



**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE**

**Wydział Chemii
Instytut Nauk Chemicznych**

mgr Piotr Hołowiński

**WODNE POCHODNE KWASU
CHLOROGENOWEGO**

Rozprawa doktorska
wykonana w Katedrze Chromatografii
pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja L. Dawidowicza

Lublin 2025

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr hab. Andrzejowi L. Dawidowiczowi

za przekazaną wiedzę, opiekę promotorską oraz pomoc
udzieloną w trakcie przygotowania rozprawy doktorskiej.

STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA

1,3-diCQA	– kwas 1,3-dikawoilochoinowy (ang. <i>1,3-dicaffeoylquinic acid</i>)
1-CQA	– kwas 1-kawoilochoinowy (ang. <i>1-caffeoylquinic acid</i>)
^1H-^{13}C HMBC	– heterojądrowa spektroskopia korelacyjna dalekiego zasięgu jąder ^1H i ^{13}C (ang. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>)
^1H-^{13}C HSQC	– heterojądrowa spektroskopia korelacyjna jąder ^1H i ^{13}C z wykorzystaniem koherencji kwantowej pierwszego rzędu (ang. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
^1H-^1H COSY	– korelacyjna spektroskopia jąder ^1H (ang. <i>correlation spectroscopy</i>)
2x5-CQA*2xH₂O	– hydraty 5-CQA składające się z dwóch cząsteczek 5-CQA i dwóch cząsteczek wody
3,4-diCQA	– kwas 3,4-dikawoilochoinowy (ang. <i>3,4-dicaffeoylquinic acid</i>)
3,5-diCQA	– kwas 3,5-dikawoilochoinowy (ang. <i>3,5-dicaffeoylquinic acid</i>)
3-CQA	– kwas 3-kawoilochoinowy (ang. <i>3-caffeoylquinic acid</i>)
4,5-diCQA	– kwas 4,5-dikawoilochoinowy (ang. <i>4,5-dicaffeoylquinic acid</i>)
4-CQA	– kwas 4-kawoilochoinowy (ang. <i>4-caffeoylquinic acid</i>)
5-CQA	– kwas 5-kawoilochoinowy (ang. <i>5-caffeoylquinic acid</i>)
5-CQA-OH	– wodny addukt kwasu 5-kawoilochoinowego
ABTS	– 2,2'-azobis(3-etylo-2,3-dihydrobenzotiazolino-6-sulfonian) diamonu (ang. <i>diammonium 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulphonate)</i>)
ANOVA	– analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i>)
B3LYP	– hybrydowy funkcjonal korelacyjno-wymienny (ang. <i>Becke, 3 parameter; Lee-Yang-Parr</i>)
BBO	– dwukanałowa (^{31}P - $^{15}\text{N}/^1\text{H}$) szerokopasmowa sonda pomiarowa
C-18	– żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi
COX	– cyklooksygenaza (ang. <i>cyclooxygenase</i>)
CPCM	– model solwatacyjny (ang. <i>Conductor-Polarizable Continuum Model</i>)
CUPRAC	– metoda oznaczania zdolności do redukcji jonów miedzi (II) (ang. <i>cupric ion reducing antioxidant capacity</i>)
cz.d.a.	– czysty do analizy
D₂O	– deuterowana woda
D4	– dyspersyjna korekta energii stosowana w teorii funkcjonału gęstości

DFT	– teoria funkcjonału gęstości (ang. <i>density functional theory</i>)
DMSO-d₆	– deuterowany dimetylosulfotlenek
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
DOSY	– dyfuzyjna spektroskopia NMR (ang. <i>diffusion-ordered spectroscopy</i>)
DPPH	– 2,2-difenylo-1-(2,4,6-trinitrofenylo)hydrazyl (ang. <i>2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl</i>)
D_{ww}	– wartość współczynnika dyfuzji wzorca wewnętrznego wyznaczona eksperymentalnie
D_{ww,odn}	– wartość odniesienia współczynnika dyfuzji wzorca wewnętrznego
D_x	– wartość współczynnika dyfuzji analitu lub wzorca zewnętrznego wyznaczona eksperymentalnie
D_{x,norm}	– znormalizowany współczynnik dyfuzji analitu lub wzorca zewnętrznego
ESI	– jonizacja poprzez elektrorozpylanie (ang. <i>electrospray ionization</i>)
ET-PT	– mechanizm przeniesienia protonu poprzedzonego transferem elektronu (ang. <i>electron – transfer proton – loss</i>)
F_{crit}	– wartość rozkładu F Snedecora
F_{exp}	– statystyka testowa obliczona na podstawie danych eksperymentalnych
FRAP	– metoda oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza (III) (ang. <i>ferric ion reducing antioxidant parameter</i>)
GIAO	– orbitale atomowe zależne od punktu odniesienia pola wektorowego (ang. <i>Gauge Including Atomic Orbitals</i>)
HAT	– mechanizm przeniesienia atomu wodoru (ang. <i>hydrogen atom transfer</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IC 50	– stężenie hamujące aktywność w 50 % (ang. <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
IUPAC	– Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC-MS	– chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>), chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas
LDL	– lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. <i>low density lipoproteins</i>)

LLE	– ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. <i>liquid-liquid extraction</i>)
M	– masa molowa [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
m/z	– stosunek masy jonu do jego ładunku
MAPK	– kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MES	– bufor 2-(N-morfolino)etanosulfonowy, kwas 2-morfolinoetanosulfonowy (ang. <i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>)
MMFF94s	– pole siłowe MMFF94s (ang. <i>static Merck Molecular Force Field 94</i>)
MSⁿ	– wielostopniowa spektrometria mas
MSPD	– ekstrakcja z wykorzystaniem dyspersji matrycy do fazy stałej (ang. <i>matrix solid-phase dispersion</i>)
NF-κB	– jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NMR	– jądrowy rezonans magnetyczny (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>), spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego
NOESY	– spektroskopia jądrowego efektu Overhausera (ang. <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
QuEChERS	– metoda ekstrakcji QuEChERS (ang. <i>Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe</i>)
R²	– współczynnik determinacji
SCAN	– skanowanie jako tryb akwizycji danych
SIM	– tryb monitorowania pojedynczego jonu (ang. <i>single ion monitoring</i>), tryb monitorowania wybranych jonów (ang. <i>selected ions monitoring</i>)
SLE	– ekstrakcja ciało stałe-ciecz (ang. <i>solid-liquid extratction</i>)
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid-phase extraction</i>)
SPLET	– mechanizm przeniesienia elektronu poprzedzonego deprotonacją (ang. <i>Sequential proton loss – electron transfer</i>)
T₁	– stała relaksacji spinowo-sieciowej
TOCSY	– zupełna spektroskopia korelacyjna (ang. <i>total correlation spectroscopy</i>)
TPTZ	– 2,4,6-tri(2-pyridylo)-s-triazyna
TXI	– trójkanałowa ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) inwersyjna sonda pomiarowa
UV-VIS	– zakres ultrafioletowy i widzialny promieniowania elektromagnetycznego (ang. <i>ultraviolet-visible</i>)
δ	– skala przesunięcia chemicznego jąder ^1H i ^{13}C

Δ_D	– długość czasu dyfuzji
δ_D	– długość impulsów gradientu pola magnetycznego
$\Delta_{\max}$	– maksymalny błąd dopasowania
σ	– odchylenie standardowe
σ_X	– magnetyczna stała ekranowania jądra X

SPIS TREŚCI

STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA	3
SPIS TREŚCI.....	7
WSTĘP.....	10
CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	11
1. Polifenole – ogólna charakterystyka.....	12
1.1. Budowa i podział polifenoli.....	12
1.2. Biosynteza polifenoli.....	16
1.3. Właściwości chemiczne oraz aktywność biologiczna polifenoli w zarysie	18
2. Kwasy chlorogenowe – ogólna charakterystyka.....	21
2.1. Budowa kwasów chlorogenowych	21
2.2. Występowanie kwasów chlorogenowych	24
2.3. Znaczenie kwasów chlorogenowych w przyrodzie	27
2.4. Aktywność biologiczna kwasów chlorogenowych	27
3. Izolacja wtórnych metabolitów z matryc roślinnych	30
3.1. Degradacja kwasów chlorogenowych podczas ich ekstrakcji.....	30
4. Problem tworzenia związków beta-hydroksy-karbonylowych na drodze bezpośredniej addycji Michaela.....	35
CEL PRACY	38
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	40
5. Materiały i odczynniki	41
6. Preparatyka i izolacja wodnych adduktów 5-CQA.....	43
7. Eksperymenty dotyczące wodnych kompleksów 5-CQA.....	43
7.1. Preparatyka i badanie suchych ekstraktów zawierających wodne kompleksy 5-CQA	43
7.2. Badania strukturalne wodnych kompleksów 5-CQA	44
7.3. Badanie mechanizmu powstawania wodnych kompleksów 5-CQA	44
7.3.1. Badanie kinetyki powstawania wodnych kompleksów 5-CQA	44
7.3.2. Analiza elementarna suchych ekstraktów 5-CQA	45
7.3.3. Oznaczanie zawartości wody w suchych ekstraktach 5-CQA	45
7.3.4. Spektroskopia dyfuzyjna NMR i wyznaczanie masy molowej wodnych kompleksów 5-CQA.....	45
7.4. Poszukiwania obecności prekursorów wodnych kompleksów 5-CQA w roztworach zawierających ten kwas.....	47
7.4.1. Eksperymenty prowadzone w trakcie badań dotyczących wpływu czasu inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na:.....	48
7.4.1.1. Pomiar przewodnictwa wodnych roztworów 5-CQA.....	48

7.4.1.2.	Badanie hydrolizy 5-CQA	48
7.4.1.3.	Badanie kinetyki reakcji rodnikowych oraz reakcji redoks	48
7.5.	Eksperymenty prowadzone w trakcie badań wpływu mediów hydrofobowych na stopień konwersji 5-CQA do jego wodnych kompleksów	49
7.5.1.	LLE	49
7.5.2.	SPE.....	50
7.5.3.	QuEChERS.....	51
7.5.4.	MSPD.....	52
7.6.	Badania zależności pomiędzy wodnymi kompleksami i wodnymi adduktami 5-CQA.....	52
8.	Analiza chromatograficzna.....	53
9.	Analiza NMR	53
10.	Obliczenia kwantowo-chemiczne	55
WYNIKI i DYSKUSJA.....		56
11.	Identyfikacja wodnych adduktów 5-CQA.....	57
11.1.	Konfiguracja diastereoizomerów 5-CQA-OH	61
11.2.	Stabilność wodnych adduktów 5-CQA	68
11.3.	Izomeryzacja 5-CQA-OH w trakcie inkubacji	72
12.	Analiza NMR suchych pozostałość po odparowaniu wody z ekstraktów 5-CQA.....	74
12.1.	Analiza widm NMR dwóch nowo wykrytych pochodnych 5-CQA.....	76
12.2.	Struktura kompleksów 5-CQA*H ₂ O	83
12.3.	Kompleksy 4- i 3-CQA z wodą	88
13.	Kinetyka powstawania kompleksów 5-CQA*H₂O	93
13.1.	Wpływ czasu inkubacji na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H ₂ O.....	94
13.2.	Wpływ początkowego stężenia 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H ₂ O	96
13.3.	Wpływ temperatury inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H ₂ O	98
13.4.	Wpływ metody usuwania wody z wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H ₂ O	100
13.5.	Wpływ inkubacji statycznej i dynamicznej wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H ₂ O	101
13.6.	Prawdopodobny mechanizm tworzenia kompleksów 5-CQA*H ₂ O	102
13.7.	Eksperymenty dodatkowe	103
14.	Hydraty 5-CQA w roztworach wodnych oraz produktach spożywczych zawierających ten kwas	108
14.1.	Bezpośrednia analiza NMR wodnych roztworów 5-CQA.....	108
14.2.	Ocena wybranych właściwości fizykochemicznych wodnych roztworów 5-CQA	110

Przewodnictwo elektrolityczne	110
Hydroliza 5-CQA.....	110
Właściwości przeciwutleniające	113
Ocena właściwości przeciwutleniających modelowych produktów spożywczych zawierających 5-CQA	115
14.3. Częstkowy rząd reakcji tworzenia hydratów 5-CQA w jego roztworach wodnych.....	117
15. Wpływ metod przygotowania próbek do analizy na powstawanie hydratów 5-CQA.....	120
15.1. Wpływ metody przygotowania próbki do analiz na powstawanie hydratów 5-CQA - porównanie technik ekstrakcji	121
15.2. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji SPE - wpływ eluentu stosowanego w technice SPE	122
15.3. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji SPE - elucja 5-CQA mieszaninami metanol/woda	124
15.4. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji wodnych roztworów 5-CQA - eksperymenty dodatkowe	125
15.5. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji - ekstrakcja produktów spożywczych zawierających 5-CQA	128
15.6. Wykorzystanie NMR do oceny rzeczywistej ilości 5-CQA w suchych ekstraktach LLE i SPE	132
16. Wzajemne relacje pomiędzy adduktami i hydratami 5-CQA	134
16.1. Wpływ obecności hydratów 5-CQA w wodnych roztworach tego kwasu na kinetykę tworzenia jego wodnych adduktów	135
16.2. Wodne kompleksy 5-CQA-OH	136
17. Wnioski.....	143
LITERATURA.....	146
SPIS RYSUNKÓW	169
SPIS TABEL	176
STRESZCZENIE	178
ABSTRACT	180
DOROBK NAUKOWY.....	182

WSTĘP

Związki pochodzenia roślinnego to jedna z najważniejszych grup substancji wpływających na funkcjonowanie człowieka. Węglowodany, tłuszcze, aminokwasy i białka, określane bardzo często jako pierwotne metabolity roślinne [1], są podstawowymi składnikami odżywczymi w codziennej diecie. Wtórne metabolity roślinne, takie jak np. alkaloidy, polifenole oraz terpenoidy, których biosynteza jest związana przede wszystkim z reakcją roślin na czynniki stresogenne [2], od wieków są obiektem zainteresowań badaczy. Już na początku XIX wieku, kiedy po raz pierwszy dokonano izolacji morfiny z maku lekarskiego, zaobserwowano, że właściwości produktów roślinnych są ściśle związane z obecnością określonych substancji [3-6] będących właśnie wtórnymi metabolitami roślinnymi. Od tamtego czasu dokonano izolacji i identyfikacji tysięcy substancji pochodzenia roślinnego wykazujących aktywność biologiczną. Zainteresowanie związkami pochodzenia roślinnego uległo dalszemu spotęgowaniu na przełomie XX i XXI wieku [3-6]. Obecnie poszukiwanie nowych substancji o wysokiej aktywności biologicznej i innych pożądanых właściwościach jest uwarunkowane nie tylko perspektywą opracowania nowych preparatów leczniczych, lecz również poszukiwaniem substancji, które mogą być składnikami żywności funkcjonalnej [7], bądź też zastąpią otrzymywane syntetycznie barwniki oraz konserwanty [8].

Jedną z najbardziej istotnych grup substancji zaliczanych do wtórnych metabolitów roślinnych są polifenole. Powszechne występowanie w przyrodzie, niska toksyczność i szeroki zakres aktywności biologicznej sprawiają, że związki polifenolowe są obiektem zainteresowania przeciętnego człowieka, przemysłu oraz środowiska naukowego, a szczególnie lekarzy i dietetyków [9, 10]. Do najważniejszych grup związków polifenolowych zalicza się kwasy chlorogenowe, będące estrami kwasu chininowego i kwasu kawowego lub innych kwasów trans-cynamonowych. Głównym przedstawicielem tej grupy jest kwas 5-kawoilochinowy określany skrótowo jako 5-CQA. Sam 5-CQA, jak i inne kwasy chlorogenowe, posiada silne właściwości przeciwutleniające, działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe [9, 10]. Wykazano również, że 5-CQA może zmniejszać ryzyko wystąpienia wielu chorób [11]. Wymienione właściwości oraz powszechne występowanie 5-CQA w produktach spożywczych sprawiają, że związek ten cieszy się rosnącym zainteresowaniem świata nauki. Niniejsze opracowanie stanowi dowód, że wiele jego właściwości nie zostało jeszcze poznanych.

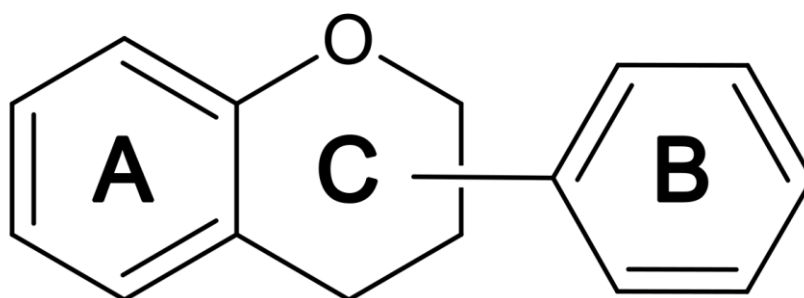
CZEŚĆ LITERATUROWA

1. Polifenole – ogólna charakterystyka

Termin polifenole, a właściwie polifenole roślinne, pojawił się w literaturze po raz pierwszy w drugiej połowie XX wieku. Definicja zaproponowana przez Bate'a, Smith'a, Swain'a oraz White'a i następnie rozszerzona przez Hasłama określa polifenole jako związki fenolowe rozpuszczalne w wodzie o masie cząsteczkowej z zakresu od 500 do 4000 Da, zawierające od 12 do 16 grup hydroksylowych, z 5-7 pierścieniami aromatycznymi na 1000 Da masy oraz wykazujące zdolność do strącania białek i niektórych alkaloidów [12, 13]. Taka definicja obejmuje przede wszystkim taniny, powstające w wyniku kondensacji niskocząsteczkowych związków fenolowych, które były przedmiotem licznych badań m.in. ze względu na ich wykorzystanie w roli garbników [12]. Obecnie terminem polifenoli określa się również liczne związki fenolowe o znacznie mniejszych masach cząsteczkowych, które zawierają przynajmniej jedną grupę fenolową [12, 14].

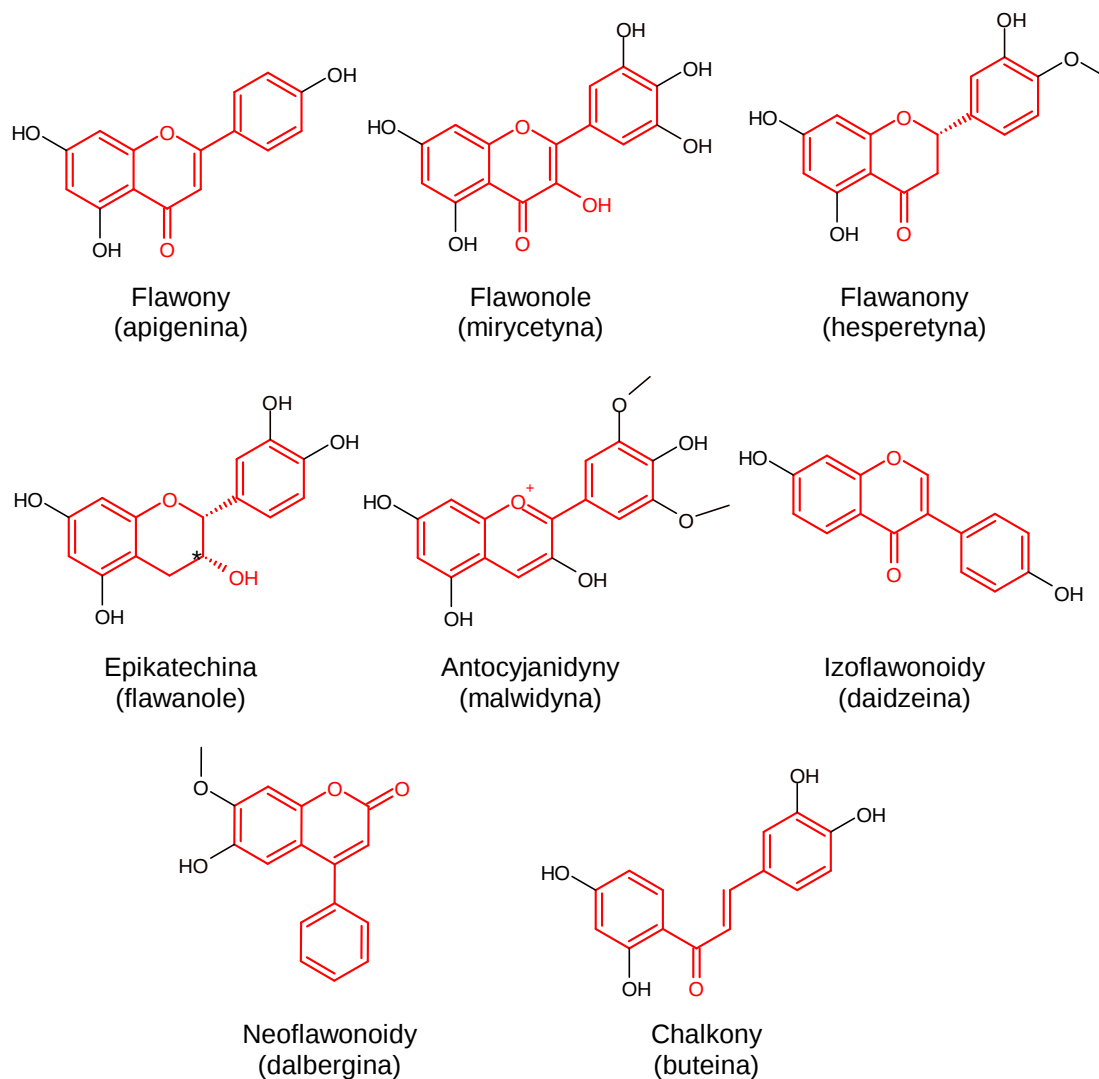
1.1. Budowa i podział polifenoli

Polifenole stanowią wyjątkowo zróżnicowaną grupę związków. Ze względu na budowę można je podzielić na flawonoidy oraz nie flawonoidy [15]. Podstawowym elementem struktury flawonoidów jest układ dwóch pierścieni fenyłowych (oznaczanych jako pierścienie A oraz B) połączonych ze sobą za pomocą pierścienia heterocyklicznego zawierającego atom tlenu (oznaczany jako pierścień C) (patrz rys. 1) [16, 17].

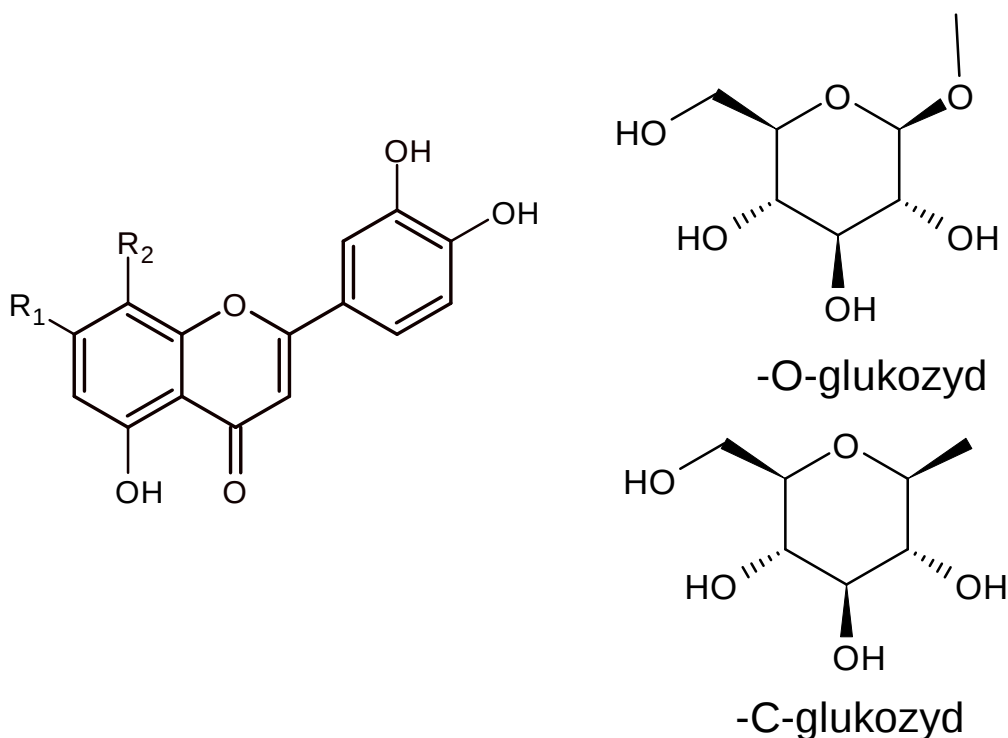


Rys. 1. Podstawowy szkielet flawonoidów z oznaczeniem poszczególnych pierścieni jakie powszechnie stosuje się w literaturze.

Poszczególne flawonoidy różnią się ilością grup hydroksylowych lub metoksyłowych przyłączonych do wymienionych pierścieni, miejscem przyłączenia pierścienia „B” oraz strukturą pierścienia „C” (patrz rys. 2). Flawonoidy można podzielić na następujące grupy: flawony, flawonole, flawanony, flawanole (katechiny), antocyjanidyny, izoflawonoidy oraz neoflawonoidy [16, 17]. Do flawonoidów zalicza się również chalkony, które nie posiadają pierścienia „C” [18]. Dosyć powszechną modyfikacją struktur flawonoidów jest ich



Rys. 2. Najważniejsze grupy flawonoidów.
(Elementy strukturalne charakterystyczne dla poszczególnych grup flawonoidów zaznaczono kolorem czerwonym. Centrum chiralne oznaczone w strukturze flawanoli gwiazdką może przyjmować zarówno konfigurację R, jak i S).



Luteolina: $R_1 = -OH$ $R_2 = -H$

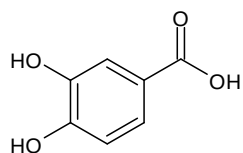
Cynarozyd: $R_1 = -O-Glu$ $R_2 = -H$

Orientyna: $R_1 = -OH$ $R_2 = -C-Glu$

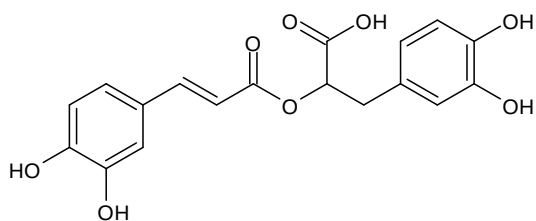
Rys. 3. Luteolina i jej -O- i -C-glikozydy (cynarozyd i orientyna) jako przykład aglikonowej oraz glikozydowej formy flawonoidów.

glikozylacja, która wiąże się z utworzeniem wiązań -O-glikozydowych lub -C-glikozydowych z formą aglikonową danego flawonoidu (patrz rys. 3) [19, 20].

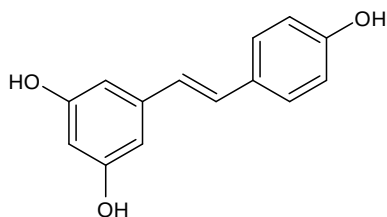
Do nie flawonoidów należą kwasy fenolowe, stilbeny, lignany oraz taniny (patrz rys. 4) [15, 21-23]. Kwasy fenolowe są hydroksylowymi pochodnymi kwasu benzoowego lub kwasu trans-cynamonowego, natomiast stilbeny są hydroksylowymi pochodnymi stilbenu. W przeciwieństwie do większości wymienionych grup polifenoli, lignany oraz taniny są związkami o bardziej złożonej budowie. Lignany są substancjami powstającymi w wyniku oksydacyjnego sprzęgania pochodnych alkoholu cynamonowego [12]. Taniny zaś, będące związkami o charakterze oligomerycznym lub polimerycznym, powstają poprzez oksydacyjne sprzęganie lub estryfikację [12, 13]. Monomerami, z których powstają taniny są flawonoidy, kwasy fenolowe oraz cukry proste.



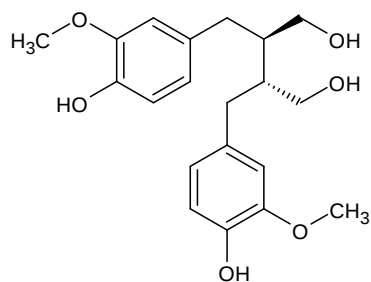
Kwas gallusowy
(Kwasy fenolowe)



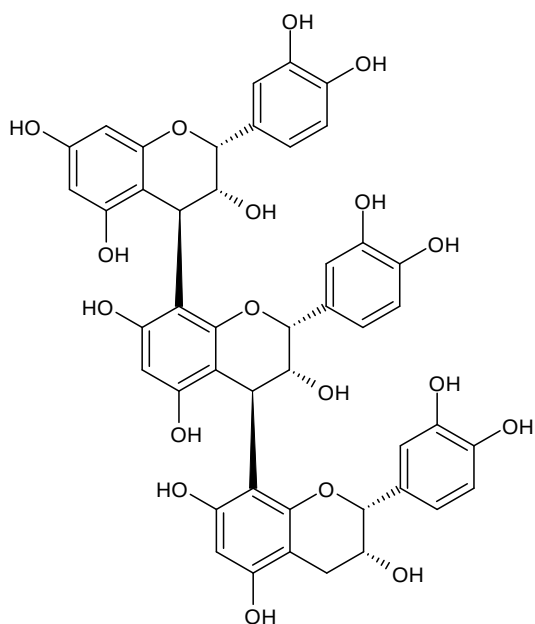
Kwas rozmarynowy
(Kwasy fenolowe)



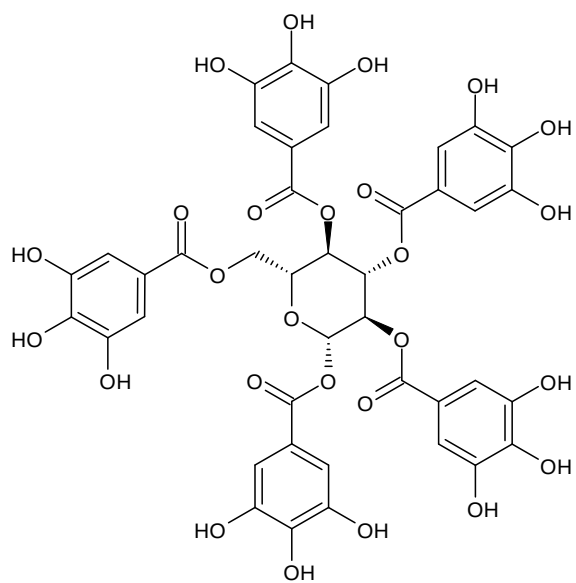
Trans-resweratol
(Stilbeny)



Sekoizolaricirezinol
(Lignany)



Procyjanidyna C1
(Taniny)



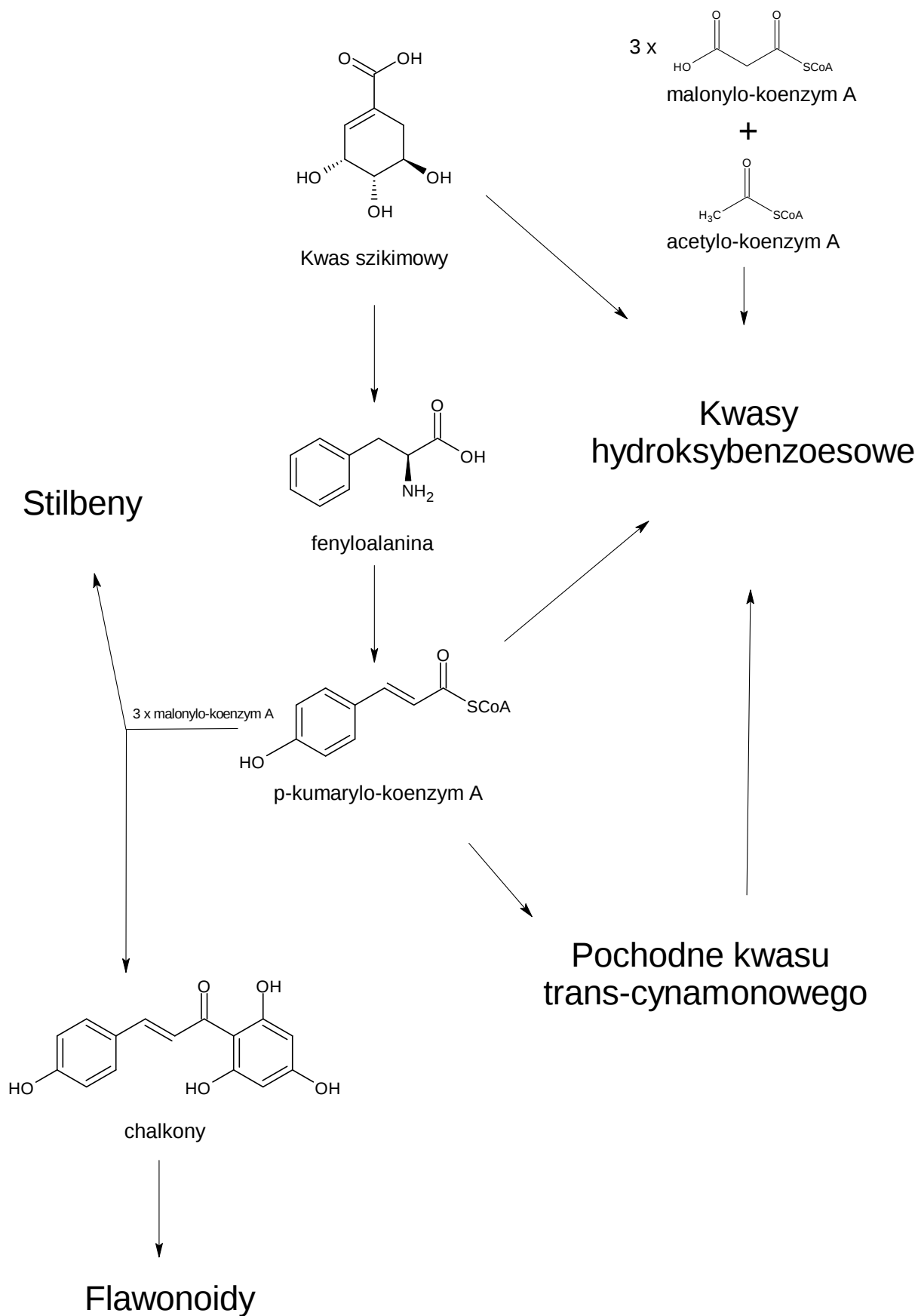
Penta-O-galoillo- β -D-glukoza
(Taniny)

Rys. 4. Przykładowe związki należące do poszczególnych grup polifenoli nieflawonoidowych.

1.2. Biosynteza polifenoli

Biosynteza polifenoli zachodzi w ramach szlaku fenylopropanoidowego lub szlaku fenylopropanoidowo-octowego [1, 15]. Podstawowymi prekursorami w tych szlakach są kwas szikimowy oraz malonylo-koenzym A [24]. Początkowe etapy biosyntezy większości polifenoli zachodzą zgodnie z następującym schematem (patrz rys. 5): kwas szikimowy jest przekształcany do fenyloalaniny lub w przypadku niektórych roślin do tyrozyny, które następnie są transformowane do para-kumarylo-koenzymu A (tioestru koenzymu A z kwasem para-kumarowym) [25, 26]. Dalszy przebieg syntezy poszczególnych grup polifenoli jest już zróżnicowany. Do powstania odpowiedniego szkieletu flawonoidów oraz stilbenów niezbędne jest utworzenie kolejnego pierścienia aromatycznego. W jego syntezie biorą udział cząsteczki malonylo-koenzymu A. W wyniku przyłączenia trzech cząsteczek malonylo-koenzymu A do grupy karbonylowej fragmentu fenylopropanoidowego powstaje łańcuch tetraketydowy, który w wyniku cyklizacji zostaje przekształcony w pierścień aromatyczny [27]. Na skutek takich przekształceń powstają chalkony [18]. Biosynteza stilbenów zachodzi w analogiczny sposób. Cyklizacja chalkonów, tzn. reakcja wiązania alkenowego z jedną z fenolowych grup -OH prowadzi do powstania pierścienia chromenowego i tym samym utworzenia układu pierścieni typowego dla flawonoidów [27]. Opisane reakcje są najważniejszymi elementami szlaku fenylopropanoidowo-octowego.

Kwasy fenolowe będące hydoksypochodnymi kwasu trans-cynamonowego powstają na skutek reakcji należących do szlaku fenylopropanoidowego. Składają się na niego przekształcenia tytułowego fragmentu strukturalnego w trakcie których następuje przyłączenie lub odłączenie grup hydroksylowych, bądź też grup metoksyłowych [10, 28]. Synteza kwasów hydroksybenzoesowych przebiega w sposób odmienny niż w przypadku bardziej złożonych polifenoli. Istnieją dwie drogi syntezy tych kwasów (patrz rys. 5) [29]. W pierwszej z nich substancją wyjściową jest kwas szikimowy lub jego metabolity takie jak kwasy trans-cynamonowe. Kwas szikimowy ulega szeregowi enzymatycznych reakcji dehydrogenacji, co prowadzi do powstania pierścienia aromatycznego z przyłączonymi grupami -OH [30, 31]. Transformacja kwasów trans-cynamonowych opiera się o beta-oksydację fragmentu propionoidowego skutkującą utworzeniem grupy karboksylowej



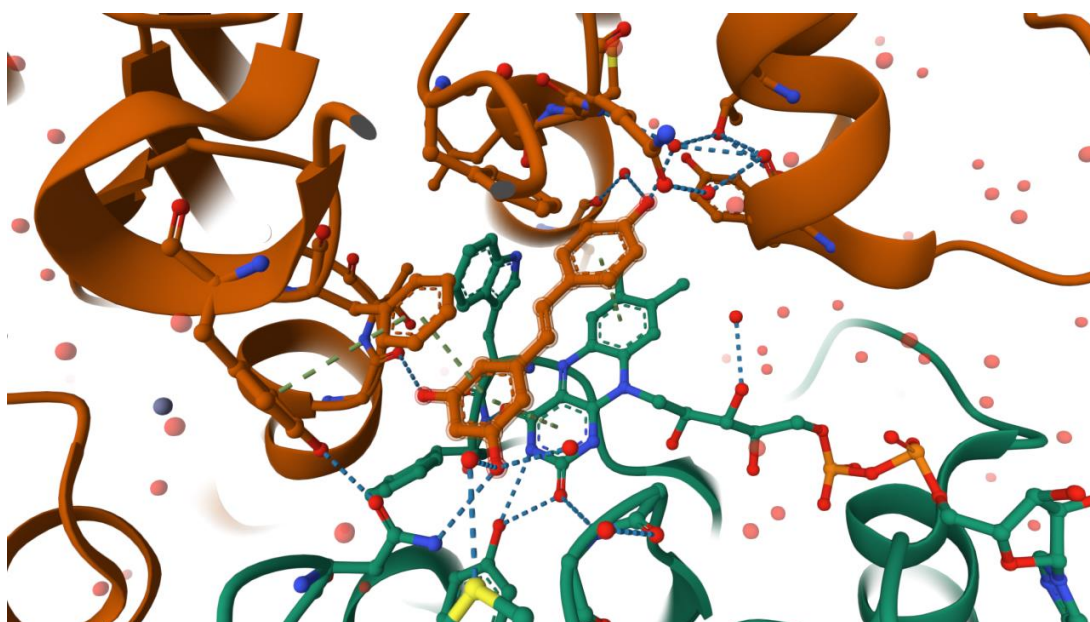
Rys. 5. Uproszczony schemat biosyntezy poszczególnych grup polifenoli.

przyłączonej do pierścienia aromatycznego [32]. Druga ścieżka biosyntezy kwasów hydroksybenzoesowych wykorzystuje acetylo-koenzym A oraz malonylo-koenzym A do utworzenia pierścienia aromatycznego w szeregu reakcji przebiegających w analogiczny sposób do procesu powstawania pierścienia „A” w przypadku flawonoidów oraz chalkonów [29].

1.3. Właściwości chemiczne oraz aktywność biologiczna polifenoli w zarysie

Właściwości chemiczne oraz wysoka aktywność biologiczna polifenoli wynikają w dużej mierze z obecności licznych grup fenolowych zawartych w strukturze tych związków. Mogą one pełnić zarówno rolę donora, jak i akceptora przy tworzeniu wiązań wodorowych. W przypadku występowania kilku grup hydroksylowych położonych w nieodległych pozycjach w cząsteczce związku, np. w pozycji orto względem siebie, są one zdolne do chelatowania jonów metali [12]. Obecność grup hydroksylowych ma również istotny wpływ na rozkład gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym. Elektronodonorowy charakter grupy -OH powoduje zwiększenie gęstości elektronowej nad płaszczyzną pierścienia aromatycznego, co przekłada się na możliwość występowania specyficznych oddziaływań π - π z innymi związkami zawierającymi grupy aromatyczne, oddziaływań π -kation oraz oddziaływań elektronów π z atomami wodoru zdolnymi do tworzenia wiązań wodorowych [33]. Wymienione właściwości polifenoli sprawiają, że mogą one tworzyć liczne oddziaływania ze związkami o małych masach cząsteczkowych [34-36], jak również z makromolekułami [37-42], czego przejawem jest wysoka aktywność biologiczna polifenoli. Przykładem powyższych oddziaływań może być przedstawiony na rys. 6 kompleks trans-resweratrolu z reduktazą chinonową [37].

Inną istotną cechą znacznej części związków polifenolowych jest ich silne działanie przeciwutleniające. Przeciwutleniacze są substancjami zdolnymi do neutralizacji wolnych rodników lub spowolnienia reakcji z ich udziałem [43]. Istotnymi przykładami wolnych rodników są: rodnik hydroksylowy ($\text{OH}^\bullet$), rodnik ponadtlenkowy ($\text{HO}_2^\bullet$), rodniki alkoksylowe ($\text{RO}^\bullet$) oraz rodniki peroksyłowe ($\text{ROO}^\bullet$) [44]. Chociaż wymienione rodniki mają znaczenie w regulacji funkcjonowania organizmów [45, 46], ich nadmierne ilości mają negatywny wpływ ze względu na ich wysoką reaktywność powodującą uszkodzenia biomolekuł, np. białek, kwasów nukleinowych lub lipidów [47-49] oraz degradację substancji o małych masach cząsteczkowych będących składnikami produktów spożywczych i kosmetycznych



Rys. 6. Struktura krystalograficzna kompleksu złożonego z trans-resweratrolu, dinukleotydu flawinoadeninowego oraz reduktazy chinonowej typu drugiego (enzymu uczestniczącego w redukcji szkodliwego wpływu chinonów na ludzki organizm). Liniami przerywanymi zaznaczono najważniejsze oddziaływania trans-resweratrolu. Struktura z bazy PDB: 1SG0 [37].

[50]. Neutralizacja wolnych rodników przez polifenole może odbywać się według następujących mechanizmów [51-53]: przeniesienia atomu wodoru HAT (ang. *hydrogen atom transfer*) (równanie 1), przeniesienia protonu poprzedzonego transferem elektronu ET-PT (ang. *electron transfer – proton transfer*) (równania 2, 3) lub przeniesienia elektronu poprzedzonego deprotonacją SPLET (ang. *Sequential proton loss – electron transfer*) (równania 4, 5, 6).



Udział poszczególnych mechanizmów przeciwutleniającego działania polifenoli zależy od właściwości tych ostatnich oraz środowiska reakcji [54, 55]. Efekt końcowy każdej z wymienionych ścieżek jest podobny. Następuje neutralizacja wolnego rodnika, tzn. jego przekształcenie do związku, w którym wszystkie elektrony są sparowane oraz przekształcenie

związku polifenolowego do postaci rodnikowej. Niskie wartości energii dysocjacji wiązań O-H oraz niskie wartości potencjałów jonizacji polifenoli sprawiają, że już nawet w przypadku niskich stężeń będą one wykazywały istotne działanie przeciwutleniające [54, 55]. Ponadto, dzięki obecności pierścieni aromatycznych oraz innych fragmentów nienasyconych rodniki polifenolowe są stabilne i nie ulegają dalszym reakcjom, w wyniku których mogłyby powstawać kolejne rodniki [54, 55].

Związki polifenolowe posiadają również zdolność do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego. Obecne w nich grupy aromatyczne odpowiadają za zdolność pochłaniania promieniowania ultrafioletowego, przy czym pozycja oraz intensywność pasm absorpcyjnych w tym zakresie jest zróżnicowana w poszczególnych grupach polifenoli [56-58]. Antocyjanidyny, antocyjany oraz kompleksy polifenoli z jonami metali wykazują absorpcję w obszarze promieniowania widzialnego [59, 60].

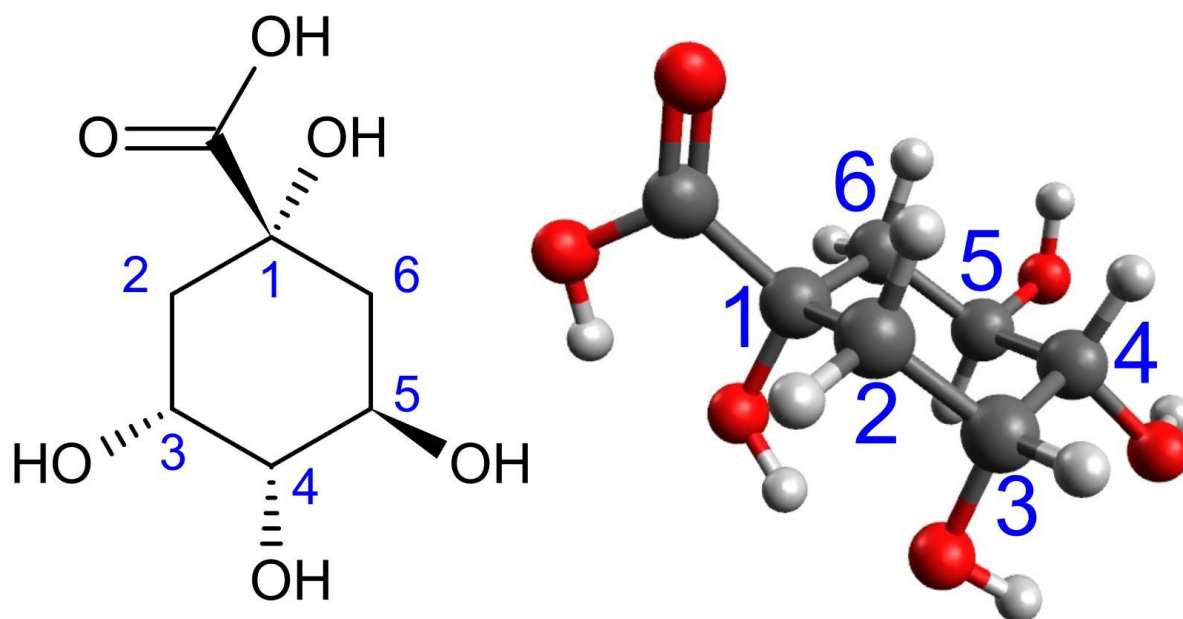
2. Kwasy chlorogenowe – ogólna charakterystyka

Kwasy chlorogenowe są jedną z najważniejszych grup polifenoli roślinnych. Chociaż pierwsze doniesienia na temat kwasu 5-kawoiloichinonowego pojawiły się już w XIX wieku, to znaczący wzrost zainteresowania kwasami chlorogenowymi nastąpił dopiero w okresie ostatnich dwóch dekad [61]. Do omawianej grupy należy już około 300 związków [61, 62]. Cechuje je powszechne występowanie w produktach roślinnych i produktach spożywczych oraz wysoka aktywność biologiczna. Właściwości te sprawiają, że kwasy chlorogenowe są istotnymi składnikami diety mającymi wpływ na zdrowie oraz wskazują na możliwość ich wykorzystania w leczeniu wielu schorzeń [61-63].

2.1. Budowa kwasów chlorogenowych

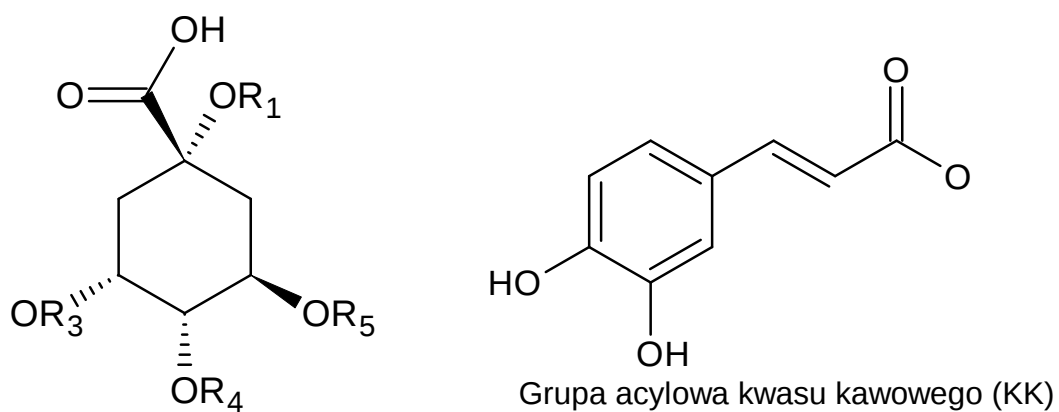
Do rodziny kwasów chlorogenowych zalicza się estry powstające pomiędzy kwasem chinowym oraz jedną, dwiema lub trzema cząsteczkami kwasu trans-cynamonowego lub jego pochodnymi [61-63]. Kwas chinowy, będący pochodną kwasu szikimowego, posiada cztery grupy hydroksylowe. Kwasami fenolowymi, które najczęściej tworzą wiązania estrowe z tymi grupami są kwas trans-cynamonowy, kwas para-kumarowy, kwas ferulowy oraz kwas kawowy [63].

Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej z 1976 roku, w przypadku izomeru 1-L-(-) kwasu chinowego będącego izomerem tworzącym większość kwasów chlorogenowych, przyjmuje się numerację atomów węgla w pierścieniu cykloalkilowym, według której atomy węgla z ekwatorialnymi grupami hydroksylowymi są oznaczane numerami 4 i 5, a atom węgla z aksjalną grupą -OH numerem 3 (patrz rys. 7) [64]. Przytoczone zalecenia określają jednocześnie zasady nazewnictwa kwasów chlorogenowych. Przykładowo, kwas chlorogenowy powstający w wyniku reakcji pomiędzy grupą hydroksylową przyłączoną do atomu węgla nr 3 kwasu chinowego oraz kwasem ferulowym określany jest jako kwas 3-feruloiloichinowy, a w przypadku analogicznego połączenia z grupą -OH z atomu węgla nr 5 otrzymywany jest kwas 5-feruloiloichinowy. Pomimo wyżej wymienionych zaleceń co do nazewnictwa cyklotoli i ich pochodnych, we współczesnej literaturze ciągle spotyka się archaiczną numerację atomów węgla nr 3 i 5, co często wywołuje nieporozumienia związane z rozróżnieniem poszczególnych izomerów kwasów chlorogenowych [62].



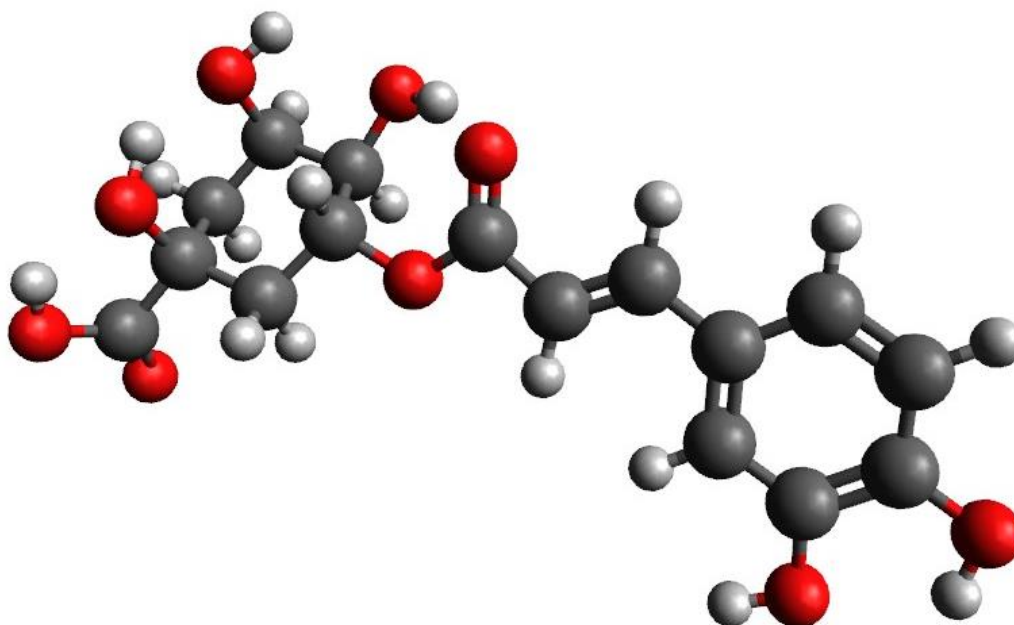
Rys. 7. Struktura kwasu 1-L-(-)-chinowego.
Numery atomów węgla zgodne z zaleceniami IUPAC z 1976 roku.

Spośród ponad 300 odkrytych kwasów chlorogenowych największym zainteresowaniem cieszą się estry powstające pomiędzy kwasem chinowym oraz kwasem kawowym. Do kwasów kawoilochinowych (CQA, ang. *caffeoylquinic acid*) zalicza się kwas 3-kawoilochinowy (3-CQA) – określany potocznie jako kwas neochlorogenowy, kwas 4-kawoilochinowy (4-CQA), kwas 5-kawoilochinowy (5-CQA), kwas 3,4-dikawoilochinowy (3,4-diCQA, ang. *3,4-dicaffeoylquinic acid*), kwas 3,5-dikawoilochinowy (3,5-diCQA), kwas 4,5-dikawoilochinowy (4,5-diCQA) oraz kwas 1,3-dikawoilochinowy (1,3-diCQA) nazywany potocznie cynaryną [61-63]. Ich struktury prezentuje rys. 8. Najbardziej rozpowszechnionym spośród omawianej grupy jest kwas 5-kawoilochinowy, który bardzo często określa się po prostu jako kwas chlorogenowy (patrz rys. 9).



3-CQA:	R ₁ =-H	R ₃ =-KK	R ₄ =-H	R ₅ =-H
4-CQA:	R ₁ =-H	R ₃ =-H	R ₄ =-KK	R ₅ =-H
5-CQA:	R ₁ =-H	R ₃ =-H	R ₄ =-H	R ₅ =-KK
3,4-CQA:	R ₁ =-H	R ₃ =-KK	R ₄ =-KK	R ₅ =-H
3,5-CQA:	R ₁ =-H	R ₃ =-KK	R ₄ =-H	R ₅ =-KK
4,5-CQA:	R ₁ =-H	R ₃ =-H	R ₄ =-KK	R ₅ =-KK
1,3-CQA:	R ₁ =-KK	R ₃ =-KK	R ₄ =-H	R ₅ =-H

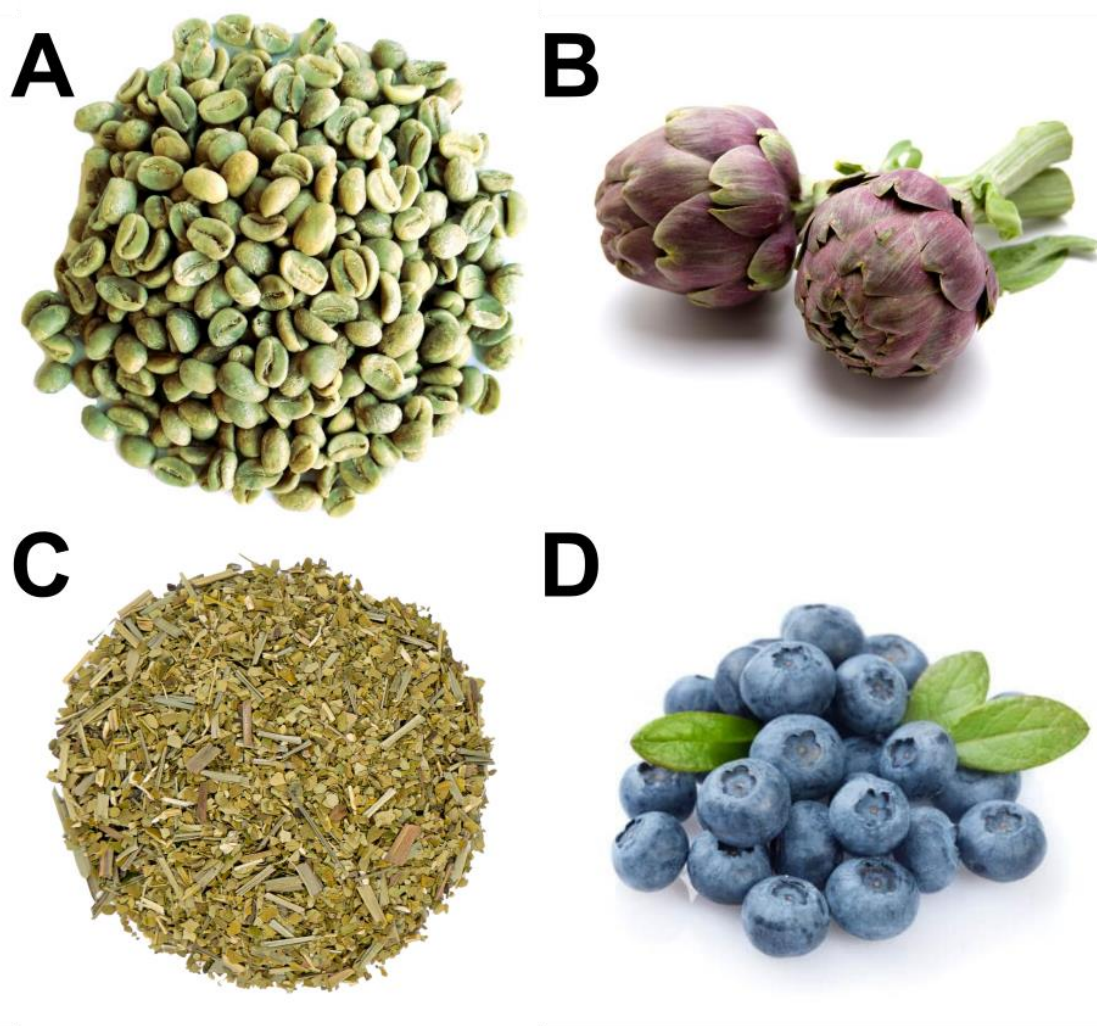
Rys. 8. Struktury najważniejszych kwasów chlorogenowych będących estrami kwasu chinowego i kwasu kawowego.



Rys. 9. Przykładowa konformacja 5-CQA.

2.2. Występowanie kwasów chlorogenowych

Jednym z najważniejszych źródeł kwasów chlorogenowych jest kawa. Zawartość kwasów chlorogenowych w ziarnach zielonej kawy z gatunków *Coffea arabica* L. oraz *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, dwóch najważniejszych gatunków wykorzystywanych komercyjnie, wynosi od 3 do 14 % ich suchej masy [65-69]. Należy jednocześnie zauważyć, że pozostałe części owoców kawy, np. łuski owoców kawy oraz pulpa kawowa, które są odpadami przy produkcji kawy mogą zawierać do 2.6 % kwasów chlorogenowych [70, 71]. Kwasy kawoilochinowe, feruilochinowe oraz dikawoilochinowe są głównymi przedstawicielami kwasów chlorogenowych w zielonej kawie, przy czym 5-CQA stanowi zazwyczaj przeważającą część ich całkowitej zawartości. Prażenie ziaren kawy powoduje



Rys. 10. Najważniejsze źródła kwasów chlorogenowych:
(A) ziarna zielonej kawy, (B) kwiatostany karczocha, (C) zmielone liście i łodygi
ostrokrzewu paragwajskiego (Yerba mate), (D) owoce borówki wysokiej.

spadek zawartości kwasów chlorogenowych, który w dużej mierze zależy od temperatury oraz czasu prowadzenia procesu, a w przypadkach bardzo intensywnego prażenia, np. w stylu wiedeńskim lub francuskim, może powodować obniżenie zawartości kwasów chlorogenowych do ilości poniżej 1 % masy przetworzonego ziarna [66, 68, 72]. W filiżance kawy, zawierającej 200 mL naparu z prażonych ziaren, może znajdować się od 27 mg do 625 mg kwasów chlorogenowych, gdzie 5-CQA wciąż występuje w najwyższych ilościach. Warto jednak dodać, że całkowita ilość pozostałych kwasów chlorogenowych jest porównywalna do zawartości kwasu 5-kawoilochoinowego [66, 73-76].

Do roślin oraz produktów spożywczych bogatych w kwasy chlorogenowe można także zaliczyć karczoch oraz yerba mate. Kwasy kawoilochoinowe odpowiadają za około 8 % suchej masy karczocha (*Cynara scolymus* L.) we wczesnych etapach dojrzewania, natomiast w kolejnych stadiach rozwoju ich zawartość maleje do poziomu poniżej 1 % [77-79]. Kwas 5-kawoilochoinowy oraz 1,5-dikawoilochoinowy odpowiadają za ponad 50 % całkowitej zawartości kwasów chlorogenowych w kwiatostanach oraz innych częściach karczocha. Zawartość cynaryny uważanej za istotny składnik aktywny karczocha nie przekracza 1.5 % całkowitej zawartości kwasów chlorogenowych [77, 78]. Kwas 1,3-dikawoilochoinowy jest jednak głównym kwasem kawoilochoinowy w soku uzyskiwanym z karczocha, w którym jego stężenie wynosi ok. 529.5 mg/L [78]. Kwasy chlorogenowe są również obecne w innych roślinach z rodziny astrowatych, do której należy karczoch, np. w jeżówce purpurowej (*Echinacea purpurea* L. Moench), krwawniku pospolitym (*Achillea millefolium* L.), podbiale pospolitym (*Tussilago farfara* L.), ostropestie plamistym (*Silybum marianum* L. Gaertner) oraz rumianku (*Matricaria chamomilla* L.) [63, 80, 81]. Yerba mate powstająca z wysuszonych liści oraz łodyg ostrokrzewu paragwajskiego (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil) zawiera znaczne ilości 5-CQA oraz kwasów dikawoilochoinowych [82, 83]. Całkowita ilość kwasów chlorogenowych w świeżo zebranych liściach i łodygach ostrokrzewu paragwajskiego wynosi odpowiednio od 45.8 do 80.8 g/kg oraz od 31.6 do 78.9 g/kg [84]. Zawartość kwasów kawoilochoinowych w naparach przygotowywanych z Yerba mate silnie zależy od sposobu ich przygotowania, przy czym wykazano, że warunki zalecane przez producentów nie zapewniają wyczerpującej ekstrakcji kwasów chlorogenowych, w szczególności kwasów dikawoilochoinowych [85]. W przypadku komercyjnych Yerba mate sprzedawanych w Brazylii maksymalną wydajność ekstrakcji kwasów chlorogenowych podczas parzenia otrzymano poddając 2 gramy Yerba mate działaniu wody o temperaturze 95°C przez 16 minut [85]. Jedna porcja naparu (200 lub 300 mL) z Yerba mate może zawierać od 17.62 do 52.90 mg kwasów chlorogenowych, spośród których największy udział mają typowo

3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA i 3-CQA, natomiast 4-CQA, 5-CQA oraz kwasy feruloilochinowe obecne są w znacznie mniejszych ilościach [85-88].

Kwasy chlorogenowe będące wtórnymi metabolitami roślinnymi występują też w innych roślinach i produktach przemysłu spożywczego. Jednym z istotnych przykładów są jabłka zawierające przede wszystkim 5-CQA oraz mniejsze ilości kwasu 4-para-kumaroilochinowego. Deserowe odmiany jabłek zawierają od 1.60 do 43.00 mg 5-CQA w 100 gramach, ze średnią zawartością 5-CQA wynoszącą 13.37 mg/100 g [89]. Odmiany jabłek przeznaczone do produkcji cydru zawierają większe ilości 5-CQA, od 15.84 mg do 400.58 mg na 100 gramów [90]. Innymi przykładami owoców jabłkowatych zawierających kwasy chlorogenowe są owoce gruszy (*Pyrus* L.), aronii (*Aronia* Medik.) oraz pigwy pospolitej (*Cydonia oblonga* Mill.) [80].

Wysoka zawartość kwasów chlorogenowych została również zaobserwowana w roślinach z rodziny borówkowatych. Zarówno borówka wysoka (*Vaccinium corymbosum* L.) oraz niska (*Vaccinium angustifolium* Aiton), czyli gatunki borówek wykorzystywane komercyjnie pochodzące z Ameryki północnej, jak również borówka czarna (*Vaccinium myrtillus* L.) mająca ogromny wkład w kształtowanie roślinności leśnej, są ważnymi źródłami kwasów chlorogenowych [91, 92]. Owoce każdego z wymienionych gatunków zawierają 5-CQA oraz niewielkie ilości innych kwasów fenolowych. Zawartość 5-CQA w jagodach borówki wysokiej wynosi od 20.1 do 157.6 mg w 100 gramach [92-96], natomiast w przypadku owoców borówki niskiej, gatunku o mniejszym znaczeniu komercyjnym – 100 g świeżych owoców zawiera od 58.9 do 110.0 mg 5-CQA [92, 97]. Kolejnymi przykładami roślin zawierających kwasy chlorogenowe są śliwa domowa oraz ziemniaki. W skórce oraz miąższu owoców śliwy domowej stwierdzono obecność 3-, 4- oraz 5-CQA, przy czym dominującym w przypadku większości odmian kwasem chlorogenowym jest zazwyczaj pierwszy z nich - zawartość kwasu 3-kawoiloilochinowego w owocach waha się od 85 do 1300 mg na kilogram suchej masy [98]. Bulwy ziemniaków pochodzące od odmian o białym oraz żółtym miąższu zawierają od 73 mg do prawie 300 mg 5-CQA w przeliczeniu na jeden kilogram świeżej masy [99, 100]. W przypadku odmian charakteryzujących się purpurowym oraz czerwonym miąższem bulw, zyskujących coraz większą popularność ze względu na swoje walory organoleptyczne oraz ze względu na potencjalny korzystny wpływ na zdrowie, zawartość 5-CQA w bulwach jest typowo kilka razy wyższa niż w „tradycyjnych” odmianach i przy korzystnych warunkach uprawy w jednym kilogramie może być obecny prawie 1 gram 5-CQA [99, 100]. W przypadku wszystkich odmian ziemniaków najwyższymi stężeniami 5-CQA charakteryzują się ich skórki.

Niewielkie ilości kwasów chlorogenowych wykryto również w organizmach niebędących roślinami wyższymi. Nieliczne gatunki mikroalg oraz cyjanobakterii są zdolne do biosyntezy 5-CQA przy udziale ścieżek syntezy analogicznych do tych zaobserwowanych w roślinach [101-103].

2.3. Znaczenie kwasów chlorogenowych w przyrodzie

Obecność związków polifenolowych (w tym również kwasów chlorogenowych) w roślinach jest ściśle powiązana z warunkami ich funkcjonowania. Obecność tych związków jest odpowiedzią na ekspozycję na promieniowanie UV, wpływ patogenów, zagrożenie ze strony roślinożerców, wahania temperatury oraz zmienną zawartość wody i innych składników odżywczych [104-107]. Działanie wymienionych czynników prawdopodobnie było powodem ewolucji szlaku fenylopropanoidowego oraz szlaku fenylopropanoidowo-octowego umożliwiającej skuteczną biosyntezę oraz akumulację polifenoli [1]. Liczne badania wykazują, że na skutek działania wymienionych czynników rośnie ekspresja genów kodujących enzymy kluczowe dla szlaku fenylopropanoidowego, co przekłada się na wzrost zawartości kwasów chlorogenowych w tkankach roślinnych [104-107].

2.4. Aktywność biologiczna kwasów chlorogenowych

Kwasy chlorogenowe, podobnie jak inne związki polifenolowe, cechuje szeroka gama właściwości istotnych dla funkcjonowania organizmu – mają właściwości przeciwutleniające [108], wykazują działanie przeciwzapalne [109], przeciwbakteryjne [110] oraz zmniejszają ryzyko wystąpienia wielu chorób [111]. Należy w tym miejscu zauważyć, że aktywność przeciwutleniająca oraz przeciwzapalna są bardzo często łączone z innymi, wyżej wymienionymi formami aktywności kwasów chlorogenowych [109, 112]. Silne działanie przeciwutleniające kwasów chlorogenowych wynika z obecności grupy lub grup katecholowych w strukturze tych związków [113]. Badania *in vitro* kwasów monokawoilochoinowych oraz dikawoilochoinowych wykazały, że mają one zdolność do neutralizacji reaktywnych form tlenu oraz rodników organicznych, np. 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) diamonu (ABTS) i 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) [114-116]. Aktywność przeciwutleniająca poszczególnych izomerów kwasów kawoilochoinowych maleje zgodnie z następującą kolejnością [116]:



Wyniki testów *in vitro* pokazują również, że 5-CQA chroni DNA przed działaniem nadtlenu wodoru, co może zmniejszać ryzyko wystąpienia zmian mutagennych oraz zahamować indukowane obecnością jonów miedzi utlenianie lipidów w lipoproteinach o niskiej gęstości (LDL, ang. *low density lipoproteins*) [116, 117]. Ten ostatni proces jest jednym z czynników zwiększających prawdopodobieństwo wystąpienia zmian miażdżycowych w organizmie. Badania z wykorzystaniem linii modelowych komórek oraz zwierząt laboratoryjnych wskazują, że 5-CQA redukuje skutki wystąpienia stresu oksydacyjnego wywołanego czynnikami chemicznymi oraz promieniowaniem UV (np. zmniejszenie stężeń naturalnych przeciwutleniaczy – witamin C i A) oraz zwiększa ekspresję i aktywność enzymów uczestniczących w metabolizmie wolnych rodników [118, 119]. Działanie przeciwzapalne 5-CQA polega na regulowaniu szlaków sygnałowych, np. szlaku jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-κB, ang. *nuclear factor kappa B*) [120, 121], szlaku kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*) [121] oraz szlaku cyklooksygenazy (COX, ang. *Cyclooxygenase*) [122], w przypadku których ich niepoprawne funkcjonowanie przyczynia się między innymi do występowania długotrwałych stanów zapalnych oraz zwiększa ryzyko wystąpienia zmian onkologicznych, chorób naczyniowo-sercowych i autoimmunologicznych [122-125].

Jednym z głównych powodów niemalejącego zainteresowania kwasami chlorogenowymi, w szczególności kwasem 5-kawoilochinowym, jest ich zdolność do modulowania metabolizmu lipidów, co może przekładać się na ich potencjalny wpływ na regulację masy ciała, rozwój niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby oraz rozwój chorób sercowo-naczyniowych [11]. Do podstawowych sposobów leczenia otyłości można zaliczyć inhibicję działania lipazy trzustkowej odpowiedzialnej za przekształcenie trójglicerydów do kwasów tłuszczowych oraz monoglicerydów, które mogą zostać wchłonięte w jelitach [126]. Kwasy dikawoilo-, monokawoilo-, feruloilochinowe oraz ekstrakty z ziaren zielonej kawy wykazują zdolność do inhibicji wymienionego enzymu. 4,5-diCQA wykazuje najniższe IC₅₀ (stężenie hamujące aktywność w 50 %, ang. *half maximal inhibitory concentration*) spośród w/w związków (0.25 ± 0.03 mg/mL), natomiast określone w analogicznych badaniach *in vitro* IC₅₀ orlistatu, który jest wykorzystywany jako lek w leczeniu otyłości, zawiera się w zakresie 0.1-1 µg/mL [127-129]. Przedstawione wartości sugerują możliwość wykorzystania kwasów chlorogenowych w formie ekstraktów jako czynnika wspomagającego leczenie otyłości. Ekstrakty bogate w kwasy chlorogenowe hamują

również akumulację lipidów w adipocytach [130]. Badania z udziałem zwierząt wskazują, że kwasy chlorogenowe oraz ekstrakty z zielonej kawy obniżają zawartość trójglicerydów i cholesterolu w osoczu oraz w wątrobie, zmniejszają absorpcję lipidów w jelitach oraz zmniejszają aktywność wybranych enzymów związanych z występowaniem otyłości [131-134]. Efektem wypadkowym wymienionych zmian w metabolizmie jest widoczny spadek masy ciała zwierząt laboratoryjnych poddanych diecie wysokotłuszczowej. Badania kliniczne z udziałem pacjentów z nadwagą wykazały, że regularne spożywanie kawy wzbogaconej w kwasy chlorogenowe powoduje znaczny spadek masy ciała (średni spadek masy ciała wynosił 5.4 kg po 12 tygodniach) oraz przyczynia się do zmian wartości innych wskaźników antropometrycznych [135]. W przypadku pacjentów pijących kawę niewzbogaconą zaobserwowano mniejszy wpływ jej spożycia na masę ciała (spadek masy ciała nieprzekraczający 2 kg) oraz inne wskaźniki [136-138]. W tym miejscu należy podkreślić, że cytowane prace obejmowały próby przeprowadzane na niewielkich grupach pacjentów, co może istotnie wpływać na omawiane wyniki. Warto zauważyć, że inne badania z udziałem pacjentów spożywających napoje testowe zawierające kwasy chlorogenowe wskazują na ich znikomy wpływ na masę ciała [139, 140]. Tak więc, dalsze badania kliniczne oceniające wpływ kwasów chlorogenowych oraz zawierających je produktów na leczenie otyłości są niewątpliwie potrzebne w celu dokładnego poznania znaczenia kwasów chlorogenowych w tego typu terapiach.

Kolejną chorobą, w przypadku której rozważane jest wykorzystanie kwasów chlorogenowych oraz produktów bogatych w kwasy chlorogenowe jest cukrzyca typu drugiego. Patogeneza tej jednostki chorobowej obejmuje dwa efekty: zaburzenia sekrecji insuliny oraz postępującą oporność tkanek obwodowych na działanie insuliny, czego podstawowym objawem jest hiperglikemia [141]. Testy *in vitro* oraz testy z udziałem zwierząt laboratoryjnych pokazują, że kwasy chlorogenowe mogą przeciwdziałać insulinooporności tkanek [142, 143]. Kwasy chlorogenowe wykazują również zdolność do inhibicji enzymów związanych z rozkładem polisacharydów (i tym samym otrzymywaniem glukozy) takich jak α -amylaza, α -glukozydaza, β -glukozydaza oraz glukozo-6-fosfataza, co przekłada się na obniżenie poziomu glukozy we krwi [144, 145]. Mogą one także zapobiegać nieenzymatycznej glikacji białek, która jest ściśle powiązana z hiperglikemią [146]. Kwasy chlorogenowe przeciwdziałają szeregowi powikłań związanych z cukrzycą typu drugiego: retinopatii cukrzycowej, cukrzycowej chorobie nerek, neuropatii oraz powolnemu gojeniu się ran [147-150].

3. Izolacja wtórnych metabolitów z matryc roślinnych

Badania wtórnych metabolitów roślinnych z wykorzystaniem technik instrumentalnych lub wielu testów aktywności biologicznej wymagają ich wstępnej izolacji z matryc roślinnych, najczęściej na drodze ekstrakcji. Do klasycznych metod ekstrakcji zalicza się takie techniki jak maceracja, perkolacja, ekstrakcja pod chłodnicą zwrotną oraz ekstrakcja w aparacie Soxhleta. Ostatnie dekady były czasem rozwoju wielu innowacyjnych technik ekstrakcji, stosowanych również do izolacji wtórnych metabolitów roślinnych, np. przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikami, ekstrakcji nadkrytycznej, podkrytycznej ekstrakcji wodą, ekstrakcji enzymatycznej, ekstrakcji z wykorzystaniem dyspersji matrycy w fazie stałej [76, 151]. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na wyniki analiz instrumentalnych oraz testów aktywności biologicznej otrzymywanych ekstraktów jest wydajność izolacji wtórnych metabolitów z matryc roślinnych. Prowadzenie ekstrakcji w wysokiej temperaturze jest podstawowym sposobem na zwiększenie wydajności ekstrakcji [152, 153]. Dodatkowymi parametrami modyfikowanymi podczas optymalizacji ekstrakcji są pH (bardzo często osiągające skrajne wartości) oraz rodzaj i zawartość rozpuszczalników organicznych w ekstrahentach [152, 153].

Istotnym problemem pojawiającym się w trakcie ekstrakcji wielu wtórnych metabolitów roślinnych jest ich ograniczona stabilność w wysokiej temperaturze, w warunkach skrajnego pH oraz w obecności rozpuszczalników organicznych [152, 153]. Do takich substancji można między innymi zaliczyć: chininę [154], rutynę [155, 156], piperynę [157], betaninę [158], kwercetynę [159], kurkuminę [160-163] oraz kwasy chlorogenowe [164-171]. Zachodzące przemiany degradacyjne obniżają wydajność ekstrakcji i bardzo często prowadzą jednocześnie do powstawania nowych związków, które nie są pierwotnie obecne w badanym materiale roślinnym.

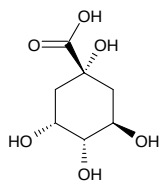
3.1. Degradacja kwasów chlorogenowych podczas ich ekstrakcji

Najczęściej wykorzystywanymi ekstrahentami do izolacji kwasów chlorogenowych z matryc roślinnych oraz produktów spożywczych są alkohole, ich mieszaniny z wodą oraz sama woda. Szczególnie interesujące jest zastosowanie wody do ekstrakcji tych kwasów ze względu na podobieństwo tego procesu do takich czynności życia codziennego jak parzenie kawy, herbaty czy też domowego lub przemysłowego przetwarzania substancji roślinnych zawierających kwasy chlorogenowe. Przeprowadzone dotychczas badania wykazują, że wykorzystanie wymienionych ekstrahentów może prowadzić do szeregu przemian

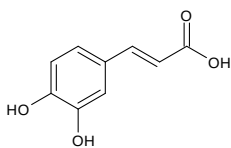
chemicznych izolowanych kwasów chlorogenowych, których rozległość zależy od temperatury ekstrakcji oraz rodzaju i pH ekstrahenta [164-171].

Badania modelowe symulujące proces wodnej ekstrakcji 5-CQA, pozostałych kwasów monokawoilochoinowych oraz kwasów dikawoilochoinowych wskazują, że w trakcie ekstrakcji zachodzą przemiany degradacyjne tych kwasów takie jak: hydroliza, transestryfikacja i izomeryzacja cis-trans [164, 170]. W przypadku np. wodnego ekstraktu 5-CQA stwierdza się w nim obecność kwasu kawowego, kwasu chininowego, izomerów 4- i 3-CQA oraz cis-5-CQA (patrz struktury 1-5 na rys. 11) [164]. Należy w tym miejscu jednak podkreślić, iż poza w/w produktami jego hydrolizy/transestryfikacji/izomeryzacji ekstrakty zawierają także dwie inne substancje, których masy cząsteczkowe są o 18 Da większe od masy 5-CQA. Różnica ta odpowiada masie cząsteczki wody [164]. Biorąc pod uwagę budowę kwasu chlorogenowego, tj. obecność podwójnego wiązania C=C sprzężonego z grupą karbonylową, zasugerowano, że omawiane substancje są hydroksylowymi pochodnymi 5-CQA powstającymi w wyniku addycji Michaela (patrz diastereoizomeryczne struktury 6 oraz 7 na rys. 11). Ich identyfikacja została oparta głównie o dane z wysokorozdzielczej spektrometrii mas, przy jednoczesnym braku istotnych różnic pomiędzy widmami MSⁿ otrzymanych pochodnych i 5-CQA [164]. Obecność analogicznych produktów przemian jak w przypadku 5-CQA, w tym również pochodnych o masie o 18 Da większej, które mogą być postrzegane jako wodne addukty obserwuje się również w przypadku ekstrakcji 3- i 4-CQA oraz kwasów dikawoilochoinowych [170, 171]. Należy zauważyć, że we wszystkich tych ekstraktach ilości związków o masie o 18 Da większej od masy 3-,4- i 5-CQA są niewielkie co wykluczało możliwość ich zbadania z wykorzystaniem innych technik instrumentalnych, np. jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. nuclear magnetic resonance) lub rentgenografii. Brak jednoznacznie potwierdzonej ich identyfikacji oraz doniesienia literaturowe wskazujące na problem addycji wody do nienasyconych związków organicznych [172, 173], a także niestabilność związków beta-hydroksykarbonylowych, która skutkuje eliminacją cząsteczki wody [172, 173] sprawiają, że tworzenie się hydroksylowych pochodnych 5-CQA w omawianych ekstraktach budzi pewne wątpliwości. Zostało to szczegółowo wyartykułowane w kolejnym rozdziale części teoretycznej.

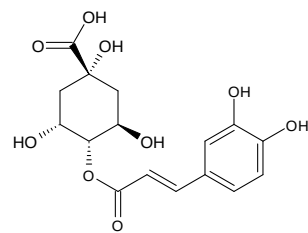
Podczas symulowanej ekstrakcji 5-CQA w roztworach buforowych o zróżnicowanym pH obserwuje się tworzenie takich samych produktów degradacji 5-CQA, jakie są obecne



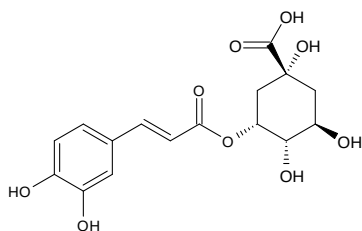
1. Kwas chinowy



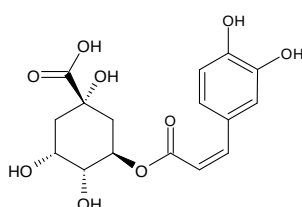
2. Kwas kawowy



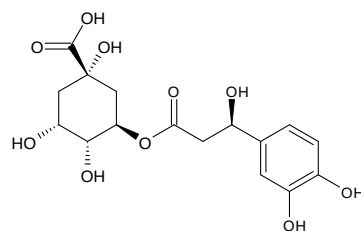
3. 4-CQA



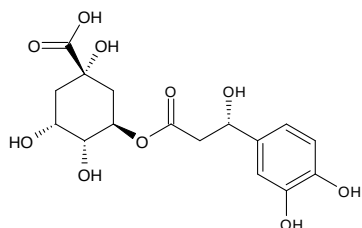
4. 3-CQA



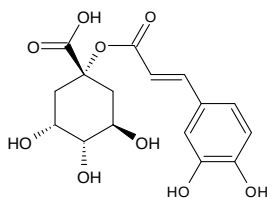
5. cis-5-CQA



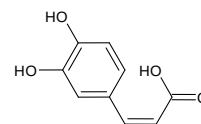
6. R-5-CQA-OH



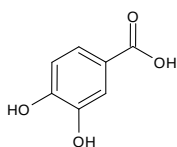
7. S-5-CQA-OH



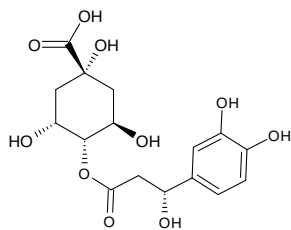
8. 1-CQA



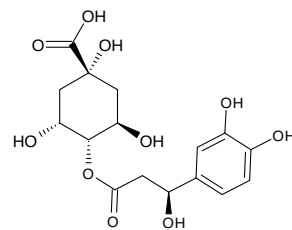
9. Kwas cis-kawowy



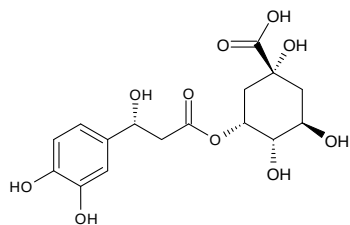
10. Kwas protokatechowy



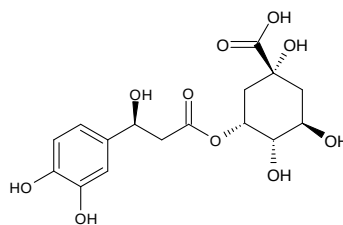
11. R-4-CQA-OH



12. S-4-CQA-OH



13. R-3-CQA-OH



14. S-3-CQA-OH

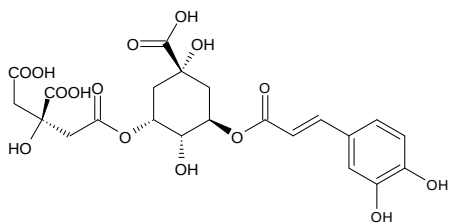
Rys. 11. Struktury pochodnych 5-CQA powstających podczas ekstrakcji tego kwasu wodą. Wg. [164, 165, 170].

w jego wodnych ekstraktach [165]. Należy zauważyć, że w tych ekstraktach odnotowuje się również obecność 6 substancji o masach o 18 Da większych od masy 5-CQA. Na podstawie danych retencyjnych oraz analogicznej analizy jakościowej jak w przypadku pochodnych otrzymanych podczas symulowanej ekstrakcji w roztworach wodnych zasugerowano, że wskazane substancje mogą być hydroksylowymi pochodnymi 3-, 4- oraz 5-CQA (patrz struktury 6, 7 oraz 11-14 na rys. 11). Poza w/w substancjami w trakcie ekstrakcji buforowanymi roztworami mogą powstać takie pochodne jak: 1-CQA, izomer cis kwasu kawowego oraz kwas protocatechowy [165] (patrz struktury 8-10 na rys. 11).

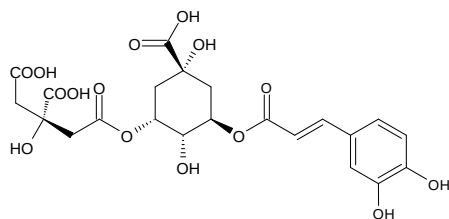
Omawiając badania z udziałem roztworów buforowych warto zauważyć, że w przypadku buforów fosforanowych nie stwierdza się reakcji zachodzących bezpośrednio pomiędzy analitami i składnikami buforów [165-167]. Odmienna sytuacja występuje w przypadku buforów octanowych, cytrynianowych oraz amonowych. W mieszaninach otrzymanych po symulowanej ekstrakcji 5-CQA obserwuje się w nich obecność odpowiednio estrów powstających pomiędzy 5-CQA i cząsteczkami kwasu cytrynowego (patrz struktury 1-3 na rys. 12) oraz octowego (patrz struktury 4, 5 na rys. 12), a w przypadku buforu amonowego powstają pochodne, w których jedna z fenolowych grup hydroksylowych jest podstawiona grupą aminową (patrz struktury 6-11 na rys. 12) [166].

Symulowana ekstrakcja 5-CQA z użyciem alkoholu oraz mieszanin alkohol/woda czy alkohol/bufor prowadzi do powstania kolejnych pochodnych 5-CQA – produktów estryfikacji kwasów chlorogenowych oraz alkoksylowych pochodnych 5-CQA, które potencjalnie tworzą się poprzez przyłączenie cząsteczki alkoholu do wiązania podwójnego na drodze addycji Michaela (patrz struktury 12, 13 na rys. 12) [167].

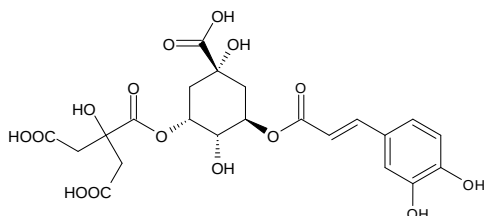
Tworzenie się produktów degradacji kwasów chlorogenowych zostało potwierdzone nie tylko na drodze symulowanej ekstrakcji, ale także podczas wysokotemperaturowej ekstrakcji artykułów spożywczych zawierających CQA, np. kawy oraz owoców borówki [169, 170]. W badaniach tych stwierdzono, że na stopień degradacji kwasów chlorogenowych mają wpływ pozostałe składniki badanych matryc. Dla przykładu warto np. zauważyć, że sacharoza w sposób widoczny spowalnia przekształcenia 5-CQA [169].



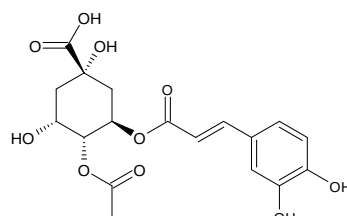
1. Izomer 1 Cytrynianu 5-CQA



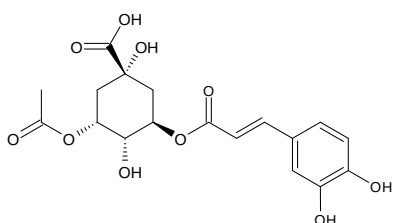
2. Izomer 2 Cytrynianu 5-CQA



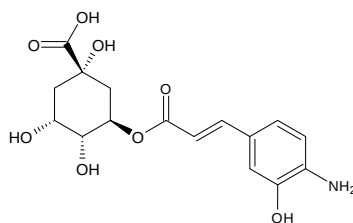
3. Izomer 3 Cytrynianu 5-CQA



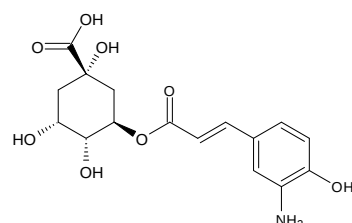
4. Izomer 1 Octanu 5-CQA



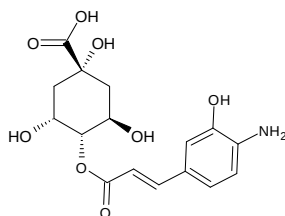
5. Izomer 2 Octanu 5-CQA



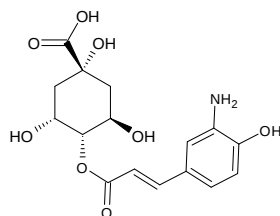
6. 5-CQA-p-NH₂



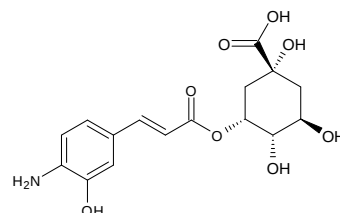
7. 5-CQA-m-NH₂



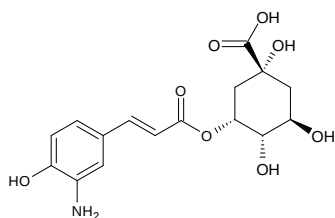
8. 4-CQA-p-NH₂



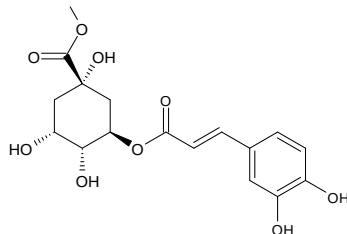
9. 4-CQA-m-NH₂



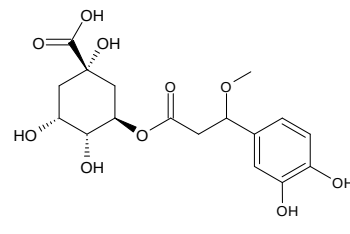
10. 3-CQA-p-NH₂



11. 3-CQA-m-NH₂



12. Ester metylowy 5-CQA



13. 5-CQA-OMe

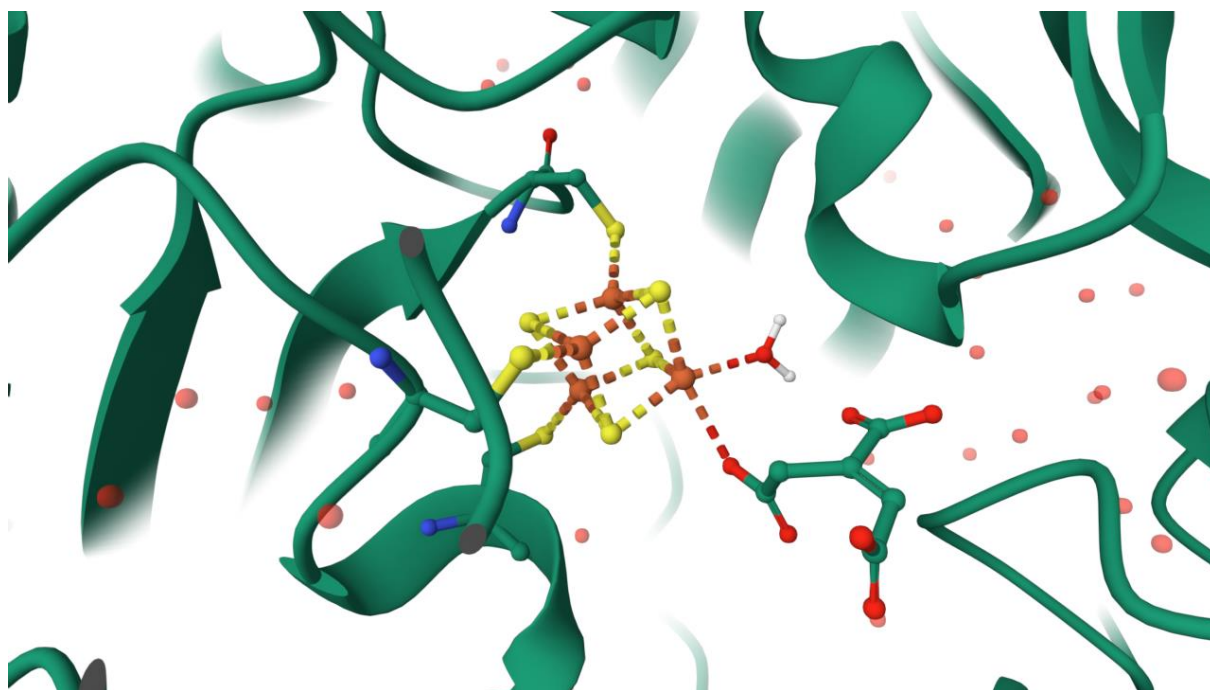
Rys. 12. Struktury pochodnych 5-CQA powstających podczas ekstrakcji tego kwasu buforem cytrynianowym (struktury 1-3), buforem octanowym (struktury 4-5), buforem amonowym (struktury 6-11) oraz metanolem (struktury 12-13). Wg. [166, 167].

4. Problem tworzenia związków beta-hydroksykarbonylowych na drodze bezpośredniej addycji Michaela

Jak zaznaczono w poprzednim podrozdziale, jednymi z produktów degradacji 5-CQA oraz innych kwasów chlorogenowych, które budzą pewne wątpliwości co do słuszności ich identyfikacji w oparciu o analizę LC-MS, są ich hydroksylowe pochodne będące produktami addycji Michaela cząsteczki wody do wiązania podwójnego C=C sprzężonego z grupą karbonylową w reszcie kwasu kawowego. Powstający układ beta-hydroksykarbonylowy stanowi obiekt niemałego zainteresowania chemii organicznej - chociażby ze względu na jego użyteczność w syntezie bardziej złożonych związków [172-177]. Do najczęściej stosowanych metod otrzymywania tego motywu strukturalnego należą kondensacja aldolowa, kondensacja Claisena z późniejszą redukcją beta-ketoestrów oraz metody wykorzystujące epoksydację [172-177]. Natomiast bezpośrednie przyłączenie wody w wyniku addycji Michaela do α,β -nienasyconych związków karbonylowych jest reakcją problematyczną. Cząsteczka wody jest bowiem słabym obojętnym nukleofilem obdarzonym wyłącznie ładunkiem cząstkowym [173, 178]. Ponadto, analiza energii orbitali molekularnych „biorących udział” w rozważanej reakcji wskazuje na ich wysokie różnice, co znacznie ogranicza efektywne „nakładanie się” orbitali prowadzące do powstawania nowych wiązań [173]. Dodatkowym argumentem wskazującym na trudność przyłączenia wody do podwójnego wiązania jest to, że tego typu reakcje charakteryzują się stanami równowagi przesuniętymi wyraźnie w kierunku bardziej stabilnych termodynamicznie substratów, co może przejawiać się rozpadem utworzonych *in situ* związków beta-hydroksykarbonylowych [173, 178, 179].

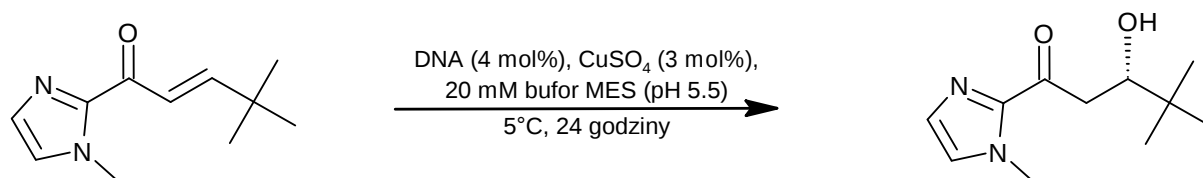
W literaturze można odnaleźć kilka rozwiązań wymienionych trudności dotyczących bezpośredniego przyłączenia wody na drodze addycji Michaela. Jednym z nich jest kataliza enzymatyczna. Enzymy z podklasy hydratyz takich jak fumaraza, hydrataza maleinowa, akonitaza oraz hydrataza enoilo-koenzymu A zapewniają skuteczną hydratację prostych związków organicznych przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej enancjoselektywności [178-184]. Wykorzystują one specyficzne oddziaływania reszt aminokwasowych z reagentami lub zdolność kofaktorów zawierających atomy metali do koordynowania cząsteczek wody (patrz rys. 13) [180, 181]. Wymienione enzymy charakteryzuje również wysoka selektywność, a niekiedy specyficzność względem substratów, co ogranicza ich zastosowanie głównie do bardzo wąskiego zakresu substancji [178-184].

Addycja wody do α,β -nienasyconych związków karbonylowych prowadzona z wykorzystaniem środków typowych dla chemii organicznej zazwyczaj wymaga zastosowania katalizatorów, które aktywują cząsteczkę wody lub związku karbonylowego. Jednym z pierwszych przykładów takiej syntezy było zastosowanie reakcji katalizowanej trimetylofosfiną [185]. Innymi przykładami katalizatorów zastosowanych w tym celu są pallad naniesiony na wełnę [186], katalizator bimetaliczny naniesiony na wełnę [187] oraz katalizatory wzorowane na DNA [188, 189]. Reakcje wykorzystujące wymienione



Rys. 13. Struktura centrum aktywnego akonitazy zawierającej kofaktor będący klasterem atomów żelaza i siarki. Atom żelaza niezwiązany z resztą cysteiny koordynuje cząsteczkę wody oraz anion kwasu trans-akonitowego. PDB: 1ACO [182].

katalizatory zapewniają wysokie wydajności reakcji, jednak tylko dla pojedynczych związków lub tak jak w przypadku wykorzystania katalizatorów wzorowanych na DNA wymagają substratów zawierających w swojej strukturze fragment imidiazolowy [188] (patrz rys. 14). Resch ze współ. zaproponowali wykorzystanie L-lizyny w celu przeprowadzenia addycji wody do cykloheksenonu i jego pochodnych, jednak z wydajnością sięgającą tylko 21 % [190]. Jeden z bardziej skutecznych sposobów przeprowadzenia addycji wody do α,β -nienasyconych związków karbonylowych stanowi kataliza z udziałem soli metali, np. soli



Rys. 14. Schemat reakcji addycji wody z wykorzystaniem kompleksu jonów Cu²⁺ i DNA z jąder łożosia jako katalizatora. Wg. [188].

chromu lub bizmutu [177, 191, 192]. Jako kwasy Lewisa zapewniają one silną aktywację grupy karbonylowej i sprzężonego z nią wiązania C=C. W ten sposób przeprowadzono przekształcenie ponad 15 ketonów (różniących się podstawnikami przyłączonymi do grupy karbonylowej) do ich beta-hydroksy pochodnych [177, 191, 192]. Jednak jak wynika z [177, 191, 192], w przypadku ketonów zawierających dodatkowe podstawniki przyłączone do sprzężonego wiązania alkenowego reakcja ta w ogóle nie zachodzi lub przebiega z niewielką wydajnością.

Powyższy przegląd wskazuje, że bezpośrednie przyłączenie wody do tak złożonych struktur jak kwas kawowy czy chlorogenowy wydaje się mało prawdopodobne.

CEL PRACY

Jak podkreślono wyżej, w trakcie ekstrakcji kwasów monokawoilochinowych oraz kwasów dikawoilochinowych wodą i wodnymi roztworami alkoholi zachodzą przemiany degradacyjne takie jak ich hydroliza, transestryfikacja i izomeryzacja cis-trans [164-171]. W przypadku np. wodnego ekstraktu 5-CQA (głównego ich przedstawiciela) stwierdza się w nim obecność kwasu kawowego, kwasu chininowego, izomerów 4- i 3-CQA oraz cis-5-CQA. Poza tymi produktami ekstrakty zawierają także dwie inne substancje, których masy cząsteczkowe są o 18 Da większe od masy 5-CQA. Ponieważ różnica ta odpowiada masie cząsteczki wody, a w cząsteczce kwasu chlorogenowego występuje podwójne wiązanie C=C sprzężone z grupą karbonylową, zasugerowano, że omawiane substancje są hydroksylowymi pochodnymi 5-CQA powstającymi w wyniku addycji Michaela [164, 170, 171]. Przedstawiony w poprzednim rozdziale przegląd literatury wskazuje jednak, że bezpośrednie przyłączenie wody do tak złożonych struktur jak kwas kawowy czy chlorogenowy jest mało prawdopodobne. Dlatego też podstawowym i wyjściowym celem niniejszej rozprawy było zbadanie czy w trakcie ekstrakcji 5-CQA wodą rzeczywiście tworzą się jego hydroksylowe pochodne.

Podstawową metodą pozwalającą na jednoznaczną identyfikację związków organicznych jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. Jej istotną wadą jest stosunkowo mała czułość, co pociąga za sobą konieczność użycia w procesie prawidłowej NMR'owskiej identyfikacji związku znacznej jego ilości. Dlatego też jednym z nurtów eksperymentalnych realizowanych w trakcie prezentowanej pracy były badania NMR zatężonych frakcji zawierających związki będące przedmiotem zainteresowania (t.j. związki charakteryzujące się masą cząsteczkową większą o 18 Da od masy 5-CQA) wyodrębnionych metodą chromatografii preparatywnej z symulowanych ekstraktów 5-CQA.

Jak zauważono w poprzednim podrozdziale, hydroksylowe pochodne 5-CQA to związki, które powinna cechować niska trwałość, szczególnie w środowisku wodnym. Tak więc ich ilość w wodnym ekstrakcie powinna maleć w trakcie jego przechowywania. Dlatego też w ramach prezentowanej pracy badaniami NMR objęto również suche pozostałości otrzymywane po odparowaniu rozpuszczalnika z wodnych ekstraktów 5-CQA spodziewając się uzyskania widm potwierdzających obecność w nich związków będących przedmiotem zainteresowania. Wobec powyższego w prezentowanej pracy poza wyżej wymienionym nurtem eksperymentalnym należy także wyróżnić drugi nurt – badania NMR suchych pozostałości uzyskanych po odparowaniu rozpuszczalnika z symulowanych ekstraktów 5-CQA. Nurt ten traktowany początkowo jako poboczny stał się nurtem zasadniczym gdyż w trakcie jego realizacji wykryto

nowe, nieznane dotychczas wodne pochodne 5-CQA - kompleksy 5-CQA i wody. Fakt ten stał się inspiracją do rozszerzenia wyżej sformułowanego celu i dodatkowo poznania innych możliwych wodnych pochodnych 5-CQA tworzących się w warunkach jego ekstrakcji wodą.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

5. Materiały i odczynniki

Do przeprowadzenia badań omawianych w niniejszej pracy wykorzystano następujące odczynniki oraz materiały:

- **Rozpuszczalniki (składniki faz ruchomych do HPLC, eluenty SPE/MSPD, deuterowane rozpuszczalniki do badań NMR):**
 - Acetonitryl, czystość Gradient HPLC, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Metanol, czystość Gradient HPLC, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Etanol, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Chloroform, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Aceton, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Octan etylu, czystość ≥ 99.8 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Propanol, czystość ≥ 99.8 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Deuterowany dimetylosulfotlenek (DMSO- d_6), stopień deuterowania 99.9 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Deuterowana woda (D₂O), stopień deuterowania 99.8 %, Sigma-Aldrich, Polska,
- **Odczynniki organiczne:**
 - Kwas mrówkowy, czystość LC-MS, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas 5-kawoilochinowy (5-CQA), czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas 4-kawoilochinowy (4-CQA), czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas 3-kawoilochinowy (4-CQA), czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas kawowy, czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas chininowy, czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - L-tryptofan, czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Irydyna, czystość ≥ 90 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Rutyna, czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Stewiozyd, czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Beta-escyna, czystość ≥ 95 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas octowy, cz.d.a., stężony, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Sacharoza, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Kwas cytrynowy, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - 2,2'-azobis(3-etylo-2,3-dihydrobenzotiazolino-6-sulfonian) diamonu (ABTS, ang. diammonium 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulphonate)), czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - 2,2-difenylo-1-(2,4,6-trinitrofenylo)hydrazyl (DPPH, ang. 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl)), czystość ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazyna (TPTZ), czystość ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Octan amonu, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,

- Octan sodu, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Kwas linolowy, czystość $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Neokupreina, czystość $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Tween 20, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Beta-karoten, czystość $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Limonen, czystość $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Tartazyna (E102), czystość $\geq 85\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Azorubina (E122), czystość $\geq 85\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwercetyna, czystość $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kofeina, czystość $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Kwas askorbinowy, czystość $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Trietyloamina, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Benzen, czystość $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Heksan, czystość $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
 - Heksadekan, czystość $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
- **Odczynniki nieorganiczne:**
- Chlorek miedzi (II), cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Siarczan żelaza (III) heptahydrat, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Chlorek żelaza (III) heksahydrat, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Kwas solny, cz.d.a. stężony, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Chlorek sodu, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Chlorek magnezu, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Chlorek wapnia, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
 - Diwodorofosforan sodu, cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
- **Sorbenty:**
- Sepra C18-E (50 μm , 65 Å), Phenomenex, Stany Zjednoczone,
- **Produkty spożywcze oraz materiały roślinne (zakupione w lokalnych sklepach):**
- ziarna prażonej kawy (*Coffea arabica* L.),
 - liście zielonej, czerwonej oraz czarnej herbaty,
 - korzenie arcydzięgla litworu (*Angelica Archangelica radix*),
 - liście rozmarynu lekarskiego (*Salvia rosmarinus* Spenn.),
 - napój Lipton Ice Tea,
 - sok jabłkowy.

6. Preparatyka i izolacja wodnych adduktów 5-CQA

Jak zaznaczono wyżej zasadniczym celem pracy była identyfikacja pochodnych 5-CQA o masie o 18 Da większej od masy ich prekursora, t.j. potencjalnych wodnych adduktów tego kwasu. Pochodne te pojawiają się w wodnych i alkoholowych ekstraktach roślin i preparatów zawierających 5-CQA. Ażeby dokonać ich jednoznacznej identyfikacji techniką NMR postanowiono pozyskać je w wymaganych do tego celu ilościach. Przygotowano symulowany ekstrakt 5-CQA wykorzystując w tym celu 5 % wodny roztwór tego kwasu i układ do ekstrakcji pod refluksiem. Proces symulowanej ekstrakcji trwał 2 godziny. Z uzyskanego ekstraktu wyodrębniano pochodne 5-CQA będące przedmiotem zainteresowania przy użyciu chromatografii preparatywnej.

Preparatywne wydzielenie wodnych adduktów 5-CQA zostało przeprowadzone przy użyciu chromatografu cieczowego wyposażonego w kolumnę LUNA C18(2) o wymiarach 150 mm × 10.0 mm, z ziarnem fazy stacjonarnej o średnicy 5 µm (Phenomenex, Torrance, USA), detektor SPD-20AV UV-VIS i automatyczny kolektor frakcji FRC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japonia). Składnikiem A fazy ruchomej była woda z dodatkiem kwasu mrówkowego (0.5%); składnikiem B fazy ruchomej był acetonitryl. W trakcie rozdziału stosowano następujący profil zmian składu eluentu: 3 % B przez okres 0 – 20 min a następnie przez okres 1 min (20 – 21 min programu) szybki liniowy wzrost B do 30%. Skład ten utrzymywano przez kolejne 4 min. (21-25 min. programu) po czym w ciągu 1 min obniżano stężenie składnika B do wartości 3% (25 min. – 26 min programu), którą utrzymywano przez 10 min (26 – 36 min programu). Objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 3.0 mL/min. Praca kolektora frakcji była kontrolowana za pomocą detektora UV-VIS pracującego przy długości fali wynoszącej 205 nm. Otrzymane frakcje zostały przebadane za pomocą chromatografu sprzężonego ze spektrometrem mas (LC-MS), poddane liofilizacji, a otrzymane suche pozostałości rozpuszczano w D₂O i poddano analizie NMR.

7. Eksperymenty dotyczące wodnych kompleksów 5-CQA

7.1. Preparatyka i badanie suchych ekstraktów zawierających wodne kompleksy 5-CQA

Jak zauważono w celu pracy badania dotyczyły nie tylko identyfikacja pochodnych 5-CQA o masie większej o 18 Da, ale także kompleksów 5-CQA z wodą, które występują w suchej pozostałości symulowanych ekstraktów 5-CQA i to w znacznie większej ilości niż

wspomniane wyżej pochodne 5-CQA. Procedura otrzymywania tych kompleksów składa się z dwóch etapów:

- symulowanej ekstrakcji (określanej w pracy również jako inkubacja) lub rzeczywistej ekstrakcji wodnych roztworów 5-CQA lub produktów zawierających 5-CQA, oraz
- usunięcia wody lub rozpuszczalnika organicznego z otrzymanych ekstraktów.

Pozostałości po odparowaniu (w dalszej części pracy określane również mianem suchych ekstraktów) były rozpuszczane w DMSO- d_6 i poddawane analizie NMR, a niektóre także analizie LC-MS (patrz rozdział - Metody badawcze).

7.2. Badania strukturalne wodnych kompleksów 5-CQA

Strukturę kompleksów 5-CQA z wodą określono techniką NMR wykorzystując w badaniach suche ekstrakty 5-CQA. Zostały one otrzymane poprzez usunięcie wody metodą liofilizacji z wodnych roztworów 5-CQA o stężeniu 1 mg/mL, które utrzymywano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 1 godz. Poza wodnymi kompleksami 5-CQA wrywkowymi badaniami objęto również wodne kompleksy 4-CQA i 3-CQA. Wyniki badań strukturalnych wodnych kompleksów 5-CQA, jak i jego izomerów przedstawia rozdział 12.

7.3. Badanie mechanizmu powstawania wodnych kompleksów 5-CQA

7.3.1. Badanie kinetyki powstawania wodnych kompleksów 5-CQA

Badania suchych ekstraktów 5-CQA za pomocą NMR wykazały, że stopień transformacji tego kwasu do jego wodnych kompleksów zależy od sposobu ich otrzymania. Dlatego też postanowiono przeprowadzić systematyczne badania mające na celu określenie kinetyki ich tworzenia. Badano wpływ następujących czynników na stopień konwersji 5-CQA do tych kompleksów:

- stężenia 5-CQA w jego wodnych roztworach;
- czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA;
- temperatury inkubacji wodnych roztworów 5-CQA.

Ponieważ na stopień konwersji 5-CQA do jego wodnych hydratów mogą mieć wpływ warunki procesu usuwania wody z roztworów (symulowanych ekstraktów) 5-CQA dlatego też

przebadano wpływ sposobu usuwania wody z roztworów 5-CQA po ich inkubacji. W badaniach tych wykorzystano następujące techniki usuwania wody:

- liofilizację przy wykorzystaniu liofilizatora chemicznego (Labconco, Kansas City, USA);
- odparowanie w warunkach próżni w temperaturze 50 lub 80°C przy użyciu koncentratora CentriVap (Labconco, Kansas City, USA);
- odparowanie w temperaturze wrzenia w warunkach ciśnienia atmosferycznego;
- odparowanie pod strumieniem azotu w temperaturze pokojowej.

Proces inkubacji wodnych roztworów 5-CQA prowadzono w warunkach statycznych lub dynamicznych. W celu przeprowadzenia dynamicznej inkubacji roztwory umieszczone w naczyniach szklanych były mieszane z wykorzystaniem wytrząsarki lub poddawane działaniu ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej.

7.3.2. Analiza elementarna suchych ekstraktów 5-CQA

Analiza elementarna wybranych suchych ekstraktów wodnych roztworów 5-CQA została przeprowadzona z wykorzystaniem aparatu EuroEA3000 CHNS-O Analyser (Euro Vector, Pawia, Włochy).

7.3.3. Oznaczanie zawartości wody w suchych ekstraktach 5-CQA

Zawartość wody w wybranych suchych ekstraktach wodnych roztworów 5-CQA została określona metodą miareczkowania odczynnikami Karla Fischera wykorzystując titrator V10S Compact (Mettler Toledo, Warszawa, Polska). Badane próbki przed miareczkowaniem rozpuszczono w metanolu po uprzednim odmiareczkowaniu zawartej w nim wody.

7.3.4. Spektroskopia dyfuzyjna NMR i wyznaczanie masy molowej wodnych kompleksów 5-CQA

Widma ^1H DOSY (ang. *diffusion ordered spectroscopy*) badanych związków rozpuszczonych w DMSO- d_6 zarejestrowano z wykorzystaniem sekwencji impulsów dstebpgp3s [193, 194] (ang. *double stimulating echo sequence with bipolar gradient pulses and 3 spoil gradients* – sekwencja wykorzystująca podwójne stymulowane echo gradientowe

z bipolarnymi impulsami gradientu i kompensacją konwekcji oraz trzy impulsy gradientu niszczące resztkowe namagnesowanie). Długość czasu dyfuzji (Δ_D) oraz długość impulsów gradientu (δ_D) były dobierane tak, aby otrzymać odpowiednie osłabienie sygnałów przy zastosowaniu narostu wartości gradientu pola magnetycznego od 2 % do 95 % maksymalnej wartości gradientu przy 32 krokach jego narostu. Przetwarzanie otrzymanych widm pseudo 2D zostało przeprowadzone z wykorzystaniem programu Dynamics Center Software (Bruker, Brema, Niemcy). Wartości współczynników dyfuzji oszacowano na podstawie dopasowania uzyskanych danych do odpowiednich równań Stejskala–Tannera [195], a kontury pików wyznaczono na podstawie błędu dopasowania.

Do określenia mas molowych badanych związków zastosowano metodę wzorca zewnętrznego zaproponowaną przez Stalkego i współpracowników [196, 197]. W wymienionej metodzie wyznaczana jest liniowa zależność pomiędzy logarytmem znormalizowanego współczynnika dyfuzji (znormalizowanego z użyciem współczynnika dyfuzji wzorca wewnętrznego dodawanego do roztworów związków kalibracyjnych oraz roztworów analitów - patrz równanie 8) i logarytmem masy molowej podana równaniem 7:

$$\log D_{x,norm} = \log K + \alpha \log M \quad (7)$$

$$\log D_{x,norm} = \log D_{ww,odn} - \log D_{ww} + \log D_x \quad (8)$$

gdzie $D_{x,norm}$ oznacza znormalizowany współczynnik dyfuzji analitu lub wzorca zewnętrznego, K oraz α są stałymi, M to masa molowa [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$], $D_{ww,odn}$ to wartość odniesienia współczynnika dyfuzji wzorca wewnętrznego [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$], D_{ww} to wartość współczynnika dyfuzji wzorca wewnętrznego wyznaczona eksperymentalnie, D_x to wartość współczynnika dyfuzji analitu lub wzorca zewnętrznego wyznaczona eksperymentalnie. Zastosowanie znormalizowanych wartości współczynników dyfuzji eliminuje wpływ wielu czynników na otrzymane wyniki, np. temperatury, niedokładnej kalibracji impulsów gradientu. Do wyznaczenia zależności kalibracyjnej jako wzorce zewnętrzne zastosowano: kwas kawowy ($M = 180.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), tryptofan ($M = 204.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), kwas chlorogenowy ($M = 354.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), irydynę ($M = 522.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), rutynę ($M = 610.52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), stewiozyd ($M = 804.87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) oraz beta-escynę ($M = 1131.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). DMSO był wykorzystany jako wzorzec wewnętrzny.

Dotyczy podrozdziału 7.3 - W tym bloku tematycznym przebadano dużą ilość próbek różniących się stężeniem, czasem i temperaturą inkubacji wodnego roztworu 5-CQA oraz sposobem usuwania z niego wody. Żeby czytelnikowi łatwiej było analizować wyniki przeprowadzonych eksperymentów postanowiono nie zamieszczać w tym miejscu szczegółowych danych na temat badanych układów i warunków przeprowadzonych eksperymentów, lecz podać je w trakcie dyskusji wyników i w podpisach do odpowiednich rysunków i tabel - patrz rozdział 13 i podrozdział 14.3.

7.4. Poszukiwania obecności prekursorów wodnych kompleksów 5-CQA w roztworach zawierających ten kwas

Jedno z pytań jakie pojawiło się w trakcie badań wodnych kompleksów 5-CQA dotyczyło obecności ich prekursorów w wyjściowych i inkubowanych roztworach tego kwasu przed usunięciem z nich wody. W celu odpowiedzi na to pytanie przeprowadzono dwa typy eksperymentów:

- bezpośrednie badania wodnych roztworów 5-CQA za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego oraz
- ocenę wybranych właściwości fizykochemicznych 5-CQA i jego wodnych roztworów.

Pierwszy typ eksperymentów to analiza NMR inkubowanego przez 24 godziny roztworu 5-CQA w mieszaninie H_2O/D_2O (90 % H_2O / 10 % D_2O).

Drugi typ badań to ocena:

- przewodnictwa elektrolitycznego,
- podatności 5-CQA na hydrolizę do kwasu kawowego i chininowego oraz
- kinetyki reakcji rodnikowych i reakcji redoks

świeżo przygotowanych oraz inkubowanych 1 i 24 godziny wodnych roztworów 5-CQA. We wszystkich tych eksperymentach stężenie 5-CQA w badanych roztworach wynosiło 1 mg/mL, zaś inkubację prowadzono w temp 25°C.

W drugim typie badań poza roztworami 5-CQA wykorzystano również dwa modelowe produkty spożywcze o poniższych składach:

- modelowy napój energetyczny zawierający 5-CQA (1 g), sacharozę (50 g), NaCl (1.5 g), $MgCl_2$ (1.5 g), CaCl (0.1 g), kwas cytrynowy (0.1 g), azorubinę (E122) (0.2 g) oraz kofeinę (0.3 g) w 1 litrze wody,
- modelowy napój izotoniczny zawierający 5-CQA (1 g), sacharozę (50 g), NaCl (1.5 g), $MgCl_2$ (1.5 g), CaCl (0.1 g), kwas cytrynowy (0.1 g), tartazyna (E102) (0.2 g), oraz limonen (0.3 mL) w 1 litrze wody,

które również badano bezpośrednio po przygotowaniu oraz po 1 i 24 godzinnej inkubacji.

Wyniki wyżej wymienionych eksperymentów omówiono w podrozdziałach 14.1 i 14.2.

7.4.1. Eksperymenty prowadzone w trakcie badań dotyczących wpływu czasu inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na:

- wielkość jego przewodnictwa elektrolitycznego;
- podatność 5-CQA na hydrolizę oraz na
- kinetykę reakcji rodnikowych i reakcji redoks

7.4.1.1. Pomiar przewodnictwa wodnych roztworów 5-CQA

Przewodność elektrolityczną wybranych wodnych roztworów 5-CQA zmierzono za pomocą konduktometru Model 912 (Metroohm, Herisau, Szwajcaria).

7.4.1.2. Badanie hydrolizy 5-CQA

Hydrolizę 5-CQA w jego wybranych roztworach wodnych prowadzono w temperaturze 25°C przez jedną godzinę po uprzednim zmieszaniu roztworu z 0.1 M roztworem buforu fosforanowego o pH=3 przy zachowaniu objętościowego stosunku próbki do buforu równego 1:1. Otrzymane mieszaniny były następnie poddawane analizie LC-MS w celu określenia ilości pozostałego kwasu 5-kawoilochinowego oraz powstającego kwasu chininowego oraz kwasu kawowego po hydrolizie. W obliczeniach wykorzystano krzywe kalibracyjne wyznaczone przy użyciu roztworów standardów wymienionych związków.

7.4.1.3. Badanie kinetyki reakcji rodnikowych oraz reakcji redoks

Wpływ czasu inkubacji wodnego roztworu na kinetykę reakcji rodnikowych i reakcji redoks określano wykorzystując spektrofotometryczne metody oceny antyutleniających własności związków organicznych. W badaniach tych określano zdolność 5-CQA do zmiatania

kationorodników ABTS, rodników DPPH, spowalniania reakcji utleniania β -karotenu, redukcji jonów Fe^{3+} oraz jonów Cu^{2+} . W tym celu zastosowano metody ABTS, DPPH, beta-karotenową, FRAP (ang. ferric ion reducing antioxidant parameter) i CUPRAC (ang. cupric ion reducing antioxidant capacity). W badaniach wykorzystano nieinkubowane i inkubowane przez 1 i 24 godziny w temperaturze 25°C wodne roztwory 5-CQA oraz modelowe produkty spożywcze. Spektrofotometr UV-VIS UV PROBE-2500 (Shimadzu, Kyoto, Japan) służył jako narzędzie pomiarowe. Dokładny opis poszczególnych procedur pomiarowych znajduje się w następujących pozycjach literaturowych [198-201].

7.5. Eksperymenty prowadzone w trakcie badań wpływu mediów hydrofobowych na stopień konwersji 5-CQA do jego wodnych kompleksów

Jedno z zagadnień jakie rozpatrywano w trakcie realizacji prezentowanych badań dotyczyło wpływu kontaktu medium hydrofobowego z wodnymi roztworami 5-CQA oraz ekstraktami roślinnymi i produktami spożywczymi zawierającymi ten kwas na stopień jego transformacji do hydratów. W praktyce taki kontakt ma miejsce np. w trakcie przygotowania próbki do analizy z wykorzystaniem typowych technik takich jak ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE, ang. *liquid-liquid extraction*), ekstrakcja ciało stałe-ciecz (SLE, ang. *solid-liquid extratction*), ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. *solid-phase extraction*), QuEChERS (ang., *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) czy dyspersja matrycy w fazie stałej (MSPD, ang. *matrix solid phase dispersion*).

Wyniki wyżej wymienionych eksperymentów omówiono w rozdziale 15.

7.5.1. LLE

Ekstrakcję ciecz-ciecz zastosowano do izolacji 5-CQA z poniższych próbek:

- wodnego roztworu 5-CQA (stężenie 1 mg/mL);
- wodnego ekstraktu z zielonej lub prażonej kawy;
- wodnych ekstraktów z zielonej, czerwonej lub czarnej herbaty, korzenia arcydzięgla lub liści rozmarynu lub napoju Lipton Ice Tea;
- wodnych roztworów 5-CQA (1 mg/mL) zawierających równomolowe ilości kofeiny lub sacharozy, bądź nasyconych rutyną lub kwercetyną;

- wodnych roztworów 5-CQA (1 mg/mL) zawierających kwas askorbinowy lub kwas cytrynowy lub kwas mrówkowy lub trietyloaminę lub kwas solny (stosunek molowy 5-CQA:dodatek wynoszący 1:0.1).

Należy uzupełnić, że wodne ekstrakty z zielonej, czerwonej lub czarnej herbaty, korzenia arcydzięgla, liści rozmarynu oraz napój Lipton Ice Tea zostały wzbogacone w 5-CQA do stężenia 1 mg/mL.

W/w próbki o objętości 1 mL ekstrahowano trzykrotnie 2 mL porcjami octanu etylu, każdorazowo poprzez 5 minutowe wytrząsanie. Po procesie ekstrakcji oddzielone na drodze wirowania (4000 obrotów na minutę przez 10 minut) fazy organiczne połączono i poddano działaniu strumienia azotu celem odparowania z nich rozpuszczalnika. Suche pozostałości ekstraktów rozpuszczano w DMSO- d_6 lub metanolu i poddawano odpowiednio analizie NMR oraz LC-MS.

Uzupełniające eksperymenty z LLE

Badając wpływ kontaktu medium hydrofobowego na stopień konwersji 5-CQA do jego wodnych kompleksów wykonano również, poza w/w, dwa eksperymenty uzupełniające.

- a) W 10 mL wody nasyconej heksanem lub benzenem rozpuszczono 10 mg 5-CQA. Po jednominutowym wytrząsaniu pobrano 1 ml z otrzymanego roztworu, który odparowywano do sucha w strumieniu azotu, a otrzymany osad przekazano do badań NMR.
- b) 5 mL wodnego roztworu 5-CQA (stężenie 1 mg/mL) wytrząsano z 5 mL heksadekanu przez 1 minutę. Po rozwarstwieniu faz (proces przyspieszono poprzez wirowanie) pobrano 1 mL fazy wodnej, odparowywano w strumieniu azotu, a otrzymany osad przekazano do badań NMR.

7.5.2. SPE

Technikę SPE zastosowano do izolacji 5-CQA z poniższych próbek:

- wodnego roztworu 5-CQA (stężenie 1 mg/mL);
- wodnego ekstraktu z zielonej lub prażonej kawy;
- wodnych ekstraktów z zielonej, czerwonej lub czarnej herbaty z dodatkiem 5-CQA (końcowe stężenie 5-CQA wynosiło 1 mg/mL);
- napoju Lipton Ice Tea z dodatkiem 5-CQA (końcowe stężenie 5-CQA wynosiło 1 mg/mL).

Do prowadzenia ekstrakcji zastosowano kolumnienki wypełnione 750 mg sorbentu Sepra C18-E (żel krzemionkowy modyfikowany chemicznie grupami oktadecylowymi) podłączone do systemu próżniowego SPE-12 G (J.T. Baker, N.J., USA). Kondycjonowanie sorbentu przeprowadzano poprzez jego przemycie 5 mililitrami końcowego eluentu (acetonitrylu lub octanu etylu lub acetonu lub metanolu lub etanolu lub propanolu lub mieszniny woda/metanol) oraz 5 mililitrami wody. Następnie na kolumnienkę наносzono 2 mL badanej próbki. Elucję 5-CQA z sorbentu prowadzono 5 mL jednego z wymienionych eluentów. Zebrane ekstrakty SPE odparowywano w strumieniu azotu, a uzyskane suche pozostałości rozpuszczano w DMSO-d₆ i poddawano odpowiednio analizie NMR.

W przypadku ekstraktów SLE kawy, herbaty oraz napoju Lipton procedura postępowania była taka sama jak wyżej z tą różnicą, że przed procedurą SPE zostały one zakwaszone do pH=2 poprzez dodatek kwasu mrówkowego. Sorbenty, na które наносzono te próbki były przed elucją 5-CQA dodatkowo przemycane 5 mL wody w celu usunięcia polarnych interferentów z kolumnienki.

Uzupełniające eksperymenty z SPE

Na kolumnienkę SPE wypełnioną 750 mg sorbentu Sepra C18-E wprowadzano 20 mL wodnego roztworu 5-CQA (1 mg/mL). Po odebraniu z układu 15 mL wycieku zebrano oddzielnie trzy kolejne 1 mL porcje wycieku. Uzyskane z nich po odparowaniu wody suche pozostałości rozpuszczano w DMSO-d₆ i poddawano analizie NMR.

7.5.3. QuEChERS

Zastosowanie QuEChERS do wyodrębniania analitów z wodnych próbek nie jest klasycznym jej użyciem, ale została ona wykorzystana w celu określenia czy w tej procedurze też może nastąpić zmiana stopnia transformacji 5-CQA do jego hydratów. Przebieg procedury był następujący. Do 1 mL wodnego roztworu 5-CQA (1 mg/mL) o pH=2 (do zakwaszenia użyto kwas mrówkowy) wprowadzano sole ekstrakcyjne (50 mg NaCl oraz 200 mg MgSO₄). Otrzymaną zawiesinę wytrząsano przez 1 minutę, a następnie dodawano do niej 1 mL acetonitrylu. Mieszanina była ponownie wytrząsana przez 1 minutę po czym pobierano z niej 900 µL supernatantu po uprzednim usunięciu soli ekstrakcyjnych na drodze odwirowania (4000 obrotów na minutę przez 10 minut). Do pobranego supernatantu dodawano 15 mg sorbentu C-18 (Sepra C18-E), zawiesinę wytrząsano przez 1 minutę i ponownie wirowano (4000

obrotów na minutę przez 10 minut) w celu oddzielenia sorbentu. Otrzymane ekstrakty były odparowywane w strumieniu azotu. Suche pozostałości ekstraktów rozpuszczano w DMSO-d₆ i poddawano analizie NMR.

7.5.4. MSPD

Mieszaniny złożone z 1 mg 5-CQA, 1 grama sorbentu C-18 (Septra C18-E) oraz 1 mL wody były ucierane w moździerzu szklanym przez 10 minut. Otrzymane mieszaniny umieszczano w cylindrze 5 mL strzykawki i kompresowano za pomocą tłoczka. Elucję 5-CQA z utworzonego złoża prowadzono 5 mL acetonitrylu. Otrzymane ekstrakty odparowywano w strumieniu azotu, a suche pozostałości rozpuszczano w DMSO-d₆ i poddawano analizie NMR.

7.6. Badania zależności pomiędzy wodnymi kompleksami i wodnymi adduktami 5-CQA

Przedstawione wyżej eksperymenty dotyczyły dwóch oddzielnych rodzajów wodnych pochodnych 5-CQA - wodnych kompleksów 5-CQA i wodnych adduktów 5-CQA. W celu zbadania czy istnieje powiązanie pomiędzy nimi przebadano próbki uzyskane w następujących eksperymentach.

- a) Z wodnych roztworów 5-CQA o stężeniu 0.25 i 1 mg/mL inkubowanych w temperaturze 25°C pobrano próbki do analizy LC-MS i oznaczono w nich stężenia wodnych adduktów 5-CQA. Analizowano próbki pobrane w 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 i 25 dniu inkubacji.
- b) Wyizolowane techniką chromatografii preparatywnej z wodnego roztworu 5-CQA frakcje zawierające wodne addukty 5-CQA odparowano do sucha, a otrzymane pozostałości rozpuszczono w DMSO-d₆ (z dodatkiem 0.5 mM D₃PO₄) i poddano analizie NMR.

Wyniki wyżej wymienionych eksperymentów omówiono w rozdziale 16.

Dotyczy rozdziału 6 i 7 Dane eksperymentalne prezentowane na odpowiednich wykresach i diagramach dla poszczególnych pomiarów przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe z trzech niezależnych pomiarów przeprowadzanych dla odrębnych próbek.

Otrzymane zależności i dane eksperymentalne porównywano za pomocą analizy wariancji (ANOVA). Różnice w badanych grupach uznawano za istotne dla $p \leq 0.05$ i $F_{\text{crit}} < F_{\text{exp}}$.

8. Analiza chromatograficzna

Analizy chromatograficzne prowadzono wykorzystując układ LC-MS składający się z wysokosprawnego chromatografu cieczowego oraz hybrydowego spektrometru mas Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). Chromatograficzne rozdzielanie prowadzono na kolumnach Gemini C18 o wymiarach 100 mm × 4.6 mm wypełnionej fazą stacjonarną o średnicy ziarna 3 μm, oraz Kinetex Core-Shell C18 o wymiarach 100 mm × 4.6 mm wypełnionej fazą stacjonarną o średnicy ziarna 2.6 μm (Phenomenex, Torrance, USA). Składnikiem A fazy ruchomej była woda z dodatkiem kwasu mrówkowego (25 mM), zaś składnikiem B acetonitryl z dodatkiem kwasu mrówkowego (25 mM). W procesie elucji wykorzystywano gradient fazy ruchomej o następującym kształcie: liniowy wzrost zawartości składnika B od 5 % do 35 % przez 30 minut, następnie liniowy wzrost zawartości składnika B do 90 % przez 5 minut. Objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0.4 mL/min.

Detekcja składników badanych mieszanin za pomocą spektrometrii mas była prowadzona z wykorzystaniem komory jonizacyjnej typu ESI (ang. *electrospray ionization* - jonizacja poprzez elektrorozpylanie) w następujących warunkach: napięcie kapilary – 4500 V, temperatura kapilary – 320°C, polaryzacja – ujemna, natężenie przepływu gazu rozpylającego – 40 jednostek, natężenie przepływu gazu pomocniczego – 10 jednostek, natężenie przepływu gazu osłonowego – 10 jednostek, gaz rozpylający/pomocniczy/osłonowy: azot (czystość > 99.998 %). Akwizycja danych była prowadzona w trybie SCAN, w zakresie od 100 do 1000 m/z przy rozdzielczości 70000 lub w trybie SIM (obserwacja sygnałów pochodzących od jonów $[M-H]^-$).

9. Analiza NMR

Do prowadzenia pomiarów NMR wykorzystano aparat Ascend 600 o indukcji pola magnetycznego 14.09 T wyposażony w sondy pomiarowe TXI (trójkanałowa $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ inwersyjna sonda pomiarowa) oraz BBO (dwukanałowa $^{31}\text{P}-^{15}\text{N}/^1\text{H}$ szerokopasmowa sonda pomiarowa) (Bruker, Brema, Niemcy). Próbkę rozpuszczano w 550 μL wybranego rozpuszczalnika deuterowanego. W przypadku widm ^1H , $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (ang. *correlation*

spectroscopy - korelacyjna spektroskopia jąder ^1H), ^1H - ^{13}C HSQC (ang. *heteronuclear single quantum coherence* - heterojądrowa spektroskopia korelacyjna jąder ^1H i ^{13}C z wykorzystaniem koherencji kwantowej pierwszego rzędu), ^1H - ^{13}C HMBC (ang. *heteronuclear multiple bond correlation* - heterojądrowa spektroskopia korelacyjna dalekiego zasięgu jąder ^1H i ^{13}C), selektywnych widm 1D TOCSY (ang. *total correlation spectroscopy* - zupełna spektroskopia korelacyjna), 1D oraz 2D NOESY (ang. *nuclear Overhauser effect spectroscopy* - spektroskopia jądrowego efektu Overhausera) rejestrowanych podczas identyfikacji badanych związków zastosowano standardowe sekwencje impulsów oraz wartości parametrów akwizycji. Do kalibracji przesunięcia chemicznego wykorzystywano resztkowy sygnał rozpuszczalnika. Wygaszenie sygnału wody podczas rejestracji widm ^1H próbek rozpuszczonych w mieszaninie $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90 %/10 %) uzyskano za pomocą sekwencji zgsgppe [202, 203].

Oznaczenia zawartości pochodnych 5-CQA w próbkach rozpuszczonych w DMSO-d_6 były prowadzone na podstawie widm ^1H uzyskanych z pomocą sekwencji zg, z czasem akwizycji – 2.72 s, oraz całkowitą liczbą powtórzeń – 128. Stopień konwersji 5-CQA, liczony jako iloraz intensywności integralnej 5-CQA oraz sumy intensywności integralnych 5-CQA i jego pochodnych, w suchych ekstraktach otrzymanych po odparowaniu rozpuszczalnika z roztworów 5-CQA wyznaczano na podstawie intensywności integralnych protonów alkenowych (średnia z wartości intensywności obydwu sygnałów) 5-CQA i jego pochodnych. Wyznaczone wartości stałych relaksacji T_1 (stała relaksacji spinowo-sieciowej) określone techniką inversion recovery dla jąder ^1H 5-CQA i jego pochodnych dających sygnały w zakresach 6.10-6.25 ppm oraz 7.40-7.55 ppm zawierały się w granicach od 1.60-2.10 s. W celu zapewnienia całkowitego odtworzenia równowagowych populacji stanów spinowych czas relaksacji dla sekwencji zg ustawiono na 15 s (co odpowiada niemal całkowitej relaksacji namagnesowania jąder o najwolniejszej relaksacji). Roztwór o znanym stężeniu 5-CQA w DMSO-d_6 był wykorzystany jako wzorzec zewnętrzny podczas wyznaczania zawartości 5-CQA oraz jego pochodnych w suchych ekstraktach. Przetwarzanie rejestrowanych widm (transformacja Fouriera, apodyzacja wykładnicza z poszerzeniem sygnału równym 0.3 Hz, korekcja linii bazowej, korekcja fazowa, dekonwolucja sygnałów) prowadzono w programie TOP SPIN 4.1.4 (Bruker, Brema, Niemcy).

10. Obliczenia kwantowo-chemiczne

Teoretyczne wartości przesunięć chemicznych diastereoizomerów 5-CQA-OH wyznaczano z wykorzystaniem metod teorii funkcjonału gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*) w programie ORCA [204-206]. Wizualizację i analizę wyników obliczeń prowadzono w programie Avogadro [207]. Do wyznaczenia geometrii najbardziej stabilnych konformerów każdego z izomerów zastosowano kilkuetapową procedurę. Wstępne przeszukanie przestrzeni konformacyjnej zostało przeprowadzone za pomocą programu Pcmol z wykorzystaniem pola siłowego MMFF94s (ang. *static Merck Molecular Force Field 94*) [208]. Dla każdego z diastereoizomerów wybrano 50 rotamerów o najmniejszej energii, które następnie poddano wstępnej optymalizacji geometrii przy zastosowaniu funkcjonału B3LYP [209] z korektą dyspersyjną D4 [210] oraz bazy funkcyjnej def2-SVP [211] w próżni (poziom obliczeń skrótowo określany jako B3LYP-D4/def2-SVP). W dalszych obliczeniach DFT zastosowano również metodę CPCM (ang. *Conductor-like Polarizable Continuum Model*) [212] w celu uwzględnienia efektów rozpuszczalnikowych pochodzących od wody. Dla konformerów o różnicach energii elektronowej nie przekraczających 3 kcal/mol (liczonych względem konformerów R-5-CQA-OH i S-5-CQA-OH o najniższej energii na poziomie B3LYP-D4/def2-SVP) prowadzono reoptymalizację geometrii na poziomie B3LYP-D4/def2-TZVP. Obecność minimów energii dla otrzymanych geometrii potwierdzono na podstawie analizy wibracyjnej. Wyznaczone geometrie wykorzystano do dalszych obliczeń.

Wartości magnetycznych stałych ekranowania jąder ^1H oraz ^{13}C poszczególnych konformerów wyznaczano na poziomach B3LYP/def2-TZVP, B3LYP/6-311++G(2d,p) oraz B3LYP/def2-QZVP stosując metodę GIAO (ang. *Gauge-Independent Atomic Orbitals*) [213]. Stałe ekranowania jąder dla każdego diastereoizomeru obliczono jako średnie ważone w oparciu o udziały poszczególnych rotamerów.

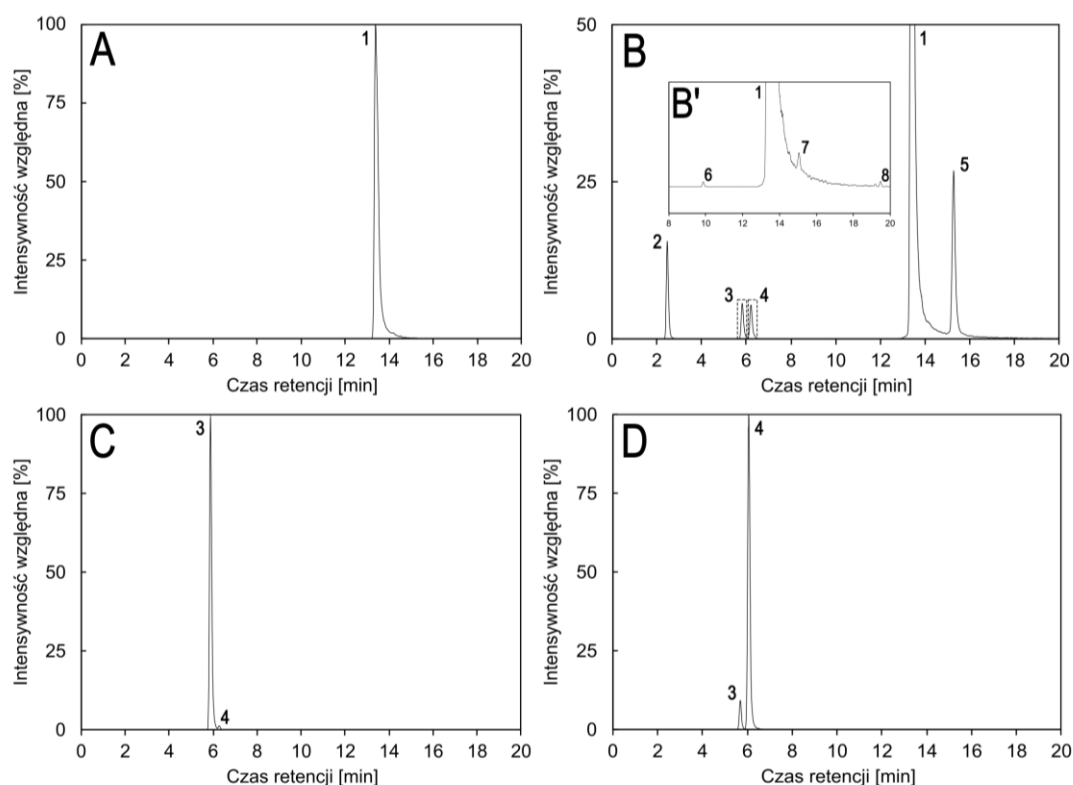
Przykładowe geometrie wybranych pochodnych 5-CQA (patrz odpowiednio rozdziały 12.2 oraz 13.7) wyznaczono z wykorzystaniem mechaniki molekularnej i pola siłowego MMFF94s.

WYNIKI i DYSKUSJA

11. Identyfikacja wodnych adduktów 5-CQA

Jak wykazano w części teoretycznej, powstawanie wodnych adduktów 5-CQA, tzn. związków tworzących się w wyniku addycji wody do sprzężonego wiązania alkenowego w cząsteczce 5-CQA na drodze reakcji Michaela, podczas symulowanej i rzeczywistej ekstrakcji tego kwasu jest procesem budzącym wiele wątpliwości. Dlatego głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy była identyfikacja pochodnych 5-CQA, których masa cząsteczkowa jest o 18 Da większa od masy 5-CQA.

Jak zaznaczono wcześniej, podstawową metodą pozwalającą na jednoznaczną identyfikację związków organicznych jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. Ponieważ jej istotną wadą jest stosunkowo mała czułość dlatego też w pierwszym etapie przygotowano znaczne ilości symulowanych ekstraktów 5-CQA, z których metodą chromatografii preparatywnej izolowano frakcje zawierające pochodne 5-CQA o masach większych o 18 Da od masy ich prekursora. Rys. 15A i 15B przedstawiają odpowiednio chromatogram roztworu wzorcowego 5-CQA oraz przykładowy chromatogram symulowanego ekstraktu 5-CQA z zaznaczonymi frakcjami, które wyodrębniano do badań NMR. Jak wynika z rys. 15B, poza 5-CQA (pik 1) i jego pochodnymi, których masa jest o 18 Da większa od masy 5-CQA (piki 3 i 4) ekstrakt zawiera szereg innych pochodnych tego kwasu. Są to: kwas chinowy (pik 2), kwas kawowy (pik 5), 4-CQA (pik 6), 3-CQA (pik 7) oraz 4,5-diCQA (pik 8). Obecność tych związków w ekstrakcie 5-CQA jest zgodna z danymi literaturowymi [164-168]. Rys. 15C i D przedstawiają chromatogramy LC-MS wyizolowanych przy pomocy chromatografii preparatywnej frakcji potencjalnych wodnych adduktów 5-CQA (t.j. związków których masa jest o 18 Da większa od masy 5-CQA). Z porównania chromatogramów wynika, że zebrane frakcje zawierają głównie pojedyncze izomery potencjalnych adduktów.

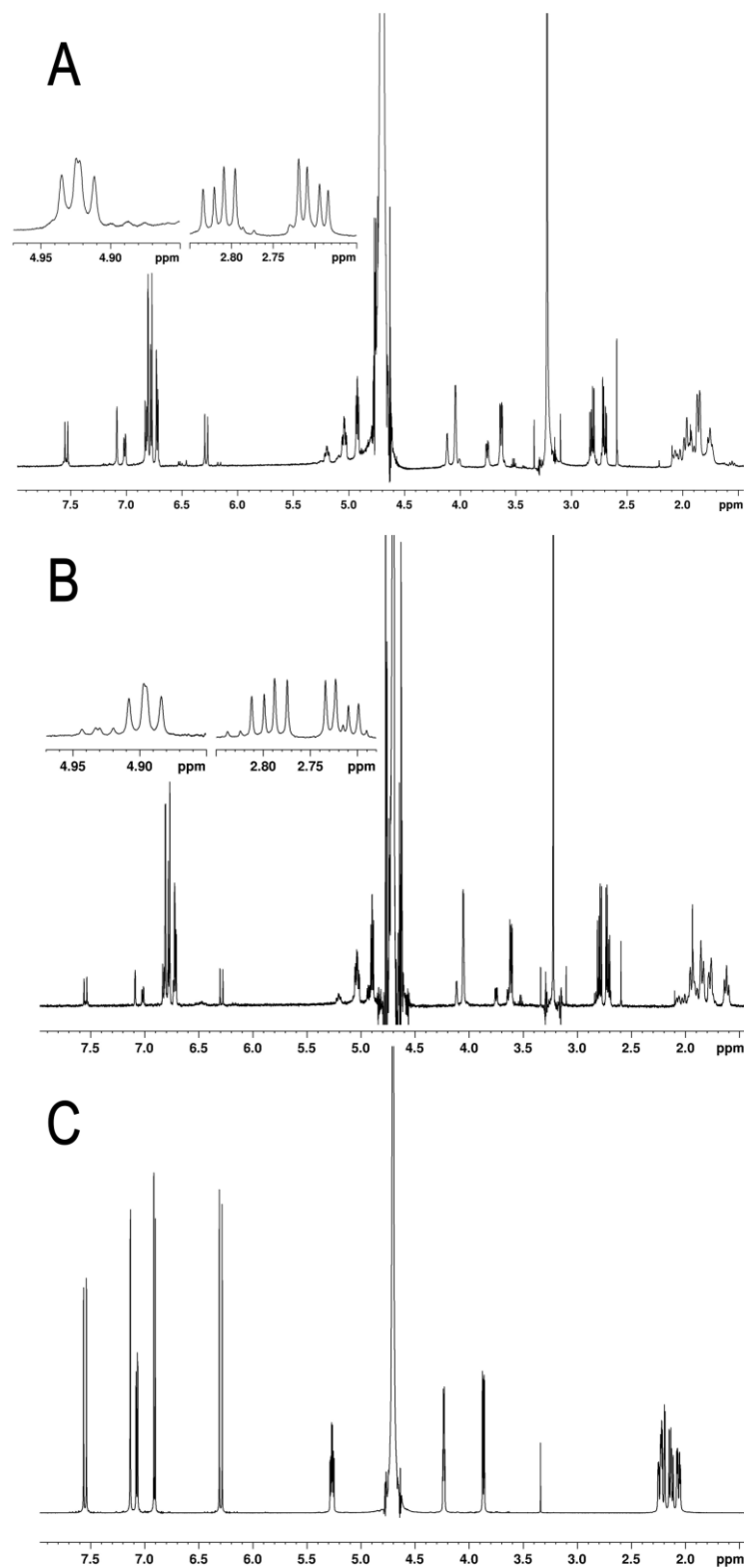


Rys. 15. Chromatogramy LC-MS (tryb SIM): (A) roztworu wzorcowego 5-CQA, (B) symulowanego ekstraktu 5-CQA oraz (C i D) frakcji wyizolowanych preparatywnie zawierających wodne addukty 5-CQA.

Chromatogram (B') zawiera zapis sygnałów pochodzących wyłącznie od jonów $[M-H]^-$ o m/z 353 (t.j. jonów 3-, 4- i 5-CQA) oraz o m/z 515 (t.j. jonów 4,5-diCQA) (powiększenie 30-krotne).

Poszczególne piki odpowiadają następującym związkom: 1 – 5-CQA, 2 – kwas chininowy, 3 i 4 – wodne addukty 5-CQA, 5 – kwas kawowy, 6 – 3-CQA, 7 – 4-CQA, 8 – 4,5-diCQA.

Widma 1H wyizolowanych potencjalnych wodnych adduktów 5-CQA zaprezentowano na rys. 16A oraz 16B. Porównanie widm 1H otrzymanych frakcji z widmem 5-CQA (patrz rys. 16C) wskazuje na istotne różnice występujące w obrębie zakresu odpowiadającego sygnałom protonów grup nienasyconych. W zakresach 6.1-6.4 ppm oraz 7.4-7.6 ppm widoczne są jedynie reszkowe sygnały pochodzące od 5-CQA i jednocześnie nie obserwuje się sygnałów protonów alkenowych pochodzących od potencjalnych adduktów.



Rys. 16. Widma ^1H (600 MHz, D_2O)
 (A) wodnego adduktu 5-CQA nr 1 (pik nr 3 na rysunkach 15B-D),
 (B) wodnego adduktu 5-CQA nr 2 (pik nr 4 na rysunkach 15B-D) oraz
 (C) 5-CQA.

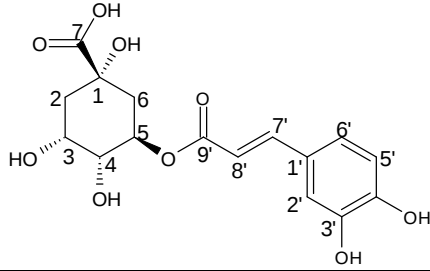
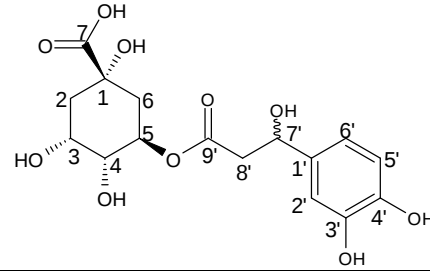
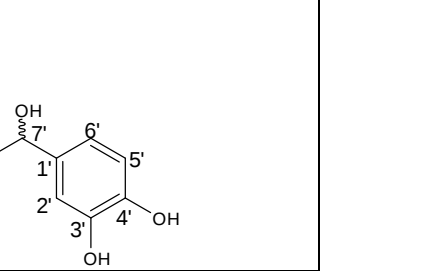
Natomiast w zakresie alifatycznym – zarówno w pozycjach 4.92, 2.82 i 2.70 ppm dla pierwszej pochodnej, jak i w pozycjach 4.90, 2.79 i 2.72 ppm dla drugiej pochodnej - widoczne są dodatkowe multiplety, przy czym każdy z nich jest dubletem dubletów i pochodzi od pojedynczego protonu. Stałe sprzężeń protonów 2.82 i 2.70 ppm oraz 2.79 i 2.71 ppm wynoszące odpowiednio 15.0 Hz oraz 14.6 Hz wskazują na sprzężenia geminalne (tj. sprzężenia przenoszone przez dwa wiązania) pomiędzy jądrami w każdej z tych par co sugeruje, że wymienione pary sygnałów pochodzą od protonów należących do grup metylenowych. Stałe sprzężeń protonów metylenowych z protonami dającymi sygnały w pozycjach 4.90 oraz 4.92 ppm zawierają się w zakresach od 6.0 do 8.0 Hz. Są one typowe dla sprzężeń wicynalnych, tj. przenoszonych przez trzy wiązania. Tak więc, każda z otrzymanych pochodnych zawiera dodatkowy fragment $\text{CH}_2\text{-CH}$, a właściwie to $\text{CH}_2\text{-CH(OH)}$ (przy czym sygnał od protonu OH nie jest widoczny w D_2O). Brak sygnałów pochodzących od grup alkenowych oraz zidentyfikowane ugrupowania alifatyczne wskazują na to, że wyodrębnione pochodne 5-CQA powstały w wyniku addycji Michaela. Dodatkowym dowodem zajścia tej reakcji jest również zmiana wartości przesunięć chemicznych protonów aromatycznych, które w przypadku pochodnych występują przy znacznie niższych wartościach przesunięć niż analogiczne jądra w 5-CQA. Takie przesunięcie w kierunku wyższych wartości pola może być wytłumaczone brakiem sprzężenia z grupą enonową, które powoduje zmniejszenie ekranowania protonów w 5-CQA. Powyższa analiza widm NMR, przypisanie pozostałych sygnałów rezonansowych (patrz tabela 1) oraz pozycje sygnałów na widmach MS (wskazujące na to, że masa pochodnych jest o 18 Da większa od masy 5-CQA) jednoznacznie dowodzą, że wyodrębnione pochodne 5-CQA powstają w wyniku addycji wody do wiązania alkenowego na drodze addycji Michaela i są one diastereoizomerami różniącymi się między sobą wyłącznie konfiguracją nowoutworzonego centrum chiralnego. W dalszej części dyskusji addukty te będą oznaczane jako 5-CQA-OH, a poszczególne diastereoizomery jako 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2. Dane z widm NMR dla 5-CQA oraz jego hydroksylowych pochodnych zostały przedstawione w tabeli 1.

Należy zaznaczyć, że podczas omawiania w/w sygnałów rezonansowych i odpowiadających im fragmentów strukturalnych zastosowano nomenklaturę oraz numerację atomów kwasów chlorogenowych i ich pochodnych zgodną z zaleceniami IUPAC z 1976 roku (patrz podrozdział 2.1 w części literaturowej). Uwaga ta dotyczy także kolejnych rozdziałów tej pracy.

11.1. Konfiguracja diastereoizomerów 5-CQA-OH

Jak wykazano w poprzednim podrozdziale, w wyniku przyłączenia cząsteczki wody do 5-CQA na drodze addycji Michaela powstają dwa diastereoizomery 5-CQA-OH. Różnią się one jedynie konfiguracją centrów chiralnych w resztach kwasu 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-3-hydroksypropionowego. W przypadku spektrometrii NMR stereochemię związków

Tabela 1 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA oraz wodnych adduktów 5-CQA (5-CQA-OH) (D₂O, 600 MHz i 125 MHz).

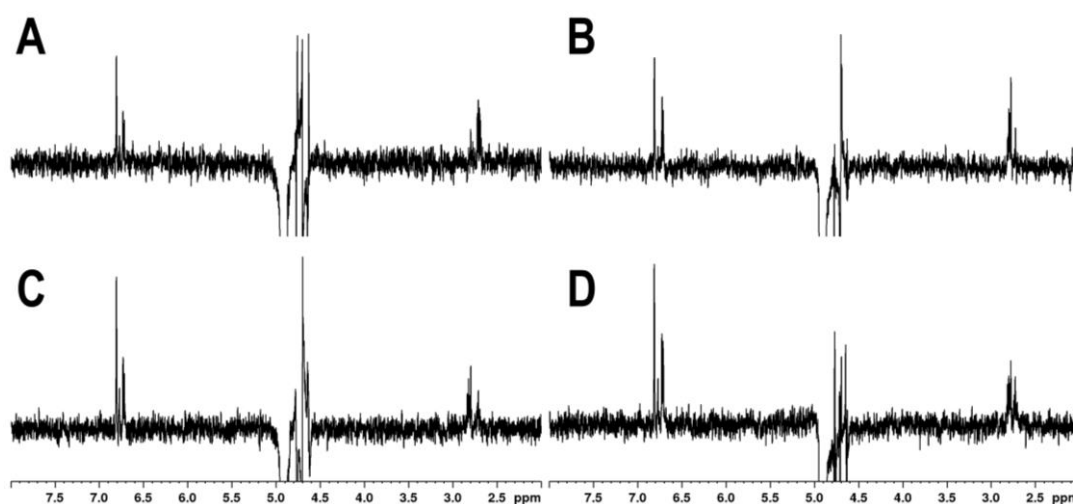
						
	5-CQA		5-CQA-OH-1		5-CQA-OH-2	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	-	74.0	-	-(a)	-	-(a)
2_{ax}	2.20 (dd, <i>J</i> = 14.6, 3.6 Hz)	37.7	1.98 (m) lub 1.88 (m)	36.9	1.94 (m) lub 1.85 (m)	37.1
2_{eq}	2.06 (ddd, <i>J</i> = 14.5, 5.3, 2.1 Hz)		1.98 (m) lub 1.88 (m)		1.94 (m) lub 1.85 (m)	
3	4.23 (dt, <i>J</i> = 5.3, 3.2 Hz)	68.6	4.04 (m)	70.3	4.05 (m)	70.5
4	3.87 (dd, <i>J</i> = 8.6, 3.3 Hz)	70.9	3.63 (dd, <i>J</i> = 9.6, 3.2 Hz)	72.3	3.61 (dd, <i>J</i> = 9.8, 3.3 Hz)	72.5
5	5.26 (td, <i>J</i> = 9.1, 4.4 Hz)	71.3	5.04 (td, <i>J</i> = 10.5, 4.8 Hz)	71.3	5.03 (td, <i>J</i> = 10.9, 4.7 Hz)	71.4
6_{ax}	2.13 (dd, <i>J</i> = 13.6, 9.6 Hz)	36.8	1.75 (t, <i>J</i> = 11.1 Hz)	37.7	1.62 (t, <i>J</i> = 12.1 Hz)	38.0
6_{eq}	2.24 (ddd, <i>J</i> = 13.7, 4.3, 2.2 Hz)		1.86 (m)		1.86 (dt, <i>J</i> = 12.3, 3.2 Hz)	
7	-	175.4	-	169.6	-	168.1
1'	-	126.1	-	134.9	-	134.4
2'	7.13 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	115.3	6.81 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz)	113.9	6.81 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	114.0
3'	-	146.1	-	143.7	-	143.7
4'	-	148.8	-	143.9	-	143.9
5'	6.91 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	116.2	6.78 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz)	116.2	6.77 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	116.2
6'	7.07 (dd, <i>J</i> = 8.3, 2.0 Hz)	121.8	6.72 (dd, <i>J</i> = 8.4, 2.0 Hz)	118.7	6.72 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.8 Hz)	118.7
7'	7.55 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz)	145.4	4.92 (dd, <i>J</i> = 7.8, 6.7 Hz)	69.7	4.92 (dd, <i>J</i> = 7.7, 6.7 Hz)	70.0
8'	6.30 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz)	114.8	2.82 (dd, <i>J</i> = 14.9, 8.1 Hz)	43.1	2.79 (dd, <i>J</i> = 14.6, 8.0 Hz)	43.3
			2.70 (dd, <i>J</i> = 15.0, 6.2 Hz)		2.71 (dd, <i>J</i> = 14.4, 6.5 Hz)	
9'	-	166.2	-	172.6	-	172.9

a) ax – położenie aksjalne, eq – położenie ekwatorialne.

b) d – dublet, dd – dublet dubletów, ddd – dublet dubletów dubletów, dt – dublet tripletów, t – triplet, td – triplet dubletów, m – złożony multiplet.

c) Sygnał jądra nie był widoczny na widmie ¹³C.

organicznych określa się najczęściej w oparciu o jądrowy efekt Overhausera (NOE, ang. *Nuclear Overhauser effect*) oraz poprzez porównanie wartości stałych sprzężeń spinowo-spinowych [173, 214-216]. Rys. 17A-17D przedstawiają przykładowe widma 1D ^1H - ^1H NOESY uzyskane dla protonów H7' 5-CQA-OH, czyli protonów metinowych z centrum chiralnego tworzącego się podczas addycji. Jak widać w widmach poszczególnych diastereoizomerów widoczne są sygnały korelacyjne o zbliżonej intensywności względem protonów aromatycznych, co wskazuje na brak istotnych różnic w oddziaływaniach badanych powyższych protonów w każdym z nich. Ponadto wycinalne stałe sprzężeń spinowo-spinowych protonów H7' oraz H8' w obydwu adduktach są podobne, co wskazuje na zbliżone wartości kątów torsyjnych występujących pomiędzy omawianymi jądrami. Tak więc, jednoznaczne rozróżnienie diastereoizomerów 5-CQA-OH z wykorzystaniem powyższych parametrów nie jest możliwe.



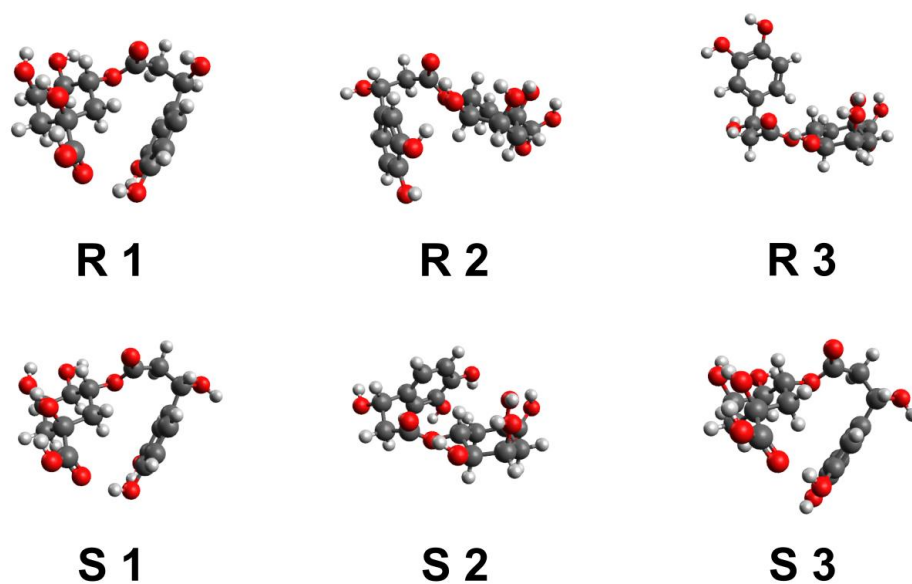
Rys. 17. Selektywne widma 1D ^1H - ^1H NOESY (D_2O , 600 MHz) uzyskane dla protonów H7' 5-CQA-OH-1 przy czasie mieszania 0.3 sekundy (A) i 0.5 sekundy (C) oraz dla protonów H7' 5-CQA-OH-2 przy czasie mieszania 0.3 sekundy (B) i 0.5 sekundy (D).

Inną strategią stosowaną do identyfikacji związków organicznych (w tym również par diastereoizomerów) na podstawie danych NMR jest wykorzystanie metod chemii teoretycznej [214, 215]. W tym przypadku wyznaczone eksperymentalnie wartości przesunięć chemicznych (lub stałych sprzężeń) jąder są porównywane z wartościami obliczonymi teoretycznie dla możliwych struktur rozważanych substancji. Z uwagi na nieznaczne różnice wartości

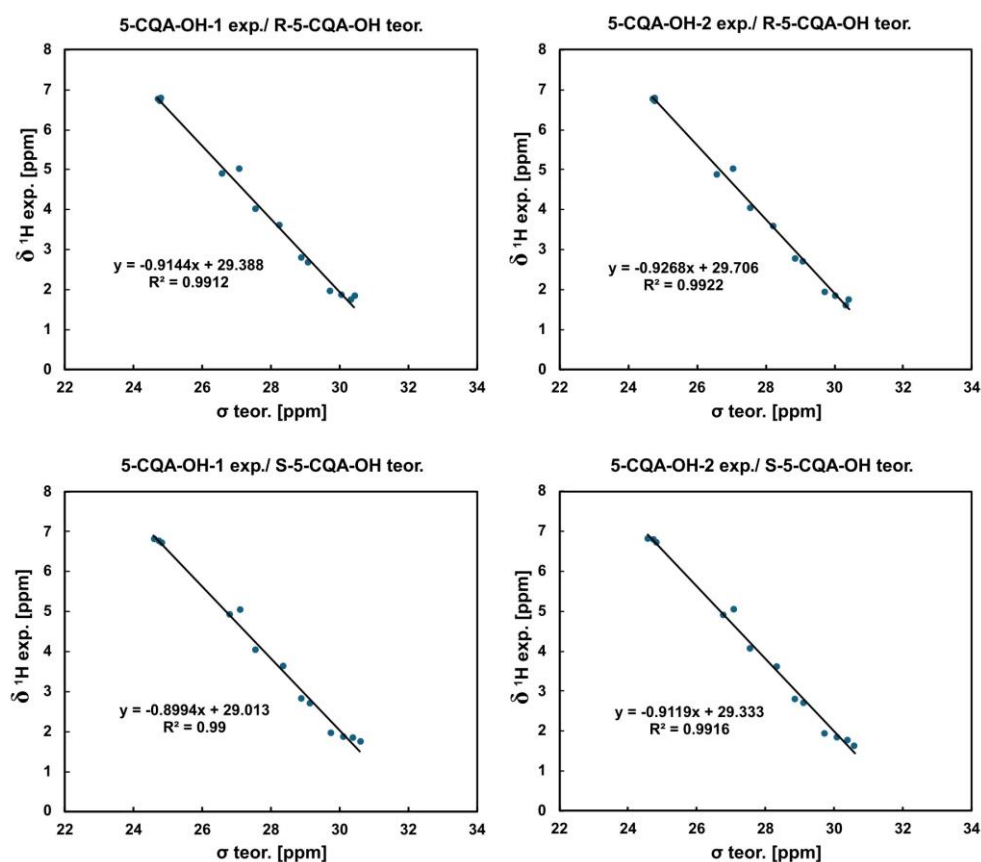
parametrów eksperymentalnych dotyczących adduktów 5-CQA omawianych w poprzednim akapicie, postanowiono wyznaczyć wartości przesunięć chemicznych dla każdego z diastereoizomerów 5-CQA-OH z wykorzystaniem metod teorii funkcyjności gęstości (DFT, ang. *density functional theory*).

W celu dokładnego wyznaczenia wartości przesunięć chemicznych za pomocą metod teoretycznych niezbędne jest uwzględnienie wszystkich stabilnych konformerów badanych substancji. Ze względu na znaczną ilość wiązań pojedynczych obecnych w 5-CQA-OH i tym samym ogromną ilość potencjalnych rotamerów, do przeprowadzenia analizy konformacyjnej zastosowano procedurę wykorzystującą metody mechaniki molekularnej i DFT. Dla każdego z diastereoizomerów przeprowadzono wstępne przeszukanie przestrzeni konformacyjnej z wykorzystaniem pola siłowego MMFF94s (ang. static Merck Molecular Force Field 94) [208]. Diastereoizomery oznaczono jako R-5-CQA-OH i S-5-CQA-OH, gdzie przedrostki R- i S- pochodzą od konfiguracji centrum chiralnego utworzonego w wyniku addycji. 50 konformerów R-5-CQA-OH o najniższej energii oraz 50 konformerów S-5-CQA-OH o najniższej energii poddano wstępnej optymalizacji geometrii z wykorzystaniem funkcyjności B3LYP [209], bazy funkcyjnej def2-SVP [211] oraz korekty dyspersyjnej D4 [210] (oznaczonych dalej skrótowo jako B3LYP-D4/def2-SVP). Dalszą optymalizację na poziomie B3LYP-D4/def2-TZVP przeprowadzono wyłącznie dla konformerów dla których różnice energii elektronowej nie przekraczały 3 kcal/mol (liczonych względem konformerów R-5-CQA-OH i S-5-CQA-OH o najniższej energii na poziomie B3LYP-D4/def2-SVP). Struktury geometrii równowagowych trzech najbardziej stabilnych konformerów każdego z diastereoizomerów są widoczne na rys. 18. W każdej z przedstawionych geometrii obserwuje się układ wiązań wodorowych powstających kolejno pomiędzy grupami $\text{COOH}\cdots\text{OH1}\cdots\text{OH3}\cdots\text{OH4}$, podobnie jak w przypadku konformerów 5-CQA [217]. Pozostałe oddziaływania wodorowe mają zróżnicowany charakter w poszczególnych konformerach. W rotamerach o najniższej energii, t.j. **R1** i **S1** oraz **S3** obecne są wiązania wodorowe powstające pomiędzy grupą karboksylową i jedną z fenolowych grup -OH. W przypadku konformerów **R2**, **R3** i **S2** atom wodoru grupy OH4 tworzy wiązanie wodorowe z grupą estrową, co skutkuje powstaniem układu oddziaływań $\text{COOH}\cdots\text{OH1}\cdots\text{OH3}\cdots\text{OH4}\cdots\text{O}=\text{C}$.

Teoretyczne wartości przesunięć chemicznych zostały wyznaczone na podstawie równań liniowych uzyskanych z wykorzystaniem dopasowania obliczonych magnetycznych stałych ekranowania i eksperymentalnych wartości przesunięć metodą najmniejszych kwadratów. Przykładowe wykresy takich zależności, przykładowe wartości wyznaczonych



Rys. 18. Najbardziej stabilne konformery R- oraz S-5-CQA-OH (numeracja zgodna z rosnącą energią poszczególnych konformerów) otrzymane w wyniku optymalizacji geometrii na poziomie B3LYP-D4/def2-TZVP.



Rys. 19. Dopasowanie eksperymentalnych wartości przesunięć chemicznych jąder ^1H oraz ich teoretycznych magnetycznych stałych ekranowania wyznaczonych na poziomie B3LYP-D4/def2-TZVP.

Tabela 2 Wartości przesunięć chemicznych wyznaczonych eksperymentalnie ($\delta^1\text{H}_{\text{exp.}}$) oraz wartości przesunięć określonych teoretycznie ($\delta^1\text{H}_{\text{teor.}}$) dla 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2. Dopasowania dokonano dla obliczonych teoretycznie magnetycznych stałych ekranowania (poziom B3LYP-D4/def2-TZVP).

Dopasowanie do 5-CQA-OH-1			
Nr ^1H	$\delta^1\text{H}_{\text{exp}}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}_{\text{teor}}$ [ppm]	
		R-5-CQA-OH	S-5-CQA-OH
H2 _{eq}	1.98	2.21	2.27
H2 _{ax}	1.88	1.93	1.95
H3 _{eq}	4.04	4.20	4.23
H6 _{ax}	1.75	1.66	1.49
H6 _{eq}	1.86	1.57	1.68
H6'	6.72	6.75	6.68
H2'	6.81	6.73	6.90
H5'	6.78	6.80	6.76
H5 _{ax}	5.04	4.65	4.65
H4 _{ax}	3.63	3.58	3.52
H8' 1	2.82	2.99	3.04
H8' 2	2.70	2.80	2.83
H7'	4.92	5.08	4.92
Dopasowanie do 5-CQA-OH-2			
Nr ^1H	$\delta^1\text{H}_{\text{exp}}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}_{\text{teor}}$ [ppm]	
		R-5-CQA-OH	S-5-CQA-OH
H2 _{eq}	1.94	2.16	2.22
H2 _{ax}	1.85	1.87	1.90
H3 _{eq}	4.05	4.17	4.21
H6 _{ax}	1.62	1.6	1.43
H6 _{eq}	1.86	1.51	1.62
H6'	6.72	6.76	6.70
H2'	6.81	6.74	6.92
H5'	6.77	6.81	6.77
H5 _{ax}	5.03	4.63	4.63
H4 _{ax}	3.61	3.54	3.49
H8' 1	2.79	2.95	3.00
H8' 2	2.71	2.76	2.79
H7'	4.90	5.07	4.91

Tabela 3 Wartości parametrów opisujących dopasowanie przesunięć chemicznych wyznaczonych eksperymentalnie i obliczonych teoretycznie magnetycznych stałych ekranowania (R^2 i a) oraz wartości parametrów opisujących różnice pomiędzy eksperymentalnymi wartościami przesunięć i wartościami przesunięć wyznaczonymi na podstawie dopasowania (σ i $\Delta_{\max}$).

Dopasowanie przesunięć chemicznych jąder ^1H									
		5-CQA-OH-1 exp.				5-CQA-OH-2 exp.			
Poziom Obliczeń	Struktura Teoretyczna	R^2	a	σ	$\Delta_{\max}$	R^2	a	σ	$\Delta_{\max}$
B3LYP/def2-TZVP	S-5-CQA-OH	0.990	-0.899	0.205	0.392	0.992	-0.912	0.190	0.403
	R-5-CQA-OH	0.991	-0.914	0.192	0.395	0.992	-0.927	<u>0.183</u>	0.406
B3LYP/6-311++G(2d,p)	S-5-CQA-OH	0.990	-0.904	0.204	0.354	0.992	-0.917	0.188	0.364
	R-5-CQA-OH	0.991	-0.922	0.197	0.367	0.992	-0.935	<u>0.183</u>	0.377
B3LYP/def2-QZVP	S-5-CQA-OH	0.990	-0.902	0.204	0.390	0.992	-0.914	0.189	0.401
	R-5-CQA-OH	0.991	-0.915	0.191	0.390	0.992	-0.927	<u>0.182</u>	0.401
Dopasowanie przesunięć chemicznych jąder ^{13}C									
		5-CQA-OH-1 exp.				5-CQA-OH-2 exp.			
Poziom Obliczeń	Struktura Teoretyczna	R^2	a	σ	$\Delta_{\max}$	R^2	a	σ	$\Delta_{\max}$
B3LYP/def2-TZVP	S-5-CQA-OH	0.997	-0.946	2.674	4.388	0.998	-0.952	<u>2.333</u>	4.286
	R-5-CQA-OH	0.996	-0.946	3.050	4.489	0.997	-0.952	2.737	4.083
B3LYP/6-311++G(2d,p)	S-5-CQA-OH	0.997	-0.945	2.452	4.484	0.998	-0.951	<u>2.049</u>	3.663
	R-5-CQA-OH	0.997	-0.945	2.847	4.471	0.997	-0.951	2.485	3.614
B3LYP/def2-QZVP	S-5-CQA-OH	0.997	-0.928	2.516	4.363	0.998	-0.934	<u>2.136</u>	3.908
	R-5-CQA-OH	0.996	-0.928	2.809	4.327	0.997	-0.933	2.506	3.734

teoretycznie przesunięć chemicznych oraz wartości parametrów opisujących dopasowanie (tj. współczynników determinacji, odchyłeń standardowych, współczynników kierunkowych oraz maksymalnych wartości różnic pomiędzy wartościami teoretycznymi i eksperymentalnymi przesunięć chemicznych oznaczonych odpowiednio jako R^2 , σ , a oraz $\Delta_{\max}$) dla poszczególnych par diastereoizomerów przedstawiono odpowiednio na rys. 19 oraz w Tabelach 2 i 3. Dla każdej z rozpatrywanych par uzyskano wysokie wartości współczynników determinacji, co stanowi dodatkowe potwierdzenie identyfikacji wyizolowanych związków jako adduktów 5-CQA-OH.

Porównanie parametrów dopasowania przesunięć jąder ^1H oraz ^{13}C nie pozwala jednak na jednoznaczne przypisanie zarejestrowanych sygnałów do poszczególnych diastereoizomerów. W przypadku przesunięć chemicznych protonów najlepsze dopasowanie wartości eksperymentalnych (oznaczonych jako 5-CQA-OH-1 exp. i 5-CQA-OH-2 exp.) do wartości teoretycznych (oznaczonych jako R-5-CQA-OH i S-5-CQA-OH) uzyskano dla par 5-CQA-OH-1 exp. i R-5-CQA-OH oraz 5-CQA-OH-2 exp. i R-5-CQA-OH, a w przypadku

rezonansu węglowego dla par 5-CQA-OH-1 exp. i S-5-CQA-OH oraz 5-CQA-OH-2 exp. i S-5-CQA-OH. Tak więc, dopasowania danych eksperymentalnych i wyznaczonych teoretycznie uzyskane dla rezonansu protonowego i węglowego są rozbieżne względem siebie. Poza tym, zarówno w przypadku danych ^1H i ^{13}C najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych każdego z diastereoizomerów otrzymuje się dla jednej struktury teoretycznej (t.j. R-5-CQA-OH dla ^1H i S-5-CQA-OH dla ^{13}C). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że obliczenia przesunięć chemicznych przeprowadzono również na poziomach B3LYP-D4/def2-QZVP oraz B3LYP-D4/6-311++G(2d,p). Doprowadziły one do analogicznych wniosków (patrz Tabela 3) nie pozwalając tym samym na rozróżnienie poszczególnych diastereoizomerów.

Przyczyn powyższego niepowodzenia może być wiele, np. brak bezpośredniego uwzględnienia wpływu cząsteczek rozpuszczalnika (efekty rozpuszczalnikowe dla powyższych obliczeń były zaimplementowane za pomocą metody CPMC) na przesunięcia chemiczne i populacje poszczególnych konformerów czy też wpływ efektów wibracyjnych. Przedstawione wyżej próby określenia konfiguracji diastereoizomerów 5-CQA-OH należy traktować jako temat poboczny, który nie był ujęty celem prezentowanych badań. Dlatego problem ten nie był dalej eksplorowany, gdyż rozpoznanie najważniejszych efektów oraz ich uwzględnienie w obliczeniach znacznie wykracza poza standardowo wykorzystywane metody DFT.

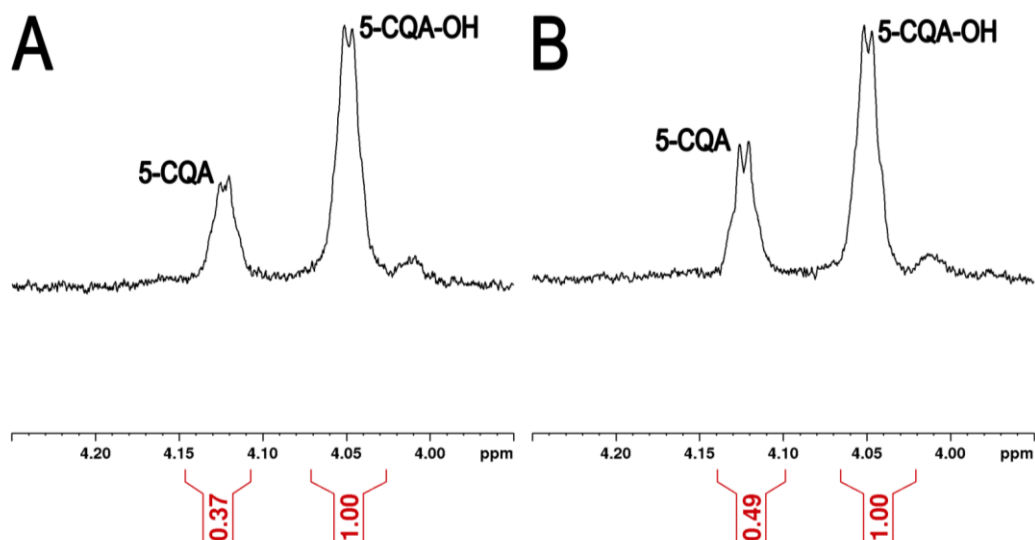
11.2. Stabilność wodnych adduktów 5-CQA

Analiza chromatogramów i widm NMR wyizolowanych frakcji poszczególnych wodnych adduktów 5-CQA (patrz rys. 15C, 15D i 16A, 16B) wskazuje na różne ilościowe relacje pomiędzy danym adduktem i 5-CQA jakie rejestruje każda z technik w tych frakcjach. O ile chromatogramy zebranych frakcji dowodzą, że każda z nich zawiera pojedynczy diastereoizomer w niewielkim stopniu zanieczyszczony drugim diastereoizomerem to widma NMR wykazują, że w badanych frakcjach poza w/w adduktami 5-CQA jest obecna także znaczna ilość 5-CQA. Zawartości poszczególnych diastereoizomerów oraz 5-CQA oszacowane na podstawie pomiarów LC-MS oraz NMR przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4 Stężenia 5-CQA i jego wodnych adduktów określone technikami LC-MS oraz NMR we frakcjach wyizolowanych za pomocą chromatografii preparatywnej.

Metoda pomiaru	Nr frakcji	Stężenie [%]		
		5-CQA	5-CQA-OH-1	5-CQA-OH-2
LC-MS	1	0.06	98.24	1.71
	2	0.05	7.65	92.30
NMR	1	26.15	69.62	4.23
	2	10.97	7.43	81.60

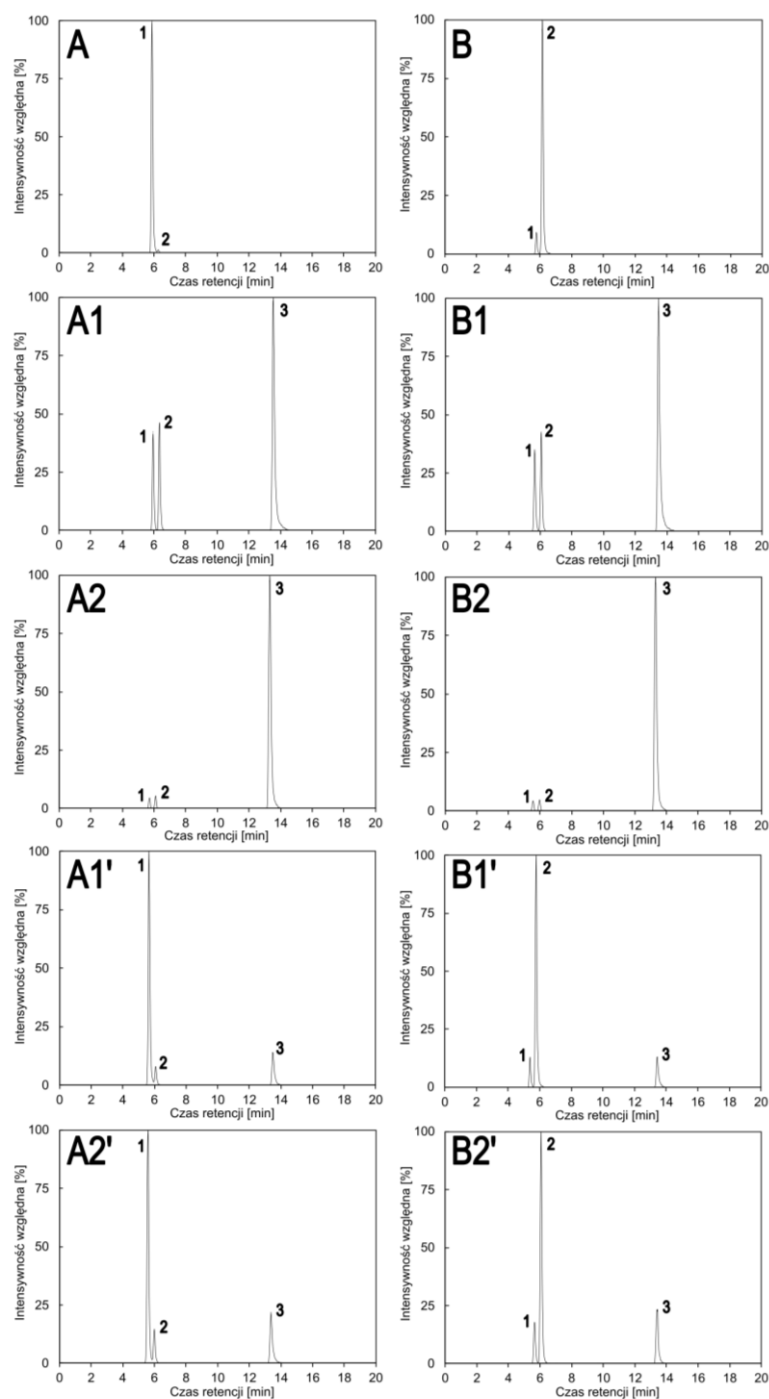
Z analizy tych danych wyraźnie wynika, że addukty 5-CQA ulegają częściowemu rozpadowi. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że widma NMR zostały zarejestrowane dla frakcji, które zaraz po wyodrębnieniu w skali rozdzielania preparatywnego zostały zamrożone i zliofilizowane. Tak otrzymane suche pozostałości zebranych frakcji rozpuszczono w deuterowanej wodzie i natychmiast poddano analizie NMR. Odnosząc się do zaprezentowanych w Tabeli 4 różnic i zakładając brak rozpadu poszczególnych adduktów w trakcie usuwania (metodą liofilizