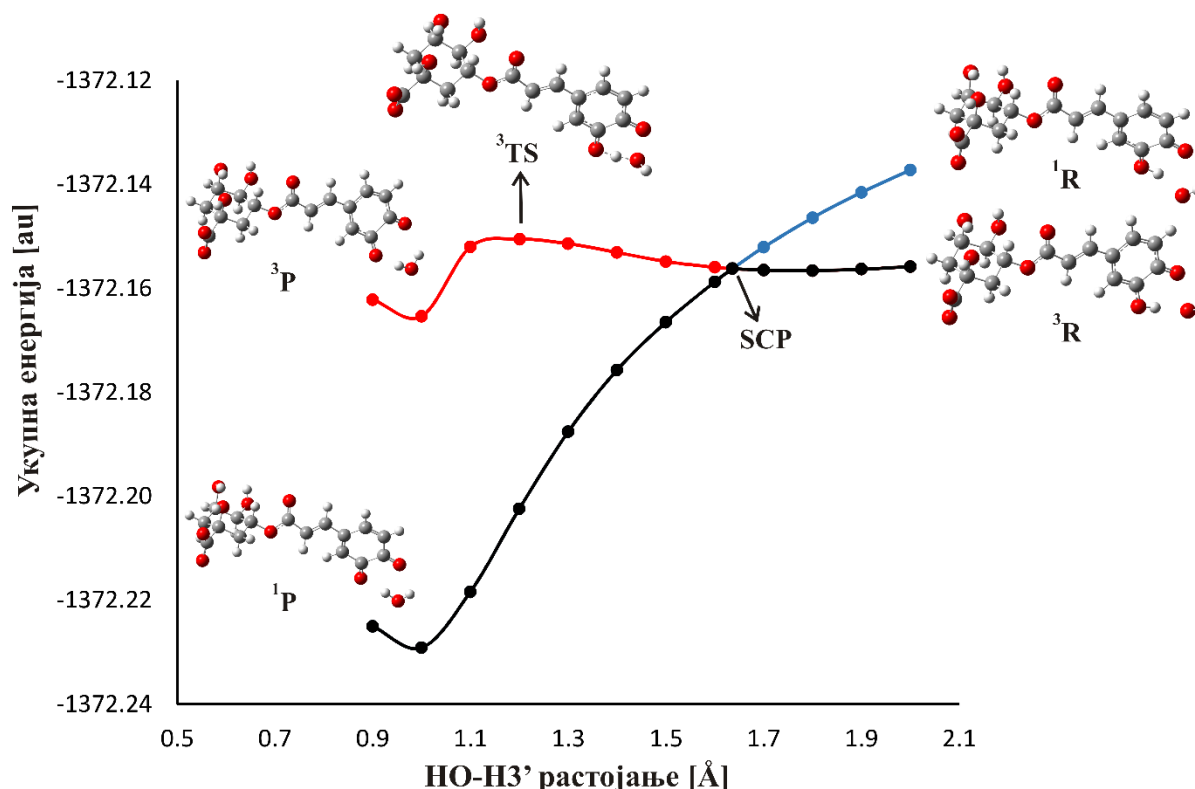


Слика 47. Зависност укупне енергије од HO–H4' растојања у реакцији прелаза протона са моноањона хлорогенске киселине на HO⁻.

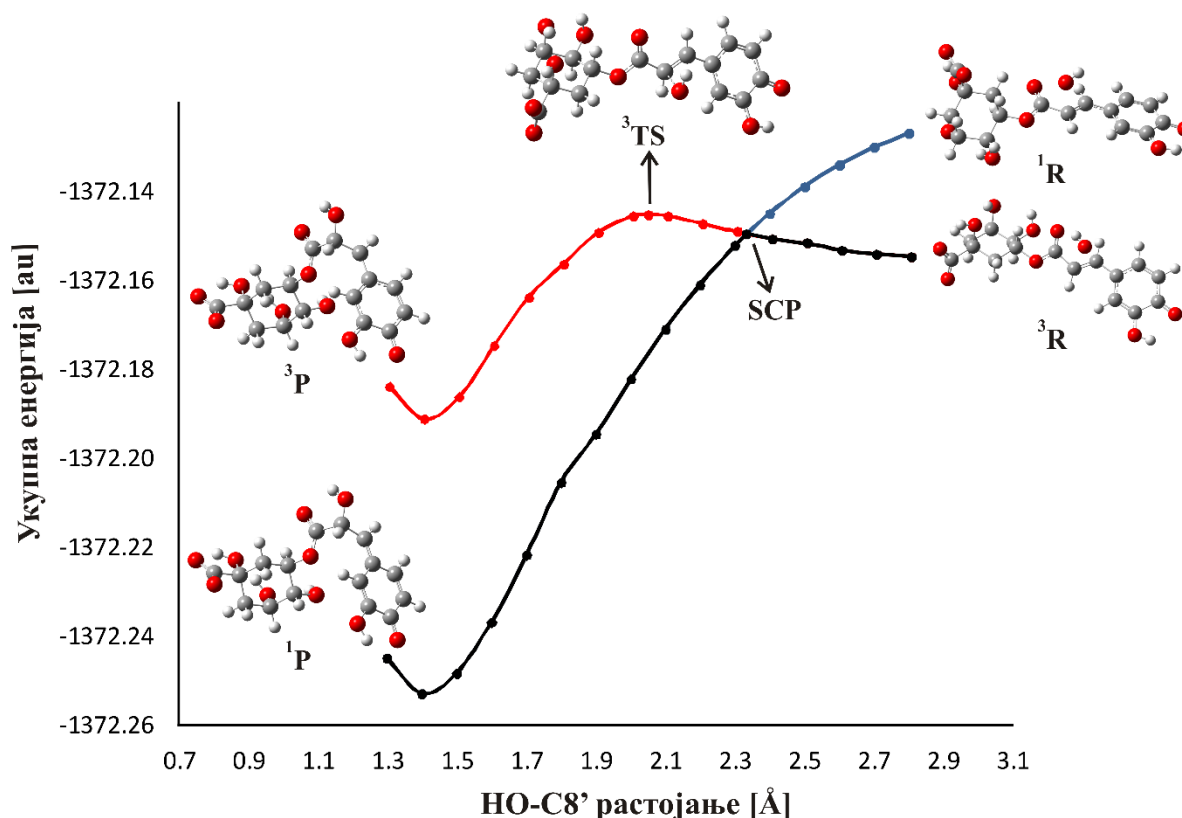


Слика 48. Зависност укупне енергије од HO–H3' растојања у реакцији преноса протона са радикал ањона хлорогенске киселине на HO⁻.

У НАТ и RAF реакцијама (63) и (64), у којима су оба реактанта у дублетном стању, дуж реакционе координате долази до промене мултиплицитета спина. Наиме, реактанти $5\text{CQA}^{\bullet-}$ и HO^{\bullet} образују триплет, док су одговарајући производи – $\text{Hin}^- + \text{H}_2\text{O}$, као и $[\text{5CQA-OH}]^-$ у синглетном стању. Како у овим случајевима долази до промене у спинском стању, није могуће да се примени једноставна процедура као за реакције (60) и (62). За ове специфичне реакције, које се одигравају на две површине потенцијалне енергије, испитиван је феномен који се назива реактивност у два спинска стања (*Two-State Reactivity*, TSR), а уочен је у многим органским, неорганским и органометалним реакцијама.^{120–122} Феномен укључује испитивање ефеката који потичу од промене спинског стања приликом одређивања реакционих механизма, константи брзина и релативне количине производа. И у овим случајевима испитивана је зависност укупне енергије од одговарајућих реакционих координата. У случају НАТ реакције, као реакциона координата је изабрано $\text{HO-H3}'$ растојање. У случају RAF механизма, као репрезентативни пример је изабрана реакција у положају $8'$, при чему је у овом случају реакциона координата $\text{HO-C8}'$ растојање.



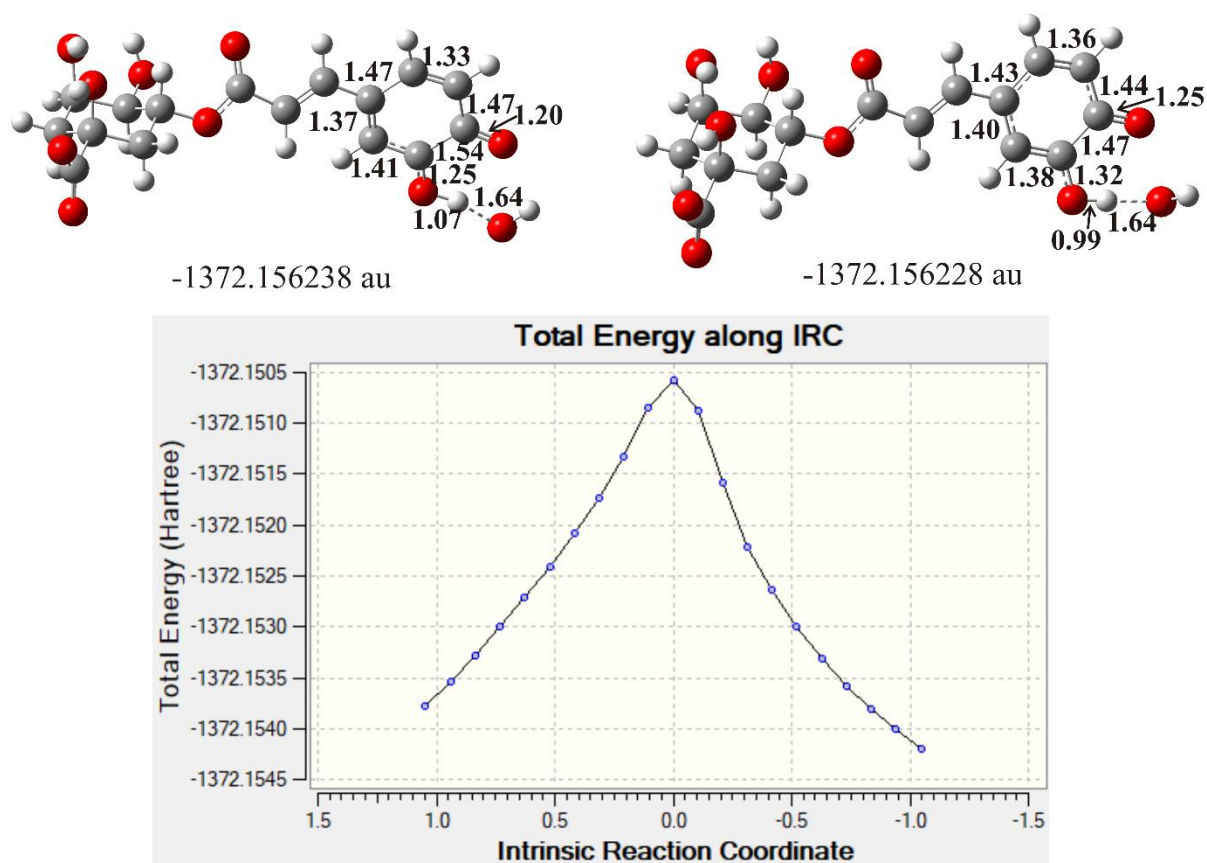
Слика 49. Енергетски дијаграм за НАТ реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^{\bullet} у синглетном (плава линија) и триплетном (црвена линија) стању. Црна линија означава претпостављени реакциони ток. Тачка у којој долази до инверзије спина (SCP) се налази на $\text{HO-H3}'$ растојању од 1.636 \AA .



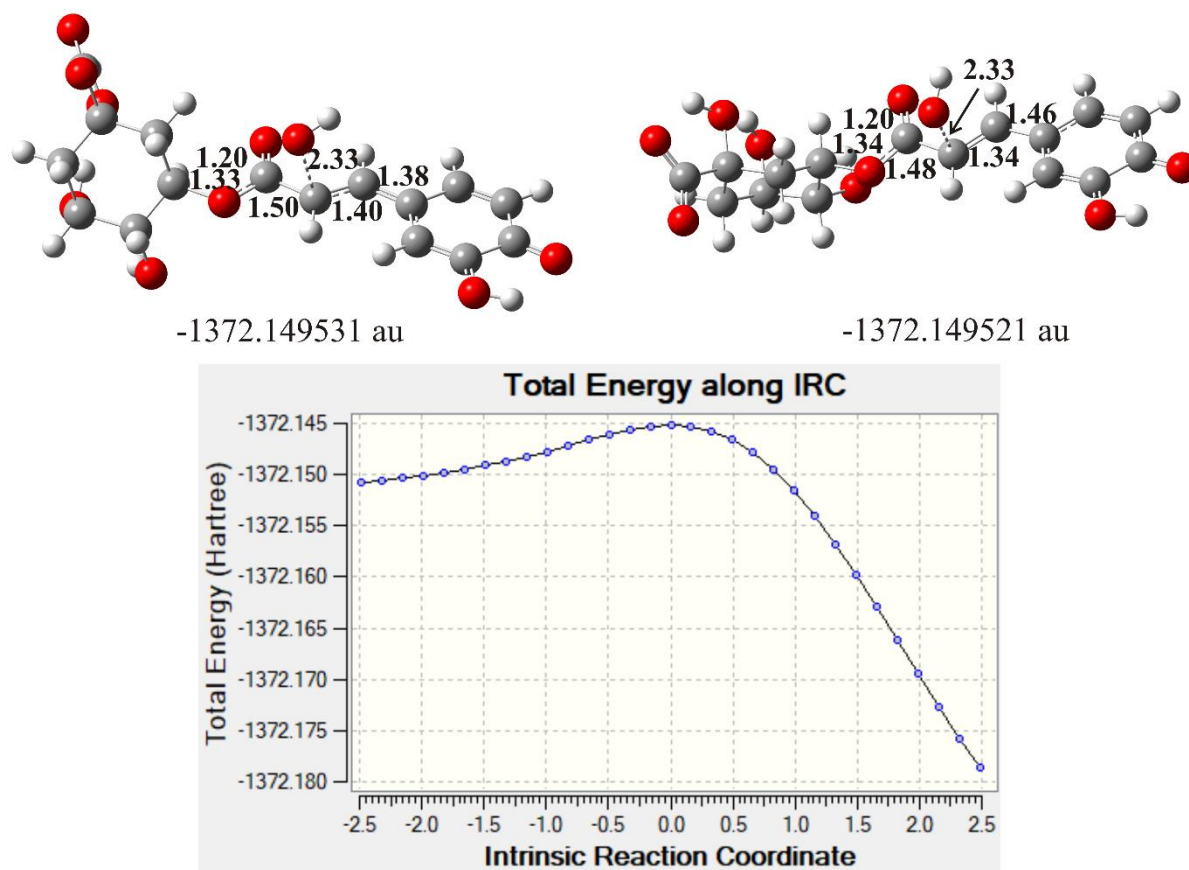
Слика 50. Енергетски дијаграм за RAF реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO• у синглетном (плава линија) и триплетном (црвена линија) стању. Црна линија означава претпостављени реакциони ток. Тачка у којој долази до инверзије спина (SCP) се налази на HO–C8' растојању од 2.334 Å.

У оба случаја је проучаван процес приближавања HO• према активном центру и у синглетном и у триплетном стању. Сlike 49 и 50 показују да енергије синглетних стања константно опадају идући од реактаната ка производима, док се реакције у триплетном стању одвијају преко енергетске баријере. И у НАТ и у RAF реакцији реактанти су стабилнији у триплетном стању, док су производи у синглетном стању далеко стабилнији. Дакле, када су $5\text{CQA}^{\bullet-}$ и HO• на довољно великој удаљености, постоје као дублети. Како прилазе једно ка другом, енергија благо расте све до тачке у којој долази до инверзије спина (*Spin Crossing Point*, SCP). У овој тачки скоро дегенерисане синглетне и триплетне структуре су веома сличне геометрије (Сlike 51 и 52), што омогућава да дође до инверзије спина. Уместо да реакција иде преко енергетски захтевног триплетног прелазног стања, учесници реакције спонтано прелазе у много стабилније синглетне производе. Узимајући све чињенице у обзир, закључујемо да су НАТ и RAF реакције дианјона са HO• такође дифузијом контролисане реакције.

Веома је интересно да се упореди добијена k_{overall} вредност са вредношћу константе брзине добијене експерименталним мерењима. Наиме, резултати Кона (Копо) и његових сарадника, који су добијени помоћу пулсне радиолизе, показују да константа брзине за реакцију **5CQA** са HO^\bullet на $\text{pH} = 7.4$ износи $3.34 \pm 0.19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹²³ Израчуната k_{overall} вредност за исту реакцију износи $4.83 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Табела 25). Као закључак се може извести да је примењена рачунарска методологија успешно квантификовала екстремну реактивност HO^\bullet радикала, што је довело до изузетно доброг слагања између израчунатих и експерименталних резултата. Из Табеле 25 се увиђа да су највеће Γ вредности добијене за реакције дианјона, при чему су све оне контролисане дифузијом. Иако је при физиолошким условима концентрација дианјона мања у односу на моноанјон, допринос дианјона у хватању HO^\bullet је подједнако важан.



Слика 51. Структура тачке у којој долази до инверзије спина за НАТ реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^\bullet у синглетном (горе лево) и триплетном (горе десно) стању. Назначене су укупне енергије структура. Резултат IRC рачуна за триплетно стање (доле).



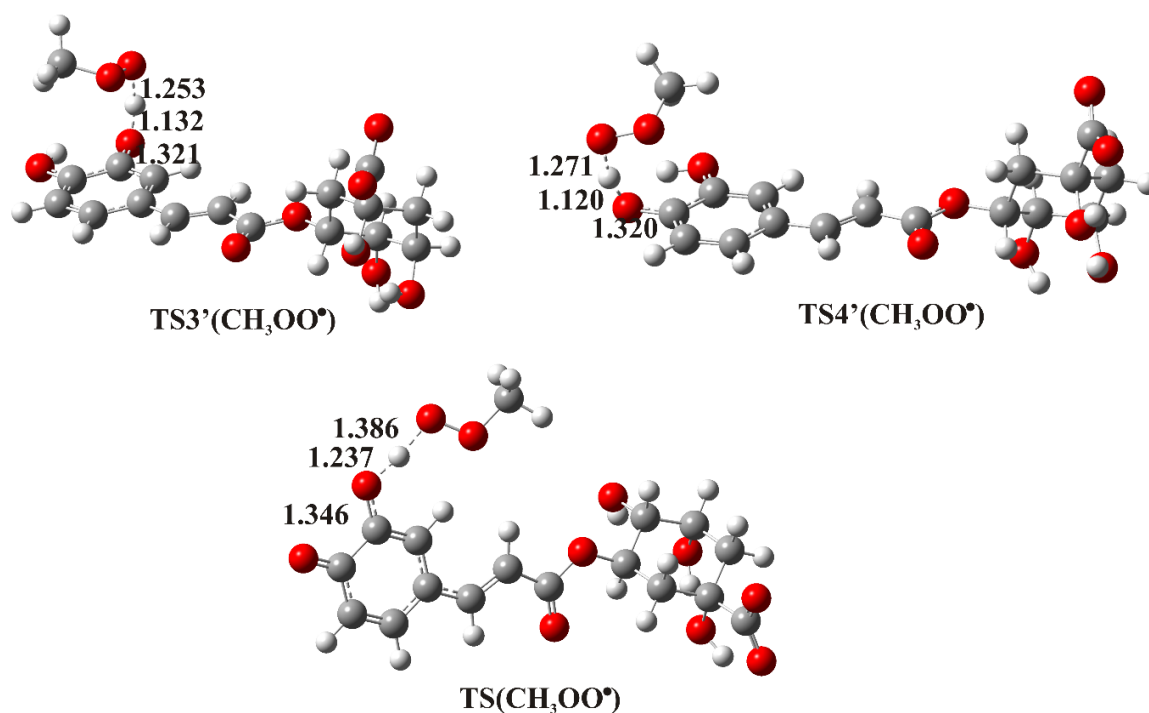
Слика 52. Структура тачке у којој долази до инверзије спина за RAF реакцију између радикал анјона хлорогенске киселине и HO^\bullet у синглетном (горе лево) и триплетном (горе десно) стању. Назначене су укупне енергије структура. Резултат IRC рачуна за триплетно стање (доле).

Реактивност $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ према анјонским облицима 5CQA је доста једноставнија. Пронађена су оба прелазна стања за НАТ реакције 5CQA^- (реакције (57)) (Слика 53). Као што је и очекивано, вредности за константе брзине за НАТ реакције су мање у односу на одговарајуће реакције са HO^\bullet , али је тренд реактивности исти.

Прелазно стање за НАТ реакциони пут између 5CQA^{2-} и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ заслужује посебну пажњу. Поред бројних неуспешних покушаја да се добије прелазно стање, овде ће бити речи о приступу који је био релативно успешан. За испитивање прелазног стања изабрано је $\text{O3}'\text{--H3}'$ растојање као реакциона координата, при чему је $\text{H3}'$ атом постепено одаљаван од 5CQA^{2-} , и на тај начин је заправо приближаван радикалу. Са Сlike 54 се види да укупна енергија расте са повећањем $\text{O3}'\text{--H3}'$ растојања до енергетског максимума и затим нагло опада до енергетском минимуму. Даље повећање $\text{O3}'\text{--H3}'$ растојања води до благог смањења укупне енергије система. Важно је напоменути да је $\text{O3}'\text{--H3}'$ растојање у енергетском максимуму (1.23719 \AA) за само 0.001 \AA краће него у енергетском минимуму (1.23819 \AA). Са друге стране, $\text{H3}'\text{--OOCN}_3$

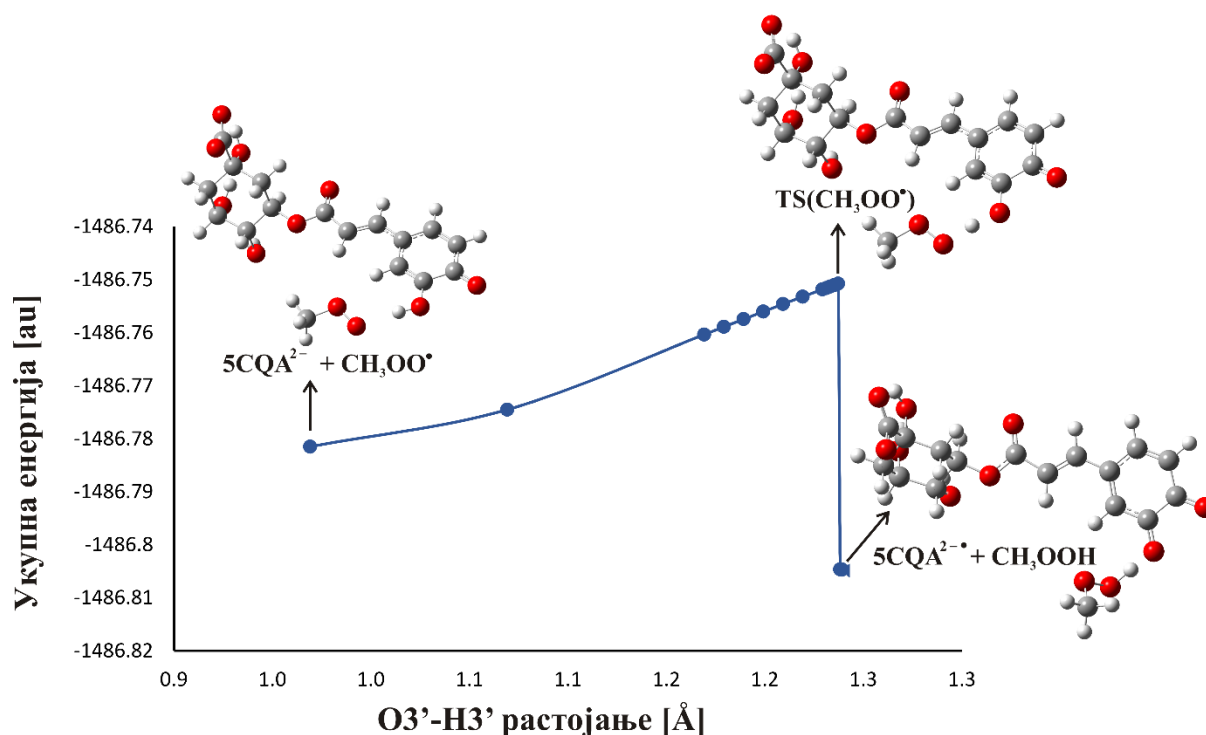
растојање у енергетском максимуму и минимуму износи 1.38640 и 1.12127 Å, док је разлика у енергији чак 141.5 kJ mol⁻¹.

Упечатљива особина пронађеног максимума је да поседује једну јаку имагинарну вибрациону фреквенцију која одговара жељеном кретању НЗ' атома између два кисеоника. Подразумева се да смо добијену структуру за енергетски максимум користили као почетну геометрију при оптимизацији прелазног стања помоћу различитих теоријских метода (M05-2X, B3LYP, B3LYP-D3), солватационих модела (SMD у случају воде и ни један за гасовито стање), као и кључне речи (iop(1/8=2), int=grid=ultrafine, scf=qс). Међутим, сви наши покушаји су резултирали тиме да или није дошло до конвергенције система, или је дошло до везивања НЗ' за један од два кисеоника.



Слика 53. Оптимизоване геометрије прелазних стања добијених за НАТ реакције између моноанјона хлорогенске киселине са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ (горе). Апроксимација прелазног стања за НАТ реакцију између динанјона хлорогенске киселине са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ (доле).

Узимајући све чињенице у обзир, закључили смо да је енергетски максимум са једном жељеном имагинарном вибрацијом прихватљива апроксимација структуре и енергије правог прелазног стања (($\text{TS}(\text{CH}_3\text{OO}^\bullet)$) на Слици 53). Дакле, константа брзине приказана у Табели 25 је израчуната помоћу ове структуре. Као што је и очекивано, k вредност, као и одговарајућа Γ вредност, су изузетно ниске, што доказује да је допринос овог реакционог пута укупној антиоксидатвној активности **5CQA** према $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ занемарљив.



Слика 54. Зависност укупне енергије од $O3'$ – $H3'$ растојања у НАТ реакцији између дианјона хлорогенске киселине и CH_3OO^\bullet .

Испитивање моноанјона тролокса

Термодинамичка испитивања

Реакције преко којих Tx^- остварује своју антиоксидативну активност су приказане на Схеми 4. Гибсове енергије испитиваних реакција су наведене у Табели 26.

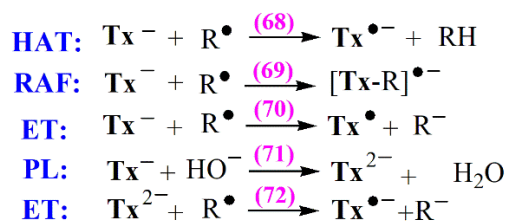


Схема 4. Могући антиоксидативни реакциони путеви тролокса у базној воденој средини; $R^\bullet = HO^\bullet$ или CH_3OO^\bullet .

Табела 26. Гибсове енергије реакција (68) – (72) изражене у kJ mol^{-1} .

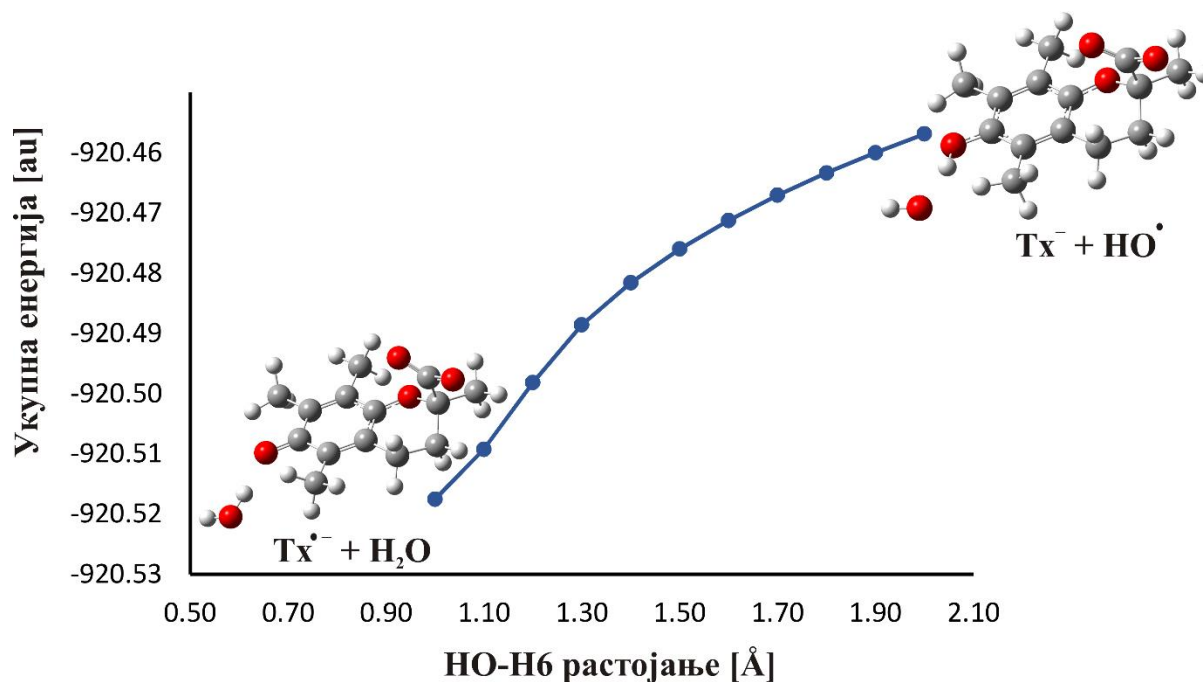
Положај	Радикал		
	Реакција	HO•	CH ₃ OO•
6	(68)	$\Delta_r G$ -176.6	$\Delta_r G$ -36.2
1	(69)	46.7	178.5
5	(69)	-53.8	70.7
6	(69)	-63.1	61.7
7	(69)	-43.3	79.0
8	(69)	-64.9	89.2
9	(69)	-33.0	90.4
10	(69)	-26.8	93.1
/	(70)	23.8	120.3
6	(71)	-53.9	-59.9
/	(72)	-126.1	-29.6

Из Табеле 26 је очигледно да Tx^- и са HO• и са CH₃OO• радикалима може да реагује преко НАТ механизма (реакција (68)), док је RAF механизам (реакције (69)) могућ само у случају HO•. У случају RAF реакција, неповољна је једино она у положају 1 и то највероватније због великог парцијално позитивног наелектрисања на атому C1. Ендергона реакција у којој долази до преласка електрона (70) указује да SET-PT механизам није оперативан ни у једном случају. Оба корака SPLET механизма (реакције (71) и (72)) имају негативне $\Delta_r G$ вредности. Дакле, HO⁻ може да одузме протон од Tx^- како би настао Tx^{2-} . Узимајући у обзир да Tx^{2-} настаје тек на већим рН вредностима (рН>11), логично је да се претпостави да SPLET механизам није одговоран за антиоксидативну активност Tx према изабраним радикалима у физиолошким условима.¹¹⁵

Кинетичка испитивања

НАТ и RAF механизми у случају реакције Tx^- са HO•, као и НАТ механизам у случају реакције између Tx^- и CH₃OO• су испитивани даље кинетички. Бројни покушаји да се пронађе прелазно стање за НАТ реакцију између Tx^- и HO• водили су ка настанку производа $\text{Tx}^{\bullet-}$ и H₂O, што води ка претпоставци да је ова реакција спонтана. Као и у процедури коју смо примењивали за сличне реакције молекула **5CQA**, реакција је испитивана на тај начин што је праћена зависност укупне енергије од HO–H6 растојања (Слика 55). Прелазна стања за остале ендергоне реакције су пронађена и израчунате су одговарајуће константе брзине. Геометрије прелазних стања

су приказана на Слици 56, док су енергије активације, као и k и Γ вредности дате у Табели 27.

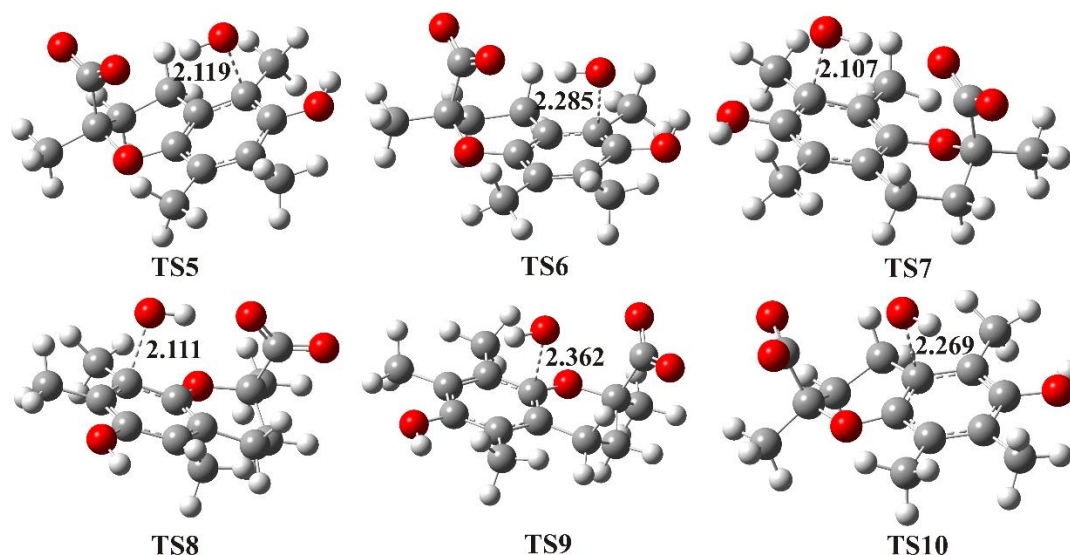


Слика 55. Зависност укупне енергије од HO–H6 растојања у HAT реакцији између тролокса и HO•.

Резултати приказани у Табели 27 показују да је HAT реакција између Tx^{•-} и HO• много бржа од оне са CH₃OO•. Константе брзине за RAF реакције су за два до три реда величине ниже од HAT реакције. Најмања вредност за енергју активације се добија за RAF реакцију у положају 8 и може се објаснити чињеницом да између HO• и карбоксилатног анјона у TS8 прелазном стању постоји водонична веза која стабилизује систем (Слика 56). Највећи допринос укупној константи брзине потиче од HAT реакције, што се, наравно, огледа и у високој Γ вредности (98.40 %).

Табела 27. Енергије активације ΔG_a^\ddagger у kJ mol⁻¹, константе брзине k у M⁻¹s⁻¹ и релативна количина производа Γ у % за реакције моноанјона тролокса са HO• и CH₃OO•.

Радикал		HO•			CH ₃ OO•		
Положај	Реакција	ΔG_a^\ddagger	k	Γ	ΔG_a^\ddagger	k	Γ
6	(68)	~ 0.0	1.91×10 ⁹	98.40	57.7	1.70×10 ⁴	100
5	(69)	14.3	1.74×10 ⁶	0.09			
6	(69)	13.7	1.59×10 ⁶	0.08			
7	(69)	22.1	1.60×10 ⁶	0.08			
8	(69)	8.6	1.28×10 ⁶	0.07			
9	(69)	37.8	1.18×10 ⁶	0.06			
10	(69)	29.6	2.38×10 ⁷	1.23			
k_{overall}			1.94×10 ⁹			1.70×10 ⁴	



Слика 56. Оптимизоване геометрије прелазних стања за RAF реакције између тролокса и HO^\bullet .

Треба напоменути да ово није прво теоријско испитивање које се односи на антиоксидативне механизме **Tx**. Једињење је испитивано помоћу исте процедуре, али применом другог теоријског модела, како би се одредила k_{overall} вредност у воденом раствору.¹¹⁴ Главна разлика између Албертових¹¹⁴ и наших радова се односи на резултате везане за реакцију прелаза електрона (70). Наиме, резултати Алберта и његових сарадника показују да је реакција термодинамички повољна. Међутим, у нашем случају се испоставило да је ова реакција ендергона (слично као и реакција преноса електрона са 5CQA^- на HO^\bullet), тако да овај реакциони пут није укључен приликом процењивања вредности за укупну константу брзине. Ендергоност реакције прелаза електрона се може приписати великој стабилности одговарајућих карбоксилатних ањона.

На основу израчунатих k_{overall} вредности за реакције 5CQA и **Tx** са HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикалима у води могу се одредити и r^\ddagger вредности. Добијене вредности за реакције са HO^\bullet и $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ износе 2.49 и 0.10, што значи да је у поређењу са **Tx**, 5CQA реактивнија према HO^\bullet , али је мање реактивна према $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$. Потпуно идентичан редослед реактивности се добија и у случају неполарних растварача.¹¹¹



ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије

5CQA, DPPH• (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил), H₂O₂, FeSO₄ и ДТРА (диетилентриаминпентасирћетна киселина) су купљени од произвођача Sigma Aldrich, Тауфкирхен, Немачка. DEPMPO spin-trap (5-(диетоксифосфорил)-5-метил-1-пиролин-N-оксид) набављен је од произвођача Enzo Life Sciences Inc., Фармингдејл (Њујорк), САД. DEPMPO spin-trap је пречишћен и тестиран на нечистоће хидроксиламина помоћу установљене процедуре.¹²⁴ У експериментима је коришћена дејонизована 18 МΩ H₂O.

Снимање спектра

IR спектар је снимљен на Thermo Nicolet 6700 FT-IR спектрометру са ATR и DTGS TЕС детекторима.⁶⁹ Спектар је сниман у средњој IR области од 4000 до 400 cm⁻¹. Примењена спектрална резолуција је била 2 cm⁻¹, број скенирања узорка, као и број скенирања позадине, износио је 512. Узорак **5CQA** је припремљен у смеши са калијум бромидом у односу 1 : 200 mg (**5CQA** : KBr). Раман-ски спектар је снимљен помоћу Thermo Scientific DXR Раман микроскопа.⁶⁹ Спектар је побуђен помоћу ласера са карактеристикама: diode pumped solid state high-brightness 532 nm. Сочиво објектива је 50×. Распршена светлост је анализирана помоћу спектрографа са решетком од 900 линија/mm. Спектар је добијен директно из чистог прашкастог узорка у области 3400–400 cm⁻¹. Побуђени спектар је држан на 10 mW. Време аквизиције је било 10 s са 10 скенова. Одрађена је и корекција за флуоресценцију. Thermo Scientific OMNIC софтвер је коришћен за прикупљање и обраду података. NMR спектри у DMSO-*d*₆ растварачу са TMS-ом као интерним стандардом су снимљени на Varian Gemini 200 MHz NMR спектрометру (¹H на 200 и ¹³C на 50 MHz).⁶⁹ UV спектар у метанолу је снимљен помоћу Cary Series UV-vis спектрофотометру (Agilent Technologies) у области од 200 до 400 nm у кварцним ћелијама дебљине 1.0 cm.⁶⁹

ESR мерења

ESR спектри су снимани на собној температури помоћу Bruker Elexsys E540 ESR спектрометра (Bruker, Билерика, Масачусетс, САД), који ради на 9.51 GHz са следећим подешавањима: модулација амплитуде – 1 G; модулација фреквенције – 100 kHz; микроталасна снага – 10 mW.⁷¹ Спектри су снимљени помоћу EХерг софтвера (Bruker BioSpin). **5CQA** узорци су стављани у гасно пропустљиве тефлонске цевчице (Zeus индустрије, Ратиран, САД) (дебљина зида је 0.025 mm, а унутрашњи пречник је 0.6 mm). Сва мерења су извођена под нормалним условима, при чему су тефлонске цевчице убациване у кварцне капиларе.

У DPPH• експериментима као контролни узорак је припремљен раствор DPPH• у етанолу. Узорци су инкубирани 20 минута на собној температури, при чему је скенирање вршено на свака 4 минута. Мерена је релативна висина средњег ESR пика који се појављује у ESR спектру.

Способност **5CQA** да хвата HO• радикале тестирана је помоћу Фентонове реакције и DEPMPO spin-trap-а као контролног узорка. Фентонова реакција је изведена помоћу 5 mM H₂O₂, 5 mM FeSO₄ и 100 mM spin-trap-а. pH вредност раствора је износила 3.5.

Способност **5CQA** да уклони O₂^{-•} је испитивана помоћу рибофлавин-светлосног система који заправо служи за добијање супероксил радикал анјона. 0.05 mM раствор рибофлавина који је обогаћен кисеоником, у присуству DTPA и 100 mM DEPMPO spin-trap-а, 2 минута је озрачиван помоћу UV зрака. Овако добијен раствор је коришћен као контролни узорак. pH вредност система је износила 3.9.

У случају оба кисеонична радикала мерена је амплитуда трећег ESR пика. ESR сигнал потиче од одговарајућег спинског производа који настаје у петоминутном периоду.

Наведени контролни системи су упоређивани са одговарајућим системима у које је још додата и 1 mM **5CQA**. Способност **5CQA** да елиминише слободне радикале процењивана је на основу разлике у релативним амплитудама ESR сигнала који су добијени са и без додатка **5CQA**. Антиоксидативна активност (AA) је израчуната као релативно смањење производње радикала:

$$AA = 100 \times (I_0 - I_a) / I_0 \quad (73)$$

У једначини (73) I_0 представља релативну висину одговарајућег ESR пика у спектру који садржи само контролни узорак, док I_a означава релативну висину истог ESR пика када се узорку дода и **5CQA**.

Теоријске методе

За оптимизацију геометрија коришћене су следеће теоријске методе: MP2, B2PLYP, B2PLYP-D3, B3LYP, B3LYP-D2, B3LYP-D3, M05-2X, M06, M06-2X, MN12-SX, M06-HF и TPSS. Већина метода се заснива на теорији функционала густине. Изузетак су MP2, B2PLYP и B2PLYP-D3, које спадају у *ab initio* методе, и могу да се посматрају као мешавина између чисте апроксимације генерализованог градијента (*Generalized Gradient Approximation*, GGA) и MP2.

MP2 метода¹²⁵ се заснива на Хартри-Фоковој (Hartre-Fock) методи која је коригована помоћу пертурбационе теорије другог реда. На тај начин се уводе ефекти који потичу од корелације електрона.

Хибридни функционали измене-корелације се конструишу као линеарна комбинација егзактног функционала измене, као што је дефинисано у оквиру Хартри-Фокове теорије, и функционала измене и корелације, као што је дефинисано у оквиру DFT теорије. Хибридна енергија измене-корелације може се представити једначином (74):

$$E_{XC}^{hibrid} = c_{HF} E_X^{HF} + c_{DFT} E_{XC}^{DFT} \quad (74)$$

где E_X^{HF} и E_{XC}^{DFT} одговарају нелокалној Хартри Фоковој енергији измене и локалној DFT енергији измене-корелације, док c_{HF} и c_{DFT} представљају константе. Широко примењивана B3LYP метода¹²⁶ комбинује Хартри-Фоков функционал измене, са E_X^{LDA} и E_X^{B88} функционалима измене, E_C^{LYP} и E_C^{VWN} функционалима корелације, као и E_{XC}^{LDA} функционалом измене-корелације.

Грим (Grimme) је увео B2PLYP методу,¹²⁷ код које се енергија измене-корелације, E_{XC} , представља следећим изразом:

$$E_{XC}^{B2PLYP} = E_{XC}^{B2LYP} + (1 - a_C) E_C^{MP2} \quad (75)$$

из кога се види да се енергија измене-корелације из B2PLYP функционала комбинује са MP2 корелационом енергијом скалираном помоћу $(1-a_c)$. a_c представља константу која се добија параметризацијом, где су коришћене топлоте образовања једињења из скупа G2/97.¹²⁸

Гримиови DFT-D (*Dispersion-corrected Density Functional Theory*) функционали садрже додатне чланове у изразу за укупну енергију, који служе за укључивање дисперзионе силе:

$$E_{\text{DFT-D}} = E_{\text{DFT}} + E_{\text{disp}} \quad (76)$$

Методе које садрже члан за корекцију дисперзије нису нове методе. Заправо, B3LYP-D2, B3LYP-D3, B2PLYP-D2 и B2PLYP-D3 представљају уобичајене методе које укључују и D2 или D3 чланове за корекцију дисперзије. Ови корекциони чланови су функције интератомских растојања. Параметри у овим функцијама су подешени у односу на енергије које се добијају приликом прорачуна са CCSD(T)/CBS моделом. У DFT-D2 функционалу корекције за енергију узимају у обзир интеракције између парова атома, док у DFT-D3 функционалу корекције узимају у обзир интеракције између три атома.^{129,130}

У теорији хибридних мета-GGA функционала хибридна енергија је описана следећом формулом:

$$E_{\text{XC}}^{\text{hybrid}} = \frac{X}{100} E_{\text{X}}^{\text{HF}} + \left(1 - \frac{X}{100}\right) E_{\text{X}}^{\text{DFT}} + E_{\text{C}}^{\text{DFT}} \quad (77)$$

где X представља проценат Хартри-Фокове измене у хибридном функционалу, док су $E_{\text{X}}^{\text{DFT}}$ и $E_{\text{C}}^{\text{DFT}}$ локалне DFT енергије измене и корелације. M05-2X, M06, M06-2X, и M06-HF су глобални хибридни функционали који садрже 52, 27, 54 и 100 % Хартри-Фокове измене.^{131,132} MN12-SX функционал садржи 25% Хартри-Фокове измене на малим растојањима између електрона, док на великим растојањима игнорише Хартри-Фокову измену.¹³³ Ова апроксимација је уведена како би се смањили комјутерски трошкови, а ипак задржале добре перформансе функционала при моделовању великог броја хемијских особина. TPSS је неемпиријски мета-GGA функционал измене-корелације.¹³⁴

Временски зависна теорија функционала густине

Временски зависна теорија функционала густине (TDDFT) проширује основне идеје теорије функционала густине основног стања (DFT) на испитивање ексцитација и општијег временски зависног феномена.¹³⁵ Основна променљива TDDFT теорије је густина електрона $\rho(r,t)$ која осим од положаја у простору, зависи и од времена.

Математички темељи TDDFT методе су постављени Рунг-Гросовом (Runge-Gross) теоремом, која представља временски зависну генерализацију Хоенберг-Конове (Hohenberg-Kohn) теореме. Систем од n електрона се покоравља временски зависној Шредингеровој (Schrödinger) једначини:

$$i \frac{\partial}{\partial t} \psi(\{r\}, t) = \hat{H}(\{r\}, t) \psi(\{r\}, t) \quad (78)$$

у којој је i имагинарна јединица, \hat{H} Хамилтонов оператор, а $\{r\} = \{r_1, \dots, r_n\}$ представља просторне координате n електрона. Ако знамо стање система у почетном тренутку t_0 , ова једначина нам омогућава да израчунамо таласну функцију ψ у било којем тренутку t .

Хамилтонијан се може написати у следећем облику:

$$\hat{H}(\{r\}, t) = \hat{T}(\{r\}) + \hat{W}(\{r\}, t) + \hat{V}_{\text{ext}}(\{r\}, t) \quad (79)$$

Први члан се односи на кинетичку енергију, а други на интеракцију између електрона. Трећи члан је временски зависни потенцијал који се може написати као сума потенцијала и може се искористити за описивање интеракција између електрона и језгара.

$$\hat{V}_{\text{ext}}(\{r\}, t) = \sum_{i=1}^n v_{\text{ext}}(r_i, t) \quad (80)$$

На основу познавања Рунг-Гросове теореме, може се конструисати временски зависна Кон-Шамова схема. Временски зависан Кон-Шамов систем је произвољан систем неинтерагујућих електрона подложен спољашњем локалном потенцијалу v_{KS} . Овај потенцијал, примењен на неинтерагујући систем, је јединствен и одабран, тако да је густина Кон-Шамових електрона једнака густини интерагујућег система. Кон-Шамови електрони покорављају се временски зависној Шредингеровој једначини:

$$i \frac{\partial}{\partial t} \varphi_i(r, t) = \hat{H}_{\text{KS}}(r, t) \varphi_i(r, t) \quad (81)$$

у којој је Кон-Шамов Хамилтонијан дефинисан као:

$$\hat{H}_{KS}(r, t) = -\frac{\nabla^2}{2} + v_{KS}[n](r, t) \quad (82)$$

Густина интерагујућег система се може израчунати из Кон-Шамових орбитала:

$$\rho(r, t) = \sum_i^n |\varphi_i(r, t)|^2 \quad (83)$$

Временски зависан Кон-Шамов потенцијал је, као и за основно стање, представљен као сума три члана:

$$v_{KS}[n](r, t) = v_{\text{ext}}(r, t) + v_{\text{Hartree}}[n](r, t) + v_{\text{XC}}[n](r, t) \quad (84)$$

Први члан се односи на спољашњи потенцијал. Други представља Хартријев потенцијал који узима у обзир класичну електростатичку интеракцију између електрона. Трећи члан је потенцијал измене-корелације, који укључује све нетривијалне вишеелектронске ефекте и има изузетно сложену (и у суштини непознату) функционалну зависност од густине. Очигледно је да квалитет израчунатих резултата зависи од квалитета примењене апроксимације за израчунавање потенцијала измене-корелације.

Коришћени програми

У овом докторату за генерисање и обраду података коришћени су следећи програми: Gaussian 09, Spartan'02, VEDA 4, NBO, Chemcraft 1.7, GaussView 5.0 и TheRate.¹³⁶⁻¹⁴²



ЗАКЉУЧАК

Детаљна конформациона анализа је показала да **5CQA** постоји као комплексна смеша различитих конформера, при чему је и у гасовитој фази и у раствору заступљеност конформера **1–14** (Слика 11) преко 99 %.⁶⁹ Заједничка особина свих ових конформера је да карбоксилни водоник Н8 није окренут ка карбоксилном кисеонику О7, већ ка кисеонику О1 из суседне хидроксилне групе. Наиме, изражено негативно наелектрисани атоми О1 и О3 граде јаке О8–Н8···О1 и О1–Н1···О3 водоничне везе које утичу на оријентацију хидроксилних група на хинском делу молекула. На тај начин четири водоничне везе граде О–Н···О ланце који стабилизују молекул. У гасовитој фази најстабилнији конформер поседује О4–Н4···О9' водоничну везу, док је структура у раствору окарактерисана О4–Н4···О10' водоничном везом. Најстабилнији конформери **5CQA** у гасовитој фази и у раствору су структуре **1** и **8** (Слике 11 и 12).^{71,72} Предложена структура **8** је у савршеној сагласности са структуром добијеном помоћу софистицираних NMR експеримената које су извели Форино и његови сарадници.⁷⁰

Експериментално добијени Raman-ски и NMR спектри **5CQA** су у сагласности са постојећим резултатима из литературе.^{70,75–77} Веома добро слагање између симулираних и експерименталних спектра је такође доказ да су атоми у молекулу **5CQA** правилно распоређени.^{69,71,72} Највећи узрок, који води ка одступању симулираних од експерименталних вредности за положаје трака у вибрационим спектрима, свакако је чињеница да се при прорачунима у обзир узима изоловани молекул. На тај начин се занемарују интермолекулске интеракције, које су од изузетне важности за реалан молекул у чврстом стању. Код појединих атома се израчунате вредности за хемијска померања значајно разликују од експерименталних. Објашњење оваквог одступања лежи у томе да је у молекулу **5CQA** омогућена ротација око једноструких веза. Најочигледнија неслагања се јављају на атомима С2' и С6' (ротација ароматичног прстена око С1'–С7' једноструке везе), као и на атому С8' (ротација око С8'–С9' једноструке везе). Изненађујуће добро слагање између експерименталног и симулираног ¹H-NMR спектра је последица ограничене флексибилности хинског дела услед присуства усмерених водоничних веза. NLMO кластери су омогућили информативан опис UV спектра молекула **5CQA**. Као што је и очекивано, UV траке потичу од $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ прелаза. Одлика свих електронских прелаза је мала просторна сепарација, док је енергетска сепарација пропорционална ексцитационој енергији.

Најстабилније конформације структурних изомера молекула **5CQA**, **3CQA** и **4CQA**, су такође утврђене детаљном конформационом анализом. И за ове структуре је карактеристично да је карбоксилни водоник окренут ка кисеонику суседне хидроксилне групе, а не ка карбоксилном кисеонику.⁷²

Из сваке од кафеоилхинских киселина могу да настану два радикала и два анјона. Услед боље делокализације спинске густине и негативног наелектрисања $x\text{CQA}4^{\bullet}$ радикали и $x\text{CQA}4'^{-}$ анјони су стабилнији од одговарајућих $x\text{CQA}3^{\bullet}$ радикала и $x\text{CQA}3'^{-}$ анјона. Идентична ситуација је уочена и код молекула **СА**. Особине хидроксициметног дела у одговарајућим радикалима, анјонима и радикал катјонима добијеним из све четири киселине су веома сличне и практично не зависе од положаја естерификације. Хински део остаје непромењен у свим новонасталим реактивним врстама. Последица тога је да све четири фенолне киселине имају сличне вредности термодинамичких параметара: BDE, PA, ETE, IP и PDE.⁷¹ Из свега наведеног се може закључити да **СА** и кафеоилхинске киселине испољавају веома сличну антиоксидативну активност. Добијени резултат је у сагласности са резултатима добијеним помоћу различитих експерименталних тестова.¹⁰³

За потребе одређивања термодинамичких параметара систематично је испитана и енталпија солватисаног протона и електрона у двадесет најчешће коришћених растварача различите поларности помоћу једанаест теоријских модела.⁹⁹ На основу добијених вредности термодинамичких параметара откривено је да ни једна од испитиваних фенолних киселина не подлеже SET-PT механизму. Може се претпоставити да је у неполарним растварачима НАТ главни реакциони пут, док су у поларним растварачима НАТ и SPLET компетитивни механизми.⁷¹

ESR експерименти су показали да је **5CQA** селективна према DPPH[•], HO[•] и HOO[•]/O₂^{-•} радикалима.¹⁰⁸ Узимајући у обзир да су ESR експерименти извођени у киселој средини, термодинамичка испитивања искључују могућност да било који од испитиваних радикала подлеже SPLET и SET-PT механизмима. Откривено је да у воденом раствору ни један механизам није погодан за реакцију између **5CQA** и O₂^{-•}, што води ка закључку да је у киселој средини HOO[•] одговоран за понашање HOO[•]/O₂^{-•} смеше. НАТ и RAF су повољни реакциони механизми у случају реакција **5CQA** са HOO[•] и HO[•], док је у случају DPPH[•] радикала једини очекивани механизам НАТ.¹⁰⁸

Применом QM-ORSA рачунарске методологије добијено је да **5CQA** и **Tx** са HO[•] радикалом реагују преко НАТ и RAF механизма, док је у случају CH₃OO[•]

радикала НАТ једини могући реакциони пут у неполарним растварачима.¹¹¹ **5CQA** је реактивнија према HO^\bullet , док је према $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ мање реактивна од **Tx**.

Антиоксидативни механизми **5CQA** и **Tx** у поларној базној средини су знатно комплекснији.¹¹⁹ На $\text{pH} = 7.4$ **5CQA** постоји у облику моноанјона (87 %) и дианјона (13 %), док се **Tx** доминантно налази у облику моноанјона (> 99 %).

У реакцији са HO^\bullet радикалом 5CQA^- подлеже НАТ и RAF механизмима. У базној средини је омогућен губитак протона, што води ка настанку 5CQA^{2-} . 5CQA^{2-} даље спонтано предаје електрон HO^\bullet радикалу. Хидроксидни анјон преузима протон од насталог $\text{5CQA}^{\bullet-}$. Три везане реакције одговарају SPLET и SET-PT механизмима. Откриће да при физиолошким условима **5CQA** у присуству HO^\bullet радикала подлеже SET-PT механизму је веома интригантно, јер је познато да се SET-PT механизам одиграва веома ретко. Даље, у реакцији $\text{5CQA}^{\bullet-}$ са HO^\bullet добијају се хинон анјон и вода, као и $[\text{5CQA-OH}]^-$, преко НАТ и RAF реакционих путева. У ова два случаја је испитиван феномен – реактивност у два спинска стања, који имплицира да се трансформација триплетних реактаната у синглетне производе догађа на две површине потенцијалне енергије. Наиме, раздвојени реактанти постоје у облику дублета. Како прилазе један другом, пролазе кроз тачку у којој долази до инверзије спина, при чему учесници реакције спонтано прелазе у значајно стабилније синглетне производе. Све реакције дианјона су контролисане дифузијом. Из овог разлога је његов допринос у хватању HO^\bullet подједнако важан као и допринос заступљенијег моноанјона.¹¹⁹ Израчуната k_{overall} вредност износи $4.83 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и у савршеној је сагласности са експерименталном вредношћу од $3.34 \pm 0.19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹²⁴

5CQA^- са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ радикалом реагује искључиво преко НАТ механизма и реакција је значајно спорија од оне са HO^\bullet . НАТ реакција између 5CQA^{2-} са $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ је изузетно спора, тако да се може закључити да при физиолошким условима овај реакциони пут не доприноси антиоксидативним особинама **5CQA**.¹¹⁹

Упркос израженим разликама везаним за оперативне реакционе путеве, као и за њихове константе брзина, редослед реактивности **5CQA** према изабраним радикалима је исти у поларној и неполарној средини.^{111,119}

A white ceramic cup filled with dark coffee sits on a matching saucer. The cup is positioned in the upper left quadrant. To the left and bottom of the cup, a thick layer of dark brown coffee beans is piled up. The background is a light beige color with a repeating pattern of coffee beans, each outlined in a thin, light brown line. The word "ЛИТЕРАТУРА" is centered in the middle of the page in a bold, dark brown, serif font.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. M. Đukić, *Oksidativni stres*, Mono i Manjana, Beograd, 2008.
2. Y. Z. Fang, S. Yang, G. Wu, *Nutrition* 18 (2002) 872.
3. M. A. El-Missiry, *Antioxidant Enzyme*, InTech, Rijeka, 2012.
4. T. P. A. Devasagayam, K. K. Bloor, T. Ramsarma, *Indian. J. Biochem. Biophys.* 40 (2003) 300.
5. T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Bloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi, R. D. Lele, *J A P I* 52 (2004) 794.
6. B. Halliwell, *Free Rad. Res. Comm.* 9 (1990) 32.
7. B. D. Craft, A. L. Kerrihard, R. Amarowicz, R. B. Pegg, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11 (2012) 148.
8. A. Scalbert, G. Williamson, *J. Nutr.* 130 (2000) 2073S.
9. E. A. Decker, K. Warner, M. P. Richards, F. Shahidi, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4303.
10. J. S. Wright, E. R. Johnson, G. A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1173.
11. M. D'Archivio, C. Filesi, R. D. Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, R. Masella, *Ann. Ist. Super Sanità* 43 (2007) 348.
12. F. Shahidi, Y. Zhong, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 3499.
13. L. V. B. Hoelz, B. A. C. Horta, J. Q. Araújo, M. G. Albuquerque, R. B. de Alencastro, J. F. M. da Silva, *J. Chem. Pharm. Res.* 2 (2010) 291.
14. D. O. Kim, C. Y. Lee, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (2004) 253.
15. E. J. Lien, S. Ren, H. H. Bui, R. Wang, *Free Radic. Bio. Med.* 26 (1999) 285.
16. F. Shahidi, M. Nacsik, *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application*, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 1995.
17. T. B. T. Lam, K. Kadoya, K. Iiyama, *Phytochemistry* 57 (2001) 987.
18. J. A. Maga, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 10 (1978) 323.
19. F. A. Tomás-Barberán, J. C. Espín, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 853.
20. H. Kasai, Z. Fukada, S. Yamaizumi, S. Sugie, H. Mori, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 467.
21. M. Ohnishi, H. Morishita, H. Iwahashi, S. Toda, Y. Shirataki, M. Kimura, R. Kido, *Phytochemistry* 36 (1994) 579.
22. R. Upadhyay, L. J. M. Rao, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (2013) 968.
23. N. Nakatani, S. Kayano, H. Kikuzaki, K. Sumino, K. Katagiri, T. Mitani, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5512.
24. M. N. Clifford, *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 362.

25. M. N. Clifford, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1033.
26. A. Farah, M. Monteiro, C. M. Donangelo, S. Lafay, *J. Nutr.* 138 (2008) 2309.
27. P. Mazzafera, *Food Chem.* 60 (1997) 67.
28. G. Budryn, E. Nebesny, *Bromat. Chem. Toksykol.* 39 (2006) 103.
29. W. Zheng, M. N. Clifford, *Food Chem.* 106 (2008) 147.
30. N. Fang, S. Yu, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3579.
31. Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara, K. Iseki, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 136.
32. H. Hotta, S. Nagano, M. Ueda, Y. Ysujino, J. Koyama, T. Osaki, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 123.
33. J. Huang, T. Li, Z. Chen, X. Liu, S. Liu, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1198.
34. H. Shi, L. Dong, J. Jiang, J. Zhao, G. Zhao, X. Dang, X. Lu, M. Jia, *Toxicology* 303 (2013) 107.
35. S. Meng, J. Cao, Q. Feng, J. Peng, Y. Hu, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013 (2013) 801457.
36. R. Domitrović, O. Cvijanović, V. Šušnić, N. Katalinić, *Toxicol.* 324 (2014) 98.
37. J. F. Moran, R. B. Klucas, R. J. Grayer, J. Abian, M. Becana, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 861.
38. T. Tsuchiya, O. Suzuki, K. Igarashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (1996) 765.
39. M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, M. N. C. P. Buijsman, J. M. M. van Amelsvoort, M. B. Katan, *J. Nutr.* 133 (2003) 1806.
40. A. R. Rechner, J. P. E. Spencer, G. Kuhnle, U. Hann, C. A. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1213.
41. I. A. Ludwig, M. Paz de Pena, C. Cid, A. Crozier, *BioFactors* 39 (2013) 623.
42. G. Williamson, M. N. Clifford, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) S48.
43. J. Camarasa, E. Escubedo, T. Adzet, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6 (1988) 503.
44. L. Cao, H. Yu, S. Shao, S. Wang, Y. Guo, *Anal. Methods* 6 (2014) 7149.
45. G. Litwinienko, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 222.
46. G. Litwinienko, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 3433.
47. D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, *J. Agric. Food. Chem.* 53 (2005) 1841.
48. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food. Chem.* 53 (2005) 4290.
49. M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst* 127 (2002) 183.
50. A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Adv.* 1 (2011) 1778.

51. E. N. Frankel, A. S. Meyer, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1925.
52. A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.* 34 (2013) 2430.
53. A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.* 35 (2013) 2019.
54. A. Fernàndez-Ramos, J. A. Miller, S. J. Klippenstein, D. G. Truhlar, *Chem. Rev.* 106 (2006) 4518.
55. E. Pollak, P. J. Pechukas, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2984.
56. C. Eckart, *Phys. Rev.* 35 (1930) 1303.
57. R. A. Marcus, *Rev. Mod. Phys.* 65 (1993) 599.
58. J. R. Miller, L. T. Calcaterra, G. L. Closs, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3047.
59. A. Martínez, E. Hernández-Martin, A. Galano, *Food Funct.* 3 (2012) 442.
60. S. F. Nelsen, S. C. Blackstock, Y. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 677.
61. S. F. Nelsen, M. N. Weaver, Y. Luo, J. R. Pladziewicz, L. K. Ausman, T. L. Jentsch, J. J. O’Konek, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 11665.
62. Д. Миленковић, Ј. Тошовић, С. Марковић, З. Марковић, *Хемијски преглед* 57 (2016) 92.
63. F. C. Collins, G. E. Kimball, *J. Colloid Sci.* 4 (1949) 425.
64. M. Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.* 92 (1917) 129.
65. D. G. Truhlar, *J. Chem. Educ.* 62 (1985) 104.
66. G. G. Stokes, *Mathematical and Physical Papers*, Cambridge University Press, Cambridge, 1901.
67. A. Einstein, *Ann. Phys. (Leipzig)* 17 (1905) 549.
68. A. Galano, H. R. Alvarez Idaboy, *Int. J. Quantum Chem.* (2018) e25665.
69. S. Marković, J. Tošović, J. M. Dimitrić Marković, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 164 (2016) 67.
70. M. Forino, G. C. Tenore, L. Tartaglione, C. Dell’Aversano, N. Novellino, P. Ciminiello, *Food Chem.* 178 (2015) 306.
71. S. Marković, J. Tošović, *Food Chem.* 210 (2016) 585.
72. J. Tošović, S. Marković, *Croat. Chem. Acta.* 89 (2016) 535.
73. S. García-Granda, G. Beurskens, P. T. Beurskens, T. S. R. Krishna, *Acta Cryst. C: Crystal Struct. Comm.* C43 (1987) 683.
74. J. P. Cornard, C. Lapouge, L. Dangleterre, C. Allet-Bodelot, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 12475.
75. P. J. Eravuchira, R. M. El-Abassy, S. Deshpande, M. F. Matei, S. Mishra, P. Tandon, N. Kuhnert, A. Materny, *Vib. Spectrosc.* 61 (2012) 10.

76. G. F. Pauli, U. Kuczowski, A. Nahrstedt, *Magn. Reson. Chem.* 37 (1999) 827.
77. U. H. Jin, J. Y. Lee, S. K. Kang, J. K. Kim, W. H. Park, J. G. Kim, S. K. Moon, C. H. Kim, *Life Sci.* 77 (2005) 2760.
78. S. Marković, J. Tošović, *J. Phys. Chem. A* 119 (2015) 9352.
79. J. Tošović, S. Marković, *Chem. Pap.* 71 (2017) 543.
80. J. E. Bartmess, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 6420.
81. J. J. Fifen, Z. Dhaouadi, M. Nsangou, *J. Phys. Chem. A* 118 (2014) 11090.
82. J. J. Fifen, *J. Chem. Theor. Comp.* 9 (2013) 3165.
83. H. F. Halliwell, S. C. Nyburg, *Trans. Faraday. Soc.* 59 (1963) 1126.
84. B. E. Conway, *Modern Aspects of Electrochemistry*, Butterworth, London, 1964.
85. Y. Marcus, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 83 (1987) 339.
86. A. A. Rashin, K. Namboodiri, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6003.
87. P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
88. J. O. Bockris, A. K. N. Reddy, *Modern Electrochemistry*, Plenum, New York, 1998.
89. M. D. Tissandier, K. A. Cowen, W. Y. Feng, E. Gundlach, M. H. Cohen, A. D. Earhart, J. V. Coe, T. R. Tuttle Jr., *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 7787.
90. J. A. Mejías, S. Lago, *J. Chem. Phys.* 113 (2000) 7306.
91. J. V. Coe, *Int. Rev. Phys. Chem.* 20 (2001) 33.
92. C. P. Kelly, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16066.
93. P. Han, D. M. Bartels, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 7294.
94. H. A. Schwarz, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 6697.
95. H. Shiraishi, G. R. Sunaryo, K. J. Ishigure, *Phys. Chem.* 98 (1994) 5164.
96. J. J. Fifen, M. Nsangou, Z. Dhaouadi, O. Motopon, N. Jaidane, *Comp. Theor. Chem.* 966 (2011) 232.
97. L. Rottmannová, P. Škorňa, J. Rimarčík, V. Lukeš, E. Klein, *Acta Chim. Slovaca* 6 (2013) 60.
98. P. Škorňa, J. Rimarčík, E. Klein, *Acta Chim. Slovaca* 7 (2014) 31.
99. Z. Marković, J. Tošović, D. Milenković, S. Marković, *Comp. Theor. Chem.* 1077 (2016) 11.
100. J. J. Fifen, M. Nsangou, Z. Dhaouadi, O. Motopon, N. Jaidane, *J. Chem. Theor. Comp.* 9 (2013) 1173.
101. M. N. Clifford, W. Wu, J. Kirkpatrick, N. Kuhnert, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 929.

102. W. Mullen, B. Nemzer, B. Ou, A. Stalmach, J. Hunter, M. N. Clifford, E. Combet, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 3754.
103. J. G. Xu, Q. P. Hu, Y. Liu, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 11625.
104. A. Perez-Gonzalez, J. R. Alvarez-Idaboy, A. Galano, *J. Mol. Model.* 21 (2015) 213.
105. M. Leopoldini, S. G. Chiodo, N. Russo, M. Toscano, *J. Chem. Theor. Comp.* 7 (2011) 4218.
106. M. J. González Moa, M. Mandado, R. A. Mosquera, *Chem. Phys. Lett.* 424 (2006) 17.
107. Y. Chen, H. Xiao, J. Zheng, G. Liang, *PLoS ONE* 10 (2015) 1.
108. J. Tošović, S. Marković, J. M. Dimitrić Marković, M. Mojović, D. Milenković, *Food Chem.* 237 (2017) 390.
109. Lj. Stanojević, M. Stanković, V. Nikolić, Lj. Nikolić, D. Ristić, J. Čanadanović-Brunet, V. Tumbas, *Sensors* 9 (2009) 5702.
110. J. M. Dimitrić Marković, Z. Marković, I. A. Pašti, T. P. Brdarić, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, *Dalton T.* 41 (2012) 7295.
111. J. Tošović, S. Marković, *Theor. Chem. Acc.* 137 (2018) 76.
112. C. Iuga, J. R. Alvarez-Idaboy, N. Russo, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 3868.
113. M. E. Medina, C. Iuga, J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Adv.* 4 (2014) 52920.
114. M. E. Alberto, N. Russo, A. Grand, A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 4642.
115. M. E. Medina, C. Iuga, J. R. Álvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 13137.
116. T. Marino, N. Russo, A. Galano, *Comput. Theor. Chem.* 1077 (2016) 13.
117. M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, *J. Nutr.* 131 (2001) 66.
118. T. Kiss, G. Nagy, M. Pécsi, H. Kozłowski, G. Micera, L. S. Erre, *Polyhedron* 8 (1989) 2345.
119. J. Tošović, S. Marković, *Food Chem.* (2018) *Прихваћен за штампање*
120. S. Sason, D. David, F. Andreas, S. Detlef, S. Helmut, *Helv. Chim. Acta* 78 (1995) 1393.
121. D. Schröder, S. Shaik, H. Schwarz, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 139.
122. N. Kaur, I. Kumari, S. Gupta, N. Goel, *J. Phys. Chem. A* 120 (2016) 9588.
123. Y. Kono, K. Kobayashi, S. Tagawa, K. Adachi, A. Ueda, Y. Sawa, H. Shibata, *Biochim. Biophys. Acta* 1335 (1997) 335.

124. S. K. Jackson, K. Liu, M. Liu, G. S. Timmins, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 228.
125. M. Head-Gordon, J. A. Pople, M. J. Frisch, *Chem. Phys. Lett.* 153 (1998) 503.
126. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
127. S. Grimme, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 034108-1.
128. L. A. Curtiss, K. Raghavachari, P. C. Redfern, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* 112 (2000) 7374.
129. S. Grimme, *J. Comp. Chem.* 27 (2006) 1787.
130. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 154104-1.
131. Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* 2 (2006) 364.
132. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Acc. Chem Res.* 41 (2008) 157.
133. R. Peverati, D. G. Truhlar, *Phil. Trans. R. Soc. A* 372 (2013) 20120476.
134. J. M. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, *Phys. Rev. Lett.* 91 (2003) 146401-1.
135. M. A. L. Marques, E. K. U. Gross, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 55 (2004) 427.
136. *Gaussian 09*, Revision D.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2013.
137. *Spartan'02*, B. J. Deppmeier, A. J. Driessen, T. S. Hehre, W. J. Hehre, J. A. Johnson, P. E. Klunzinger, J. M. Leonard, I. N. Pham, W. J. Pietro, J. Yu, Wavefunction, Inc., Irvine CA, 2002.
138. Jamróz M H (2004) Vibrational energy distribution analysis, VEDA 4, Warsaw
139. F. Weinhold, C. R. Landis, *Discovering Chemistry with Natural Bond Orbitals*,

John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2012.

140. *Chemcraft 1.7*, G. A. Zhurko, D. A. Zhurko, 2013. Available from:
<http://www.chemcraftprog.com>
141. *GaussView*, Version 5.0, R. D. Dennington II, T. A. Keith, J. M. Millam, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2008.
142. W. T. Duncan, R. L. Bell, T. N. Truong, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1039.

Извори слика преузетих са интернета:

i https://zh.pngtree.com/freebackground/cup-coffee-caffeine-drink-background_475489.html



Јелена Тошовић је рођена 27.3.1990. године у Крагујевцу. Основну школу „Милутин и Драгиња Тодоровић”, као и средњу, Прву крагујевачку гимназију, завршила је у Крагујевцу као носилац дипломе Вук Караџић. На Природно-математички факултет, студијски програм Хемија, модул Хемијар за истраживање и развој, уписала се школске 2009/2010. године. Основне академске студије завршила је 9.10.2013. године са просечном оценом 9.89, а дипломске академске студије – мастер, завршила је 6.10.2014. године са просечном оценом 10. У октобру 2014. године, уписала је докторске академске студије, студијски програм Хемија, модул Органска хемија, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Одлуком Наставно-научног већа од 8.4.2015. године изабрана је у звање асистент за ужу научну област Физичка хемија на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, на коме ради и данас. Предмети на којима је ангажована су Физичка хемија 1, Физичка хемија 2, Молекулско моделирање 1, Молекулско моделирање 2 и Рачунари у хемији 1.

За време основних академских студија ишла је месец дана на усавршавање у Велику Британију на Универзитет у Гриничу као учесник ТЕМПУС пројекта. Више пута је награђивана као најбољи студент на години (у школској 2009/10, 2010/11. и 2011/12.). Добитница је стипендије Фонда за младе таленте Републике Србије за 1000 најбољих студената завршних година основних академских студија за школску 2012/2103. годину, као и за 400 најбољих студената завршних година мастер академских студија за школску 2013/2014. годину. Исто тако, добитница је стипендије за најбоље студенте у 2013. години коју додељује Универзитет у Крагујевцу. Добитница је и Специјалног признања за изузетан успех у току студија за 2014. годину коју додељује Српско хемијско друштво. Добитница је и награде Фонда Костић за 2015. годину. Такође, награда за најбољи рад на конференцији 15th International Conference on BioInformatics and BioEngineering (VIBE) у Београду додељена јој је 2015. године.

Тренутно се бави научно-истраживачким радом у области Физичке органске хемије, и то теоријским и експерименталним испитивањем различитих физичко-хемијских особина и реакција неких природних полифенола, првенствено фенолних киселина. До сада је објавила двадесет и два рада у научним часописима, од којих је шеснаест са SCI листе, и десет радова саопштених на конференцијама.

Учесник је пројекта „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала” (евиденциони број ОИ172016) Министарства науке, просвете и технолошког развоја (2015–). Такође, била је и учесник билатералног пројекта Србија-Хрватска „Испитивање хемизма и антиоксидативне активности комплекса полифенолних једињења са есенцијалним металима“ (2016–2017).

До сада је два пута била на истраживачким боравцима у иностранству због даљег усавршавања. У склопу билатералног пројекта Србија-Хрватска боравила је две недеље на Универзитету у Загребу у групи професора Владислава Томишића, док је у Великој Британији на Универзитету у Гриничу у групи др Милана Антонијевића провела пет недеља.

СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА ОБЈАВЉЕНИХ У МЕЂУНАРОДНИМ ЧАСОПИСИМА

1. J. Tošović, S. Marković, Antioxidative activity of chlorogenic acid relative to trolox in aqueous solution – DFT study, *Food Chem.* (2018) *Прихваћен за штампање*
M21a
IF₂₀₁₇ = 4.946 (Chemistry, Applied, 5/71)
ISSN: 0308-8146,
DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.070
2. **J. Tošović**, S. Marković, Reactivity of chlorogenic acid towards hydroxyl and methyl peroxy radicals relative to trolox in nonpolar media, *Theor. Chem. Acc.* 137 (2018) 76.
M23
IF₂₀₁₇ = 1.545 (Chemistry, Physical, 106/146)
ISSN: 1432-881X
DOI: 10.1007/s00214-018-2251-y
3. A. Burmudžija, S. Marković, J. Muškinja, A. Pejović, **J. Tošović**, Influence of counterion on methylation of some ambident nucleophiles. DFT study, *React. Kinet. Mech. Cat.* 123(1) (2018) 201-214.
M23
IF₂₀₁₇ = 1.515 (Chemistry, Physical, 107/146)
ISSN: 1878-5190,
DOI: 10.1007/s11144-017-1263-2
4. **J. Tošović**, S. Marković, J. M. Dimitrić Marković, M. Mojović, D. Milenković, Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid, *Food Chem.* 237 (2017) 390–398.
M21a
IF₂₀₁₇ = 4.946 (Chemistry, Applied, 5/71)
ISSN: 0308-8146,
DOI:10.1016/j.foodchem.2017.05.080

5. **J. Tošović**, S. Marković, Reproduction and interpretation of the UV-vis spectra of some flavonoids, *Chem. Pap.*, 71 (2017) 543–552.
M23
IF₂₀₁₇ = 0.963 (Chemistry, Multidisciplinary, 131/171)
ISSN: 0366–6352
DOI: 10.1007/s11696-016-0002-x
6. **J. Tošović**, S. Marković, Structural and antioxidative features of chlorogenic acid, *Croat. Chem. Acta*, 89 (2016) 535-541.
M23
IF₂₀₁₆ = 0.586 (Chemistry, Multidisciplinary, 144/166)
ISSN: 0011–1643,
DOI: 10.5562/cca3026
7. S. Marković, **J. Tošović**, Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids, *Food Chem.*, 210 (2016) 585–592.
M21a
IF₂₀₁₆ = 4.529 (Chemistry, Applied, 6/72)
ISSN: 0308-8146,
DOI:10.1016/j.foodchem.2016.05.019
8. S. Marković, **J. Tošović**, J. M. Dimitrić Marković, Synergic application of spectroscopic and theoretical methods to the chlorogenic acid structure elucidation, *Spectrochim. Acta A* 164 (2016) 67–75.
M21
IF₂₀₁₆ = 2.536 (Spectroscopy, 12/42)
ISSN: 1386-1425
DOI:10.1016/j.saa.2016.03.044
9. Z. Marković, **J. Tošović**, D. Milenković, S. Marković, Revisiting the solvation enthalpies and free energies of the proton and electron in various solvents, *Comput. Theor. Chem.*, 1077 (2016) 11–17.
M23
IF₂₀₁₆ = 1.549 (Chemistry, Physical, 101/146)
ISSN: 2210-271X
DOI:10.1016/j.comptc.2015.09.007
10. S. Marković, J. Tošović, Application of Time-Dependent Density Functional and Natural Bond Orbital Theories to the UV–vis Absorption Spectra of Some Phenolic Compounds, *J. Phys. Chem. A*, 119 (2015) 9352–9362.
M22
IF₂₀₁₅ = 2.883 (Chemistry, Physical, 55/144)
ISSN: 1089-5639
DOI: 10.1021/acs.jpca.5b05129
11. S. Marković, Lj. Mitrović, J. Đurđević, **J. Tošović**, Z. Petrović, Alkylation of potassium ethyl acetoacetate: HSAB versus Marcus theory, *Comput. Theor. Chem.*, 1066 (2015) 14–19.
M23
IF₂₀₁₅ = 1.403 (Chemistry, Physical, 104/144)
ISSN: 2210-271X
DOI:10.1016/j.comptc.2015.05.005

12. S. Radenković, **J. Tošović**, J. Đurđević Nikolić, Local aromaticity in naphtho-annelated fluoranthenes: Can the five-membered rings be more aromatic than the six-membered rings?, *J. Phys. Chem. A*, 19 (2015) 4972–4982.

M22

IF₂₀₁₅ = 2.883 (Chemistry, Physical, 55/144)

ISSN: 1089-5639

DOI: 10.1021/acs.jpca.5b01817

13. S. Radenković, **J. Tošović**, R. W. A. Havenith, P. Bultinck, Ring currents in benzo- and benzocyclobutadieno-annelated biphenylene derivatives, *Chem. Phys. Chem.* 16 (2015) 216–222.

M22

IF₂₀₁₅ = 3.138 (Chemistry, Physical, 50/144)

ISSN: 1439-4235

DOI: 10.1002/cphc.201402468

14. M. D. Antonijević, M. Arsović, J. Časlavský, V. Cvetković, P. Dabić, M. Franko, G. Ilić, M. Ivanović, N. Ivanović, M. Kosovac, D. Medić, S. Najdanović, M. Nikolić, J. Novaković, T. Radovanović, Đ. Ranić, B. Šajatović, G. Špijunović, I. Stankov, **J. Tošović**, P. Trebše, O. Vasiljević, J. Schwarzbauer, Actual contamination of the Danube and Sava Rivers at Belgrade (2013), *J. Serb. Chem. Soc.* 79 (2014) 1169–1184.

M23

IF₂₀₁₄ = 0.871 (Chemistry, Multidisciplinary, 114/157)

ISSN: 0352-5139

DOI: 10.2298/JSC131105014A

15. I. Gutman, B. Furtula, **J. Tošović**, M. Essalih, M. El Marraki, On terminal Wiener indices of kenograms and plerograms, *Iranian J. Math. Chem.*, 4 (2013), 77–89.

Нема IF

ISSN: 2228-6489

16. I. Gutman, **J. Tošović**, Testing the quality of molecular structure descriptors. Vertex–degree-based topological indices, *J. Serb. Chem. Soc.* 78 (2013) 805–810.

M23

IF₂₀₁₃ = 0.889 (Chemistry, Multidisciplinary, 105/148)

ISSN: 0352-5139

DOI: 10.2298/JSC121002134G

17. I. Gutman, **J. Tošović**, S. Radenković, S. Marković, On atom-bond connectivity index and its chemical applicability, *Indian J. Chem.* 51A (2012) 690–694.

M23

IF₂₀₁₂ = 0.787 (Chemistry, Multidisciplinary, 110/152)

ISSN: 0376-4710

Нема DOI

СПИСАК РАДОВА ОБЈАВЉЕНИХ У ДОМАЋИМ ЧАСОПИСИМА

1. I. Redžepović, S. Marković, **J. Tošović**, Antioxidative activity of caffeic acid – mechanistic DFT study, *Kragujevac J. Sci.* (2017) 109-122.
M51
ISSN: 1450 – 9636
UDC: 541.127:547.587.52
DOI: 10.5937/KgJSci1739109R
2. **J. Tošović**, Spectroscopic features of caffeic acid: Theoretical study, *Kragujevac J. Sci.*, (2017) 99-108.
M51
ISSN: 1450 – 9636
UDC: 541.18.02:543.5:547.587.52
DOI: 10.5937/KgJSci1739099T
3. И. Гутман, **J. Тошовић**, Други закон термодинамике и покушаји да се он изврда, *Хемијски преглед*, 57 (2016) 155–159.
M53
ISSN: 04406826
UDC: 54.011.93
4. **J. Тошовић**, И. Гутман, Вештачке молекулске машине, *Хемијски преглед*, 57 (2016) 142–148.
M53
ISSN: 04406826
UDC: 54.011.93
5. **J. Tošović**, S. Marković, D. Milenković, Z. Marković, Solvation enthalpies and Gibbs energies of the proton and electron – influence of solvation models, *J. Serb. Soc. Comp. Mech.*, 2 (2016) 66–76.
M53
ISSN: 1820-6530
UDC: 539.125.4:66.093.1, 539.124:66.093.1
6. Д. Миленковић, **J. Тошовић**, С. Марковић, З. Марковић, Реакције прелаза електрона: Маркусова теорија, *Хемијски преглед*, 57 (2016) 92–97.
M53
ISSN: 04406826

САОПШТЕЊА

1. **J. Tošović**, S. Marković, Reactivity of chlorogenic acid toward hydroxyl radical relative to Trolox in benzene, *14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Beograd, Srbija (2018) p. 125-128.
ISBN: 978-86-82475-36-1
2. **J. Tošović**, S. Marković, Behavior of chlorogenic acid dianion towards free radicals in water solution, *The 30th International Course and Conference on the Interfaces among Mathematics, Chemistry and Computer Sciences (Math/Chem/Comp, MC²-30)*, Dubrovnik, Croatia (2018) p. 18.

Нема ISBN број

3. **J. Tošović**, S. Marković, Determination of chlorogenic acid structure using combined experimental and theoretical NMR study, *AdriaticNMR*, Croatia (2018) p. 38.

ISBN: 978-953-6076-42-0

4. I. Redžepović, S. Marković, **J. Tošović**, Theoretical investigation of antioxidative activity of caffeic acid, *4th South-East European Conference on Computational Mechanics (SECCM)*, Kragujevac, Srbija (2017) p. 24.

ISBN: 978-86-921243-0-3

5. **J. Tošović**, S. Marković, D. Milenković, Antioxidative activity of chlorogenic acid: DFT study, *The 29th International Course and Conference on the Interfaces among Mathematics, Chemistry and Computer Sciences (Math/Chem/Comp, MC²-29)*, Dubrovnik, Croatia (2017) p. 8.

Нема ISBN број

6. S. Marković, **J. Tošović**, Hydrogen atom transfer mechanism in chlorogenic acid, *13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Beograd, Srbija (2016) p. 67-70.

ISBN: 978-86-82475-34-7

7. **J. Tošović**, S. Marković, J.M. Dimitrić Marković, Structural and antioxidative features of chlorogenic acid, *The 28th International Course and Conference on the Interfaces among Mathematics, Chemistry and Computer Sciences (Math/Chem/Comp, MC²-28)*, Dubrovnik, Croatia (2016) p. 28.

Нема ISBN број

8. **J. Tošović**, S. Marković, J. M. Dimitrić Marković, Struktura hlorogenske kiseline: spektroskopski i kvantno-mehanički pristup/ The structure of chlorogenic acid: spectroscopic and quantum mechanical approach, *XXI Symposium on biotechnology with international participation*, Čačak, Srbija (2016) p. 809- 814.

ISBN: 978-86-87611-41-2

ISBN: 978-86-87611-42-9 (niz)

9. **J. Tošović**, Ž. Milošević, S. Marković, Simulation of the UV-Vis Spectra of Flavonoids, *15th International Conference on BioInformatics and BioEngineering (BIBE)*, Beograd, Srbija (2015) p. 1-6.

DOI: 10.1109/BIBE.2015.7367646

ISBN: 978-1-4673-7982-3

10. **J. Tošović**, S. Marković, Mehanizmi antioksidativne aktivnosti hlorogenske kiseline: termodinamički pristup/Antioxidative mechanisms of chlorogenic acid: a thermodynamic approach, *Treća konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija (2015) p. 94.

ISBN: 978-86-7132-059-7

ЛИТЕРАТУРА

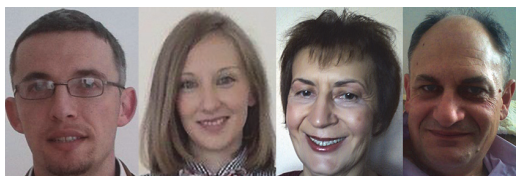
1. López-Muñoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2005; 1(4): 329–43.
2. Chen Y, Goldstein JA. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr Drug Metab*. 2009; 10(6): 567–78.
3. Timbrell JA. Principles of biochemical toxicology. 4th Ed. New York: Informa Healthcare; 2009.
4. http://www.auburn.edu/~deruija/GABA_Barbiturates2002.pdf
5. Majdan M, Mauritz W, Wilbacher I, Brazinova A, Rusnak M, Leitgeb J. Barbiturates use and its effects in patients with severe traumatic brain injury in five European countries. *J Neurotrauma*. 2013; 30(1):23–9.
6. Roberts DM, Buckley NA. Enhanced elimination in acute barbiturate poisoning - a systematic review. *Clin Toxicol (Phila)*. 2011; 49(1):2–12.
7. Ford MD, Delaney KA, Ling LJ, Ericson T. *Clinical Toxicology*. 1st Ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2001.
8. Gary NE, Tresznewsky O. Clinical aspects of drug intoxication: barbiturates and a potpourri of other sedatives, hypnotics, and tranquilizers. *Heart Lung*. 1983; 12(2):122–7.
9. Hadden J, Johnson K, Smith S, Price L, Giardina E. Acute barbiturate intoxication: Concepts of management. *JAMA*. 1969; 209(6):893–900.
10. Katzung BG. Sedative-hypnotics. In: *Basic and Clinical Pharmacology*. 6th Ed. Appleton & Lange; 1995.

Abstract

THE BARBITURATES

Jovana S. MARKOVIĆ, Bachelor of Science in Biochemistry

A long time barbiturates were used as major sedatives and tranquilizers, until they were discovered as main causes of addiction. Many celebrities have died due to an overdose of barbiturates, as expected consequence of their action on the molecular level. Today barbiturates are no longer in medical use, they are replaced with a lesser evil, benzodiazepines. However, instead of remaining in the past, an increase in the abuse of barbiturates by teenagers was recently reported.



ДЕЈАН МИЛЕНКОВИЋ, Истраживачко-развојни центар за биоинжењеринг БиоИРЦ доо, Крагујевац, ЈЕЛЕНА ТОШОВИЋ, СВЕТЛАНА МАРКОВИЋ, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ЗОРАН МАРКОВИЋ, Државни универзитет у Новом Пазару (e-mail: deki82@kg.ac.rs, jelena.tosovic@kg.ac.rs, mark@kg.ac.rs, zmarkovic@np.ac.rs)

РЕАКЦИЈЕ ПРЕЛАЗА ЕЛЕКТРОНА: МАРКУСОВА ТЕОРИЈА

„To the extent that most energy, and all life, on earth derive ultimately from photosynthesis, our very existence depends on this fundamental process.“

Marye Anne Fox [1]

У појединим хемијским реакцијама долази до прелаза електрона (electron transfer, ET) са једне хемијске врсте (а то могу бити атоми, молекули, слободни радикали, јони, итд.) на другу хемијску врсту. Прелаз електрона је механистички опис редокс реакције где се мења оксидационо стање реактанта и производа. Постоји прелаз електрона у унутрашњој сфери (inner sphere ET), прелаз електрона у спољашњој сфери (outer sphere ET), и хетерогени прелаз електрона. Код прелаза електрона у унутрашњој сфери, између редокс центара постоји „мост“ израђен од ковалентно повезаних атома, при чему мост може бити перманентан (интрамолекулски прелаз електрона), или привремен (интермолекулски прелаз електрона). Код прелаза електрона у спољашњој сфери не постоји никакав мост између редокс центара, већ електрон „скаче“ кроз простор са редукционог на оксидациони цен-

тар. Код хетерогеног прелаза електрона електрон се премешта између хемијске врсте и електроде у чврстом стању.

Рудолф Маркус (Rudolph Marcus) је амерички хемичар канадског порекла који је педесетих година прошлог века развио прву теорију о прелазу електрона која је наишла на опште одобравање код научне јавности [2]. Маркус се првенствено бавио прелазом електрона у спољашњој сфери [2–5], да би аустралијски биохемичар Ноел Хаш (Noel Hush) проширио теорију и на прелаз електрона у унутрашњој сфери [6]. Теорију је даље проширио израелски физикохемичар Јошуа Јортнер (Joshua Jortner) са сарадницима тако што је укључио квантне ефекте [7, 8]. Коначно, у теорију је уведен и утицај вибронског купловања на прелаз електрона од стране америчких и аустралијских физикохемичара Сузан Фајфо (Susan Pierpho), Елмарс Крауса (Elmars Krausz) и Пола Шаца (Paul Schatz) [9].

Маркусова теорија потврђена је многобројним експериментима. Најупечатљивија експериментална подршка Маркусовом раду остварена је 1984. године (скоро 25 година након што је теорија постављена) од



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Synergic application of spectroscopic and theoretical methods to the chlorogenic acid structure elucidation

Svetlana Marković^{a,*}, Jelena Tošović^a, Jasmina M. Dimitrić Marković^b^a Faculty of Science, University of Kragujevac, 12 Radoja Domanovića, 34000 Kragujevac, Serbia^b Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, 12-16 Studentski trg, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2016

Received in revised form 23 March 2016

Accepted 29 March 2016

Available online 6 April 2016

Keywords:

Chlorogenic acid
Vibrational spectra
NMR spectra
UV spectrum
DFT calculations

ABSTRACT

Although chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid, **5CQA**) is a dietary polyphenol known for its pharmacological and nutritional properties, its structural features have not been completely elucidated. This is the first study whose aim is to contribute to clarification of the **5CQA** structure by comparing the experimental and simulated IR, Raman, ¹H NMR, ¹³C NMR, and UV spectra. For this purpose, a comprehensive conformational analysis of **5CQA** was performed to reveal its most stable conformations in the gas-state and solution (DMSO and methanol). The lowest-energy conformers were used to predict the spectra at two levels of theory: B3LYP-D3/and M06-2X/6-311+G(d,p) in combination with the CPCM solvation model. Both methods provide very good agreement between all experimental and simulated spectra, thus indicating correct arrangement of the atoms in the **5CQA** molecule. The quinic moiety is characterized with directed hydrogen bonds, where the carboxylic hydrogen is not oriented towards the carbonyl oxygen of the carboxylic group, but towards the oxygen of the proximate hydroxyl group. In the gas-state the lowest-energy conformers are characterized with the O4#H4...O9' hydrogen bond, whereas in the solvated state the structures with the O4#H4...O10' hydrogen bond prevail. Knowing the fine structural details, i.e. the proper conformation of **5CQA**, provides a solid base for all further investigations related to this compound.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It has been widely accepted that dietary antioxidants play a protective role against the development and progression of the pathological conditions related to oxidative stress. Epidemiological studies showed that consumption of fruits and vegetables is helpful in preventing some chronic diseases [1,2]. Fruits and vegetables are rich in natural polyphenols, whose antioxidative properties proved to contribute to the protective role of these foods [3]. An important class of polyphenols is phenolic acids. The interest in these compounds originates from their numerous biological roles [4]. One of the phenolic acids that is wide spread in human diet is chlorogenic acid (Fig. 1).

Chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid, **5CQA**) is an ester of the caffeic and quinic acids. It can be isolated from natural plants such as coffee, pears, plums, potatoes, tomatoes, carrots and oilseeds. Like other dietary polyphenols, chlorogenic acid shows pharmacological and nutritional properties, such as antitumor, antidiabetic, and

antihypertensive activities [5–7]. It has been recognized that **5CQA** can limit low-density lipoprotein oxidation, so it exhibits various antiatherosclerotic activities [8]. Furthermore, **5CQA** possesses anti-inflammatory, hypolipidemic, and antioxidative properties [9–12]. Theoretical investigations regarding antioxidative activity of **5CQA** have been initiated only recently [13,14]. Due to its high availability in the foods, the antioxidative potential of **5CQA** is very accessible. By scavenging alkylperoxyl radicals **5CQA** removes very toxic reactive species and prevents the damage they cause on DNA.

Chlorogenic acid exists in the form of white powder. Taking into account that the X-ray powder diffraction analysis for **5CQA** has not been carried out yet, the exact structure of solid **5CQA** is not known. There are few experimental studies devoted to the Raman and NMR spectra of **5CQA** [15–18]. In addition, UV–vis absorption spectroscopy has been used to investigate complex formation of some metal ions with **5CQA** [19,20]. The effects of solvent polarity on the UV–vis spectra of **5CQA** have been recently investigated [21]. It was shown in a recent work [18] that, in comparison to **5CQA**, (1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)5-*O*-caffeoylquinic acid features an inverted configuration at the C4 atom. On the basis of the NMR study the preferential conformations of both isomers were

* Corresponding author.

E-mail address: mark@kg.ac.rs (S. Marković).

Structural and Antioxidative Features of Chlorogenic Acid

Jelena Tošović,* Svetlana Marković

University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

* Corresponding author's e-mail address: jelena.tosovic@kg.ac.rs

RECEIVED: October 11, 2016 * REVISED: February 28, 2017 * ACCEPTED: March 1, 2017

PROCEEDING OF THE 28TH MATH/CHEM/COMP CONFERENCE, JUNE 20–25, 2016, DUBROVNIK, CROATIA

Abstract: This work contributes to the structure clarification of chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid, **5CQA**) by comparing the experimental and simulated IR, Raman, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and UV-vis spectra. The lowest-energy conformers in the gas-phase and solution were used for all calculations. Very good agreement between all experimental and simulated spectra indicates correct arrangement of the atoms in the **5CQA** molecule. In addition, the bond dissociation enthalpies, proton affinities, electron transfer enthalpies, ionization potentials, and proton dissociation enthalpies for **5CQA** were used for thermodynamic consideration of the major antioxidative mechanisms: HAT (Hydrogen Atom Transfer), SPLET (Sequential Proton-Loss Electron-Transfer), and SET-PT (Single Electron Transfer – Proton Transfer). It was found that HAT may be the predominant mechanism in nonpolar solvents, while HAT and SPLET are competitive pathways in polar media.

All quantum-chemical calculations were carried out by means of the MN12-SX method. Its performance is similar to those of the B3LYP-D2, B3LYP-D3, and M06-2X functionals.

Keywords: chlorogenic acid, spectral properties, thermodynamic parameters, MN12-SX.

INTRODUCTION

CHLOROGENIC acid (5-*O*-caffeoylquinic acid, **5CQA**), an ester formed between caffeic and quinic acids (Figure 1), is a natural polyphenol that can be isolated from various fruits and vegetables. This compound is an important secondary metabolite with various roles in plants. It has been demonstrated that enhanced levels of **5CQA** in transgenic tomato plants improve protection from the UV radiation, and increase microbial resistance.^[1,2] In addition, it has been shown that **5CQA** acts as pest resistance factor in ornamental plants.^[3] Like other dietary polyphenols, **5CQA** shows pharmacological and biological activities such as antihypertensive, antitumor, antidiabetic, hypolipidemic, and anti-inflammatory, as well as antioxidative properties.^[4–10] Polyphenols realize their antioxidative action via several mechanisms: hydrogen atom transfer (HAT), sequential proton loss electron transfer (SPLET), single electron transfer – proton transfer (SET-PT), proton coupled electron transfer (PCET), radical adduct formation (RAF), single electron transfer (SET), and sequential proton

loss hydrogen atom transfer (SPLHAT).^[11–14] However, HAT (eq. 1), SPLET (eqs 2 and 3), and SET-PT (eqs 4 and 5) are considered as major antioxidative mechanisms, as they are most often obeyed by various polyphenols.

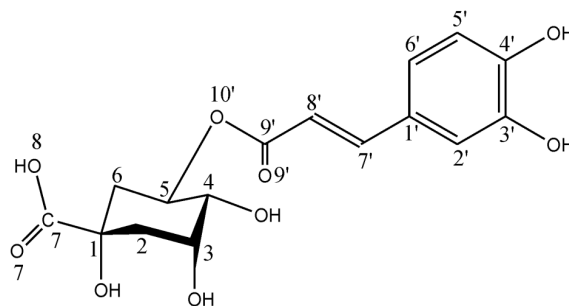


Figure 1. Atom labelling scheme in chlorogenic acid (**5CQA**).



Revisiting the solvation enthalpies and free energies of the proton and electron in various solvents



Z. Marković^{a,*}, J. Tošović^b, D. Milenković^c, S. Marković^b

^a State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Serbia

^b Faculty of Science, University of Kragujevac, 12 Radoja Domanovića, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Bioengineering Research and Development Center, Prvoslava Stojanovića 6, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2015

Received in revised form 4 September 2015

Accepted 7 September 2015

Available online 25 September 2015

Keywords:

Solvated proton and electron
Solvation enthalpy and Gibbs energy
Ab initio and DFT methods
SMD solvation method

ABSTRACT

In scientific literature there are only several values for solvation enthalpies and free energies of the proton and electron, the quantities from which the enthalpies and free energies of the solvated proton and electron can be issued. The latter quantities are of significance in thermodynamic modeling of antioxidative properties in the media where the reactions really occur. This work fills this gap in scientific literature. Namely, a systematic investigation of the solvation enthalpies and free energies of the proton and electron in twenty commonly used solvents of different polarities was performed. For this purpose eleven *ab initio* and DFT methods were used in combination with the 6-311++G(d,p) basis set and SMD solvation model. Due to very good overall performance, B3LYP was selected for further computations with larger basis sets. The thermodynamic values obtained at the B3LYP/Aug-cc-pVTZ level of theory are in very good agreement with the existing several values for solvation enthalpies of the proton and electron, and they are recommended for application in the examinations of antioxidative activity in different solvents.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Antioxidative activity of various classes of compounds has been the subject of numerous experimental and theoretical studies. Theoretical investigations are often focused on the elucidation of the mechanisms through which compounds exhibit their ability to trap reactive free radicals by yielding more stable and less harming radical species. There are three major antioxidative mechanisms: HAT (Hydrogen Atom Transfer), SET-PT (Single Electron Transfer-Proton Transfer) and SPLET (Sequential Proton-Loss Electron-Transfer). These processes are usually described by the following thermodynamic quantities: BDE (Bond Dissociation Enthalpy), IP and PDE (Ionisation Potential and Proton Dissociation Enthalpy), and PA and ETE (Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy). For an antioxidative compound ArOH these enthalpies are defined as follows:

$$\text{BDE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{ArOH}) \quad (1)$$

$$\text{IP} = H(\text{ArOH}^{+\bullet}) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArOH}) \quad (2)$$

$$\text{PDE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}^{+\bullet}) \quad (3)$$

$$\text{PA} = H(\text{ArO}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}) \quad (4)$$

$$\text{ETE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArO}^-) \quad (5)$$

In Eqs. (1)–(5) H denotes the enthalpy of the parent molecule (ArOH), its radical cation (ArOH⁺), radical (ArO[•]), and anion (ArO[−]). Certainly, the analogous equations can be written where the enthalpies are replaced with free energies (G). The enthalpies (free energies) of the hydrogen atom (H[•]), proton (H⁺), and electron (e[−]) also figure in these equations, where the enthalpies (free energies) of the proton and electron cannot be calculated. The thermodynamic quantities for the gas-phase can be easily attained by inserting the commonly accepted values of 6.197 kJ mol^{−1} for the proton enthalpy ($5/2RT$, the value for an ideal gas), 3.146 kJ mol^{−1} for the electron enthalpy, −26.255 kJ mol^{−1} for the proton free energy, and −3.633 kJ mol^{−1} for the electron free energy [1]. The gas-phase values for $H(\text{H}^+)$, $H(\text{e}^-)$, $G(\text{H}^+)$, and $G(\text{e}^-)$ have been recently revised [2,3]. Under an assumption that the proton does not behave as a classical particle at all temperatures (lower than 120 K), the values of 6.1398 and −26.3424 kJ mol^{−1} for $H(\text{H}^+)$ and $G(\text{H}^+)$ were obtained by using a procedure based on the Fermi–Dirac formalism at the standard pressure of 1 bar [2]. A procedure which determines the entropy of the electron in the gas-phase was used to calculate other thermodynamic quantities of the electron, and the values of 3.1351 and −3.6160 kJ mol^{−1} were obtained for $H(\text{e}^-)$ and $G(\text{e}^-)$ [3].

* Corresponding author. Tel.: +381 64 6619438.

E-mail address: zmarkovic@np.ac.rs (Z. Marković).



Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids



Svetlana Marković*, Jelena Tošović

Faculty of Science, University of Kragujevac, 12 Radoja Domanovića, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2015

Received in revised form 1 April 2016

Accepted 2 May 2016

Available online 3 May 2016

Chemical compounds studied in this article:

Caffeic acid (PubChem CID: 689043)

Chlorogenic acid (PubChem CID: 1794427)

Cryptochlorogenic acid (PubChem CID: 9798666)

Neochlorogenic acid (PubChem CID: 5280633)

Keywords:

Antioxidative activity

Chlorogenic acid isomers

Caffeic acid

Thermodynamic parameters

HAT, SPLET, and SET-PT

ABSTRACT

A detailed conformational analysis was performed to determine the most stable conformers of chlorogenic, cryptochlorogenic, and neochlorogenic acids. The simulated and experimental NMR spectra of caffeoylquinic acids are in excellent agreement. The bond dissociation enthalpies, proton affinities, electron transfer enthalpies, ionisation potentials, and proton dissociation enthalpies for these compounds and caffeic acid in benzene, methanol, and water were used for thermodynamic consideration of the major antioxidative mechanisms: HAT (Hydrogen Atom Transfer), SPLET (Sequential Proton-Loss Electron-Transfer), and SET-PT (Single Electron Transfer – Proton Transfer). All compounds are characterised with very similar values of each enthalpy, suggesting that they will exhibit comparable antioxidative activities. This assumption is in perfect accord with the experimental findings. It was suggested that HAT may be the predominant mechanism in nonpolar solvents, while HAT and SPLET are competitive pathways in polar media. All calculations were performed using the B3LYP-D2/6-311++G(d,p) and M06-2X/6-311++G(d,p) levels of theory and CPCM solvation model.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Caffeoylquinic acids are esters of caffeic acid (CA) with quinic acid. According to the difference in binding site, there are three isomers of these phenolic acids (Fig. 1): chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid, 5CQA), cryptochlorogenic acid (4-O-caffeoylquinic acid, 4CQA), and neochlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid, 3CQA).

5CQA is a constituent of various plants, where it acts as an antioxidant, and thus protects against lipid peroxidation (Kasai, Fukada, Yamaizumi, Sugie, & Mori, 2000; Ohnishi et al., 1994). This compound is especially abundant in coffee, but it is also the major soluble polyphenol found in potato, tomato and eggplant, and it also accumulates to considerable levels in apples, pears, plums, and blueberries (Wang, Wang, & Yang, 2007). Green coffee extract is used for production of encapsulated food supplements, some beverages, and conventional coffee products (Farah, Monteiro, Donangelo, & Lafay, 2008). 3CQA was found in the fresh and dried

plum at significant concentration (Fang, Yu, & Prior, 2002), whereas the concentrations of 4CQA and 5CQA were smaller (Fang et al., 2002; Nakatani et al., 2000).

The studies on caffeoylquinic acids are mainly focused on experimental examinations of 5CQA (Clifford, Wu, Kirkpatrick, & Kuhnert, 2007; Nakatani et al., 2000). This compound proved to exhibit anticarcinogenic, antimutagenic (Friedman, 1997), and glucose lowering effects (Thompson, Yoon, Jenkins, Wolever, & Jenkins, 1983), antioxidative activity for human low-density lipoprotein (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996), as well as anti-obesity properties and ability to improve lipid metabolism (Cho et al., 2010). In addition, 5CQA acts as a scavenger of reactive oxygen and nitrogen species (Kono et al., 1997). Surprisingly, theoretical investigations of caffeoylquinic acids have been initiated only recently, where 5CQA was included in a set of twenty natural polyphenols whose structure-thermodynamics-antioxidant relationships were examined by means of the DPPH[•] scavenging assay, B3LYP/6-311++G(d,p) calculations, and quantitative structure-activity relationship modelling (Chen, Xiao, Zheng, & Liang, 2015). It is reasonable to expect that other two isomers, 3CQA and 4CQA, will also exhibit various biological effects, including

* Corresponding author.

E-mail address: mark@kg.ac.rs (S. Marković).



Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid



Jelena Tošović^{a,*}, Svetlana Marković^a, Jasmina M. Dimitrić Marković^b, Miloš Mojović^b, Dejan Milenković^c

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, 12 Radoja Domanovića, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, 12-16 Studentski trg, 11000 Belgrade, Serbia

^c Bioengineering Research and Development Centre, 6 Prvoslava Stojanovića, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2017

Received in revised form 26 April 2017

Accepted 16 May 2017

Available online 20 May 2017

Chemical compounds studied in this article:

5-O-caffeoylquinic acid (PubChem CID: 1794427)

Keywords:

ESR experiment

DFT calculations

Thermodynamic approach

Kinetic approach

ABSTRACT

Although chlorogenic acid (**5CQA**) is an important ingredient of various foods and beverages, mechanisms of its antioxidative action have not been fully clarified. Besides electron spin resonance experiment, this study includes thermodynamic and mechanistic investigations of the hydrogen atom transfer (HAT), radical adduct formation (RAF), sequential proton loss electron transfer (SPLET), and single electron transfer – proton transfer (SET-PT) mechanisms of **5CQA** in benzene, ethanol, and water solutions. The calculations were performed using the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory and CPCM solvation model. It was found that SET-PT is not a plausible antioxidative mechanism of **5CQA**. RAF pathways are faster, but HAT yields thermodynamically more stable radical products, indicating that in acidic and neutral media **5CQA** can take either HAT or RAF pathways. In basic environment (e.g. at physiological pH) SPLET is the likely antioxidative mechanism of **5CQA** with extremely high rate.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

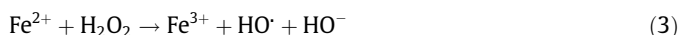
In living organisms, reactive oxygen species are formed in a wide range of reactions. Superoxide radical anion is mainly formed in the electron transport chains during cellular respiration, when an oxygen molecule takes up one electron. At pH = 4.8, $O_2^{\cdot-}$ is in equilibrium with the more potent hydroperoxyl radical:



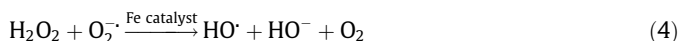
implying that $O_2^{\cdot-}$ prevails at larger pH values (e.g. under physiological conditions), whereas HOO^{\cdot} prevails in acidic media. In numerous plant and animal tissues $O_2^{\cdot-}$ undergoes enzymatic dismutation:



Hydrogen peroxide can undergo Fenton reaction:

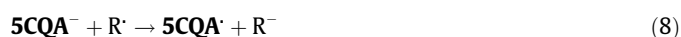


and Haber-Weiss reaction:



In both processes a powerful oxidant, the hydroxyl radical, is formed.

Antioxidants are characterized with many beneficial properties related to their ability to inhibit oxidative stress and associated molecular damage. Polyphenols are an important group of antioxidants that realize their antioxidative action via several mechanisms (Fifen, Nsangou, Dhaouadi, Motopon, & Jaidane, 2011; Galano & Alvarez-Idaboy, 2013; Galano et al., 2016; Mazzone, Malaj, Galano, Russo, & Toscano, 2015; Leopoldini, Russo, & Toscano, 2011; Litwinienko & Ingold, 2007). The hydrogen atom transfer [HAT, Eq. (5)], radical adduct formation [RAF, Eq. (6)], sequential proton loss electron transfer [SPLET, Eqs. (7)–(9)], and single electron transfer – proton transfer [SET-PT, Eqs. (10) and (11)] mechanisms in chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid, **5CQA**) are the subject of the present investigation.



* Corresponding author.

E-mail address: jelena.tosovic@kg.ac.rs (J. Tošović).



Reactivity of chlorogenic acid toward hydroxyl and methyl peroxy radicals relative to trolox in nonpolar media

Jelena Tošović¹ · Svetlana Marković¹

Received: 14 March 2018 / Accepted: 23 April 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The quantum mechanics-based test for overall free-radical scavenging activity was applied for the investigation of antioxidative capacity of chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid, **5CQA**) relative to trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, **Tx**) as a reference compound. Hydrogen atom transfer (HAT), radical adduct formation (RAF), electron transfer (ET), and proton loss (PL) reactions of **5CQA** and **Tx** with HO• and CH₃OO• radicals in benzene and pentyl ethanoate were examined. For this purpose, two theoretical models, M06-2X/6-311++G(d,p) in combination with the CPCM solvation model, and M05-2X/6-311++G(d,p) in combination with the SMD solvation model, were employed. It was found that M05-2X/6-311++G(d,p)—SMD failed to evaluate the influence of pentyl ethanoate, whereas M06-2X—CPCM in benzene and pentyl ethanoate and M05-2X—SMD in benzene proved to be operative and showed similar trends. Both compounds can react with HO• via HAT and RAF mechanisms, whereas HAT is the only reaction pathway with CH₃OO•. **5CQA** is more efficient scavenger of HO• than **Tx**, but less efficient scavenger of CH₃OO•. Less reactive free radicals are more suitable for the determination of antioxidative activity of a compound relative to **Tx**. Highly reactive free radicals need to be included in the investigation of all potential reaction pathways of the compound, in which case the results from different approaches can be inconsistent.

Keywords Antioxidative activity · Rate constants · r^T values · M06-2X/6-311++G(d,p)—CPCM · M05-2X/6-311++G(d,p)—SMD

1 Introduction

Highly reactive free radicals, such as hydroxyl and peroxy radicals, are produced in the organism during normal metabolic processes. Imbalance between formation and consumption of free radicals leads to phenomenon known as oxidative stress [1]. These reactive species contribute to oxidative damage to proteins, DNA and lipids and are associated with some diseases [2, 3]. Thus, the compounds able to scavenge free radicals are in the focus of contemporary investigations. Numerous epidemiological studies have shown that dietary

antioxidants can reduce development and progression of some chronic diseases [4–7]. One of the most abundant phenolic acid antioxidants present in fruits and vegetables is chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid, **5CQA**) (Fig. 1) [8].

A wide range of experimental assays are used to evaluate antioxidative capacity [9–12]. Roughly, there are two types of these assays: chemical and biological [13]. In biological assays the damage in biomolecules caused by radical processes is measured. Chemical assays are used in studies which are devoted to evaluation of the rate constants for the reactions between free radicals and antioxidants. In these assays the antioxidative capacity of a compound is compared to that of some reference compound. The most commonly used antioxidant for this purpose is trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, **Tx**) (Fig. 2).

Recently, a computational protocol known as the quantum mechanics-based test for overall free-radical scavenging activity (QMORSA) has been proposed for estimating antioxidative capacity of compound [14]. This approach is based

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00214-018-2251-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jelena Tošović
jelena.tosovic@pmf.kg.ac.rs

¹ Faculty of Science, University of Kragujevac, 12 Radoja Domanovića, Kragujevac 34000, Serbia

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Јелена Тошовић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Структурне и антиоксидативне особине хлорогенске киселине

која је одбрањена на Природно-математичком факултету _____
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу _____, 20.11.2018. године,

Јелена Тошовић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Тошовић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Структурне и антиоксидативне особине хлорогенске киселине

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 20.11.2018. _____ године,

Јелена Поповић

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>