

## STRUKTURA HLOROGENSKE KISELINE: SPEKTROSKOPSKI I KVANTNO-MEHANIČKI PRISTUP

*Jelena Tošović<sup>1</sup>, Svetlana Marković<sup>1</sup>, Jasmina M. Dimitrić Marković<sup>2</sup>*

**Izvod:** Cilj ovog rada je da se ispituju mogućnosti metode MN12-SX da reprodukuje različite vrste spektara hlorogenske kiseline (**5CQA**). Određeni su najstabilniji konformeri **5CQA** u gasovitoj i solvatisanoj fazi. Karakteristično za oba konformera je to da karboksilni vodonik nije okrenut ka karboksilnom kiseoniku, već ka kiseoniku susedne hidroksilne grupe, što je posledica jakih, usmerenih vodoničnih veza u hininskom delu. MN12-SX odlično reprodukuje vibracione i NMR spektre **5CQA**, ali podbacuje u simuliranju UV spektra. Ova mana metode može se pripisati zanemarivanju Hartri-Fokove izmene na velikim međuatomskim rastojanjima.

**Ključne reči:** funkcional MN12-SX, vibracioni spektri, NMR spektri, UV spektri

### Uvod

Hlorogenska kiselina (5-O-kafeoilhininska kiselina, **5CQA**) spada u grupu fenolnih jedinjenja i predstavlja estar kafeinske i hininske kiseline (Slika 1). Može se izolovati iz namirnica kao što su kafa, kruška, šljiva, paradajz, krompir i uljarice. Kao i ostala polifenolna jedinjenja koja su prisutna u hrani, **5CQA** pokazuje izrazitu farmakološku i biološku aktivnost.

**5CQA** postoji u obliku belog praha. Struktura **5CQA** u čvrstom stanju još uvek nije eksperimentalno određena (difrakcijom X-zraka). Urađeno je nekoliko eksperimentalnih studija posvećenih istraživanju ramanskog spektra (Eravuchira i sar., 2012.) i NMR spektra (Forino i sar., 2015.) **5CQA**. Što se tiče UV spektra, on je proučavan u cilju ispitivanja kompleksa prelaznih metala sa **5CQA** (Cornard i sar., 2008.). U našem prethodnom radu korišćene su različite spektroskopske metode (IR, ramanska, UV, <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR) u kombinaciji sa odgovarajućim kvantno mehaničkim proračunima (B3LYP-D3 i M06-2X) u cilju razjašnjenja strukture ovog jedinjenja (Marković i sar.).

Cilj ovog rada je da se ispituju mogućnosti novije metode, MN12-SX da reprodukuje različite vrste spektara **5CQA**, i da se dobijeni rezultati uporede sa postojećim.

### Materijal i metode rada

**5CQA** je kupljenja od komercijalnog proizvođača (Aldrich). IR spektar je snimljen na Thermo Nicolet 6700 FT-IR spektrometru sa ATR i DTGS TEC detektorima, u srednjoj IR oblasti. Ramanski spektar je snimljen na Thermo Scientific DXR ramanskom mikroskopu. NMR spektar je sniman u rastvaraču DMSO-*d*<sub>6</sub> i sa TMS kao

<sup>1</sup> Univerzitetu Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (jelena.tosovic@kg.ac.rs);

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Fakultet za Fizičku hemiju u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd, Srbija.

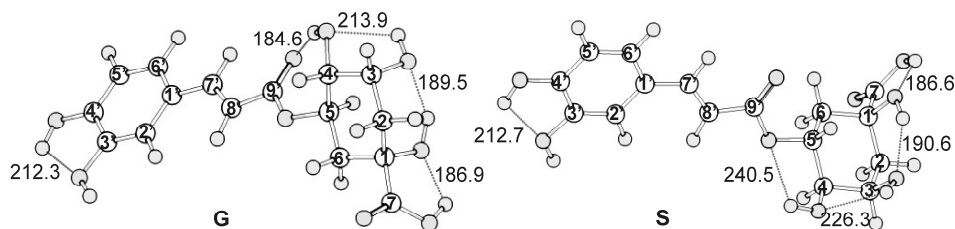
internim standardnom na Varian Gemini 200 MHz NMR spektrometru. UV spektar je snimljen u metanolu na Cary Series UV-vis spektrofotometru.

Za kvantno-mehanička izračunavanja korišćen je programski paket Gaussian 09 (Frisch i sar., 2010.). U prethodnom radu, urađena je detaljna konformaciona analiza (Marković i sar.). Da bi se odredio najstabilniji konformer u gasovitoj fazi i u DMSO rastvoru odabrano je 20 najstabilnijih konformera, i nad njima je izvršena puna optimizacija uz frekvencioni račun pomoću metode MN12-SX u kombinaciji sa bazisnim skupom 6-311+G(d,p) i solvatacionim modelom CPCM.MN12-SX je hibridni meta funkcional koji se zasniva na aproksimaciji nerazdvojivog gradijenta (NGA=Nonseparable Gradient Approximation). SX u nazivu metode potiče od "screened exchange" što znači da ovaj funkcional koristi Hartri-Fokovu izmenu na malim međuatomskim rastojanjima, a na velikim ne. Cilj ovakve aproksimacije je da smanji dužinu izračunavanja koja potiče od zahtevne Hartri-Fokove izmene. Najstabilniji konformer u gasovitoj fazi korišćen je za predviđanje IR i ramanskog spektra, dok je najstabilniji konformer u DMSO i metanolu korišćen za simulaciju odgovarajućih NMR i UV spektara.

## Rezultati istraživanja i diskusija

### Konformaciona analiza hlorogenske kiseline

Optimizovane geometrije najstabilnijih konformera u gasovitoj fazi i u DMSO rastvoru su prikazane na Slici 1. U gasovitoj fazi najstabilniji konformer je okarakterisan O4–H4···O9' vodoničnom vezom, dok je u solvatisanoj strukturi prisutna O4–H4···O10' vodonična veza. Dobijeni konformeri su u potpunoj saglasnosti sa najstabilnijim konformerima ispitivanim u prethodnom radu (Marković i sar.).



Slika 1. Optimizovane strukture najstabilnijih konformera hlorogenske kiseline u gasovitoj fazi i u DMSO rastvoru (strukture **G** i **S**). Označeni su atomi ugljenika i prikazane su dužine vodoničnih veza u pm.

Figure 1. Optimized structures of the most stable conformers of 5CQA in the gas-phase and DMSO solution (structures **G** and **S**). The carbon atoms are labeled, and the hydrogen bonds lengths are given in pm.

I u gasovitom i u solvatisanom stanju kafeinski deo molekula je u saglasnosti sa kristalnom strukturom kafeinske kiseline. 5CQA ima ukupno pet intramolekulskih vodoničnih veza od kojih je četiri locirano na hininskom delu molekula. Veoma je interesantno da u oba konformera karboksilni vodonik H8 nije okrenut ka O7, već ka

O1, t.j. ka kiseoniku susedne hidroksilne grupe. Negativno naelektrisani kiseonikovi atomi O1 i O3 grade jake O8–H8···O1 i O1–H1···O3 vodonične veze, što se manifestuje kroz dužine posmatranih veza (< 200 pm). Ovako jake vodonične veze utiču na orijentaciju svih hidroksilnih grupa na hininskom delu molekula. Treba istaći da je pronađeni najstabilniji solvatisani konformer u savršenoj saglasnosti sa pretpostavkom strukture *Forino*-a i saradnika (2015.), koju su dobili na osnovu detaljne NMR studije **5CQA**. Sa druge strane, dobijeni najstabilniji konformer u gasovitoj fazi nije u saglasnosti sa rezultatima *Cornard*-a i saradnika (2008.) koji su pri konformacionoj analizi uzeli u obzir samo 32 konformera, pri čemu konformer **G** nije uzet u razmatranje.

*Vibracioni spektri hlorogenske kiseline*

Tabela 1. Eksperimentalne i izračunate vrednosti talasnih brojeva u IR i ramanskom spektru **5CQA**, asignacija i intenziteti normalnih oblika

Table 1. Experimental and calculated wavenumbers in the IR and raman spectra of **5CQA**, assignments and intensities of the normal modes

Asignacija <i>Mode assignment</i>	$\nu_{IR}$	$\nu_{Raman}$	MN12-SX
	eksp (cm <sup>-1</sup> ) <i>expt (cm<sup>-1</sup>)</i>		izr (cm <sup>-1</sup> ) <i>calc (cm<sup>-1</sup>)</i>
OH istezanje (b <sup>†</sup> ) <i>OH stretching (b)</i>	3624 j <sup>‡</sup>		3582
OH istezanje (q) <i>OH stretching (q)</i>	3473 j		3500
OH istezanje (q) <i>OH stretching (q)</i>	3348 j		3473
CH istezanje (a) <i>CH stretching (a)</i>		2984 s	2963
CH istezanje (q) <i>CH stretching (q)</i>	2953 s	2951 s	2929
CO istezanje (q) <i>CO stretching (q)</i>	1732 sr		1742
CO istezanje (a) <i>CO stretching (a)</i>	1690 vj	1690 s	1638
CC istezanje (b,a) <i>CC stretching (b, a)</i>	1639 vj	1632 j	1571
CC istezanje (b,a) <i>CC stretching (b, a)</i>	1602 j	1604 vj	1541
CC istezanje (b,a) <i>CC stretching (b, a)</i>	1443 j	1443 sr	1389

<sup>†</sup>b, a, i q označavaju benzenski deo, aciklični niz i hininski deo  
<sup>‡</sup>vj – veoma jaka, j – jaka, sr – srednja, s – slaba

Uzimajući u obzir činjenicu da **5CQA** ima šest hidroksilnih grupa koje imaju veoma značajan uticaj na vibracione spektre, ovi spektri su jako složeni. Faktor skaliranja za primenjeni teorijski model (MN12-SX/6-311+G(d,p)) dobili smo pomoću metode najmanjih kvadrata, a na osnovu eksperimentalnih rezultata za IR spektar, i on iznosi 0.923. Izračunate

vrednosti za talasne brojeve su skalirane i dodeljene su odgovarajućim eksperimentalnim vrednostima. Vibracioni normalni oblici su određeni na osnovu najboljeg slaganja između eksperimentalnih i izračunatih vrednosti. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 1. Zbog kratkoće rada, u tabeli su prikazani samo najznačajniji vibracioni oblici.

Koeficijenti korelacije za IR i ramanski spektar su isti i iznose 0.9990. Što se tiče srednje apsolutne i relativne greške (SAG i SRG), njihove vrednosti za IR spektar iznose 24.3 cm<sup>-1</sup> i 1.8 %, dok za ramanski spektar te vrednosti su 23.2 cm<sup>-1</sup> i 1.8%. Ovakve greške nam pokazuju da metoda MN12-SX obezbeđuje veoma dobru saglasnost između eksperimentalnih i simuliranih vibracionih spektara, i isto tako ukazuje da je izvršena ispravna asignacija. Ovde treba napomenuti da su rezultati dobijeni pomoću MN12-SX metode u saglasnosti sa prethodnim rezultatima dobijenim pomoću B3LYP-D3 i M06-2X metoda.

Najizrazitije trake u IR spektru **5CQA** koje se javljaju između 4000 – 2000 cm<sup>-1</sup> su pripisane različitim oblicima OH vibracija (Tabela 2). Za oblast na visokim frekvencijama su takođe karakteristične trake koje potiču od CH istežućih vibracija na hininskom delu i u acikličnom nizu. Trake srednjeg i jakog intenziteta na 1732 (IR) i 1690 cm<sup>-1</sup> (IR) su pripisane CO istežućim vibracijama na hininskom delu i u acikličnom nizu. Takođe, trake srednjeg i jakog intenziteta na 1639 (IR), 1632 (R), 1604 (R), 1602 (IR) i 1443 (IR, R) su pripisane u najvećem delu CC istežućim vibracijama na benzenovom prstenu i u acikličnom nizu.

*NMR spektri hlorogenske kiseline*

Tabela 2. Eksperimentalne i izračunate vrednosti hemijskih pomeranja (ppm) u <sup>13</sup>C- i <sup>1</sup>H-NMR spektrima **5CQA** u DMSO

Table 2. Experimental and calculated chemical shifts (ppm) for the <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectra of **5CQA** in DMSO

C	Izr	Eksp	H	Izr	Eksp
	Calc	Exp		Calc	Exp
7	172.62	175.07	7'	7.535	7.420
9'	164.55	165.89	2'	6.893	7.035
4'	148.87	148.50	6'	6.967	6.985
3'	142.60	145.73	5'	6.634	6.760
7'	149.92	145.10	8'	6.152	6.150
1'	124.67	125.78	5[ax]	4.686	5.060
6'	131.22	121.51	3[eq]	4.223	3.919
5'	115.67	115.92	4[ax]	3.729	3.566
8'	112.03	114.96	2[ax]	2.027	2.060
2'	110.11	114.49	6[ax]	1.943	1.983
1	74.05	73.67	6[eq]	2.293	1.895
4	71.90	71.04	2[eq]	2.124	1.775
5	69.30	70.59			
3	70.35	68.27			
6	37.52	37.39			
2	37.46	36.48			

Pošto su vrednosti za hemijska pomeranja u  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru precenjene, a u  $^1\text{H}$ -NMR spektru potcunjene, izračunate vrednosti su skalirane i kao takve korišćene za poređenje sa eksperimentalnim rezultatima. Faktor skaliranja je kao i u prethodnom slučaju određen metodom najmanjih kvadrata i njegova vrednost za  $^{13}\text{C}$ -NMR iznosi 1.066 dok za  $^1\text{H}$ -NMR spektar iznosi 0.928. Dobijeni rezultati za  $^{13}\text{C}$ - i  $^1\text{H}$ -NMR su prikazani u Tabeli 2.

Koeficijenti korelacije za  $^{13}\text{C}$ - i  $^1\text{H}$ -NMR iznose 0.997 i 0.996, dok su vrednosti za SAG 2.26 i 0.17 ppm. Poredeći rezultate dobijene pomoću B3LYP-D3 i M06-2X metoda (Marković i sar.), sa rezultatima prikazanim u Tabeli 2, može se zaključiti da metoda MN12-SX ostvaruje najbolje rezultate kada je u pitanju simulacija NMR spektara. Vidljivo je odstupanje hemijskih pomeranja nekih ugljenikovih atoma od eksperimentalnih vrednosti. Ova pojava je najočiglednija na atomima C2', C6' i C8', što se može pripisati mogućnosti rotacije oko prostih veza. Slaganje između eksperimentalnog i simuliranog  $^1\text{H}$ -NMR spektra (Tabela 2) je iznenađujuće dobro što ukazuje na ograničenu fleksibilnost hininskog dela molekula koja je uslovljena postojanjem usmerenih vodoničnih veza.

#### *UV spektar hlorogenske kiseline*

UV spektar **5CQA** se sastoji od četiri apsorpcione trake na 329, 298, 244 i 218 nm. UV spektar ispitivanog jedinjenja u metanolu (konformer **S**) je simuliran pomoću TDDFT metode na istom nivou teorije kao i prethodni spektri. Simulirani spektar pokazuje samo jednu intenzivnu apsorpcionu traku na 328 nm koja odgovara HOMO→LUMO prelazu. Mada je slaganje izračunate i eksperimentalne talasne dužine za prvu traku izvanredno, ostale trake se u simuliranom spektru ne pojavljuju, pa se mora konstatovati da je MN12-SX metoda podbacila u simulaciji UV spektra **5CQA**.

### **Zaključak**

Simulirani  $^{13}\text{C}$ - i  $^1\text{H}$ -NMR spektri dobijeni pomoću metode MN12-SX su pokazali bolje slaganje sa eksperimentalnim vrednostima od metoda B3LYP-D3 i M06-2X. Što se tiče simulacije ramanskog i IR spektra, primenjena metoda obezbeđuje jako dobru saglasnost između izračunatih i eksperimentalnih vrednosti talasnih brojeva, gotovo istu kao i prethodne dve ispitivane metode. Obzirom da je u UV spektru reprodukovana samo jedna apsorpciona traka, može se zaključiti da je MN12-SX metoda podbacila u simulaciji ovog tipa spektara. Ova mana metode može se pripisati zanemarivanju Hartri-Fokove izmene na velikim međuatomskim rastojanjima.

### **Napomena**

Istraživanja u ovom radu deo su projekata “Sinteza, modelovanje, fizičko-hemijske i biološke osobine organskih jedinjenja i odgovarajućih kompleksa metala” (172016) i “Dinamika nelinearnih fizičko-hemijskih i bioloških sistema sa modeliranjem i predviđanjem njihovih ponašanja pod neravnotežnim uslovima” (172015) koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## Literatura

- Cornard J-P., Lapouge C., Dangleterre L., Allet-Bodelot C. (2008) Complexation of Lead(II) by Chlorogenic Acid: Experimental and Theoretical Study. *Journal of Physical Chemistry. Part A. Volumen (112): 12475–12484.*
- Eravuchira P. J., El-Abassy R. M., Deshpande S., Matei M. F., Mishra S., Tandon P., Kuhnert N., Materny A. (2012). Raman spectroscopic characterization of different regioisomers of monoacyl and diacyl chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy. Volumen (61): 10–16.*
- Forino M., Tenore G. C., Tartaglione L., Carmela D., Novellino N., Ciminiello P. (2015) (1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)5-O-Caffeoylquinic acid: Isolation, stereo-structure characterization and biological activity. *Food Chemistry. Volumen (178): 306–310.*
- Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A. et al. (2010) Gaussian 09, Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT.
- Marković S., Tošović J., Dimitrić Marković J. (godina) Synergic application of spectroscopic and theoretical methods to the chlorogenic acid structure elucidation. *Journal of Physical Chemistry. Part A. Na recenziji.*

## THE STRUCTURE OF CHLOROGENIC ACID: SPECTROSCOPIC AND QUANTUM MECHANICAL APPROACH

*Jelena Tošović<sup>1</sup>, Svetlana Marković<sup>1</sup>, Jasmina M. Dimitrić Marković<sup>2</sup>*

### Abstract

The aim of this work is to examine the performance of the MN12-SX method to reproduce various spectra of chlorogenic acid (**5CQA**). The most stable conformers of **5CQA** in the gaseous and solvated states were determined. In both conformers the carboxylic hydrogen is not oriented towards the carboxylic oxygen, but towards the adjacent hydroxyl group. This occurrence is a consequence of strong, directed hydrogen bonds in the quinic moiety. MN12-SX shows excellent performance in reproducing the vibrational and NMR spectra of **5CQA**, but fails in simulating the UV spectrum. This shortcoming of the method can be attributed to neglecting the Hartree-Fock exchange while modeling long-range interactions.

**Key words:** MN12-SX functional, vibrational spectra, NMR spectra, UV spectra

---

<sup>1</sup> University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (jelena.tosovic@kg.ac.rs);

<sup>2</sup> University of Belgrade, Faculty of Physical Chemistry, Studentski trg12-16, Belgrade, Serbia.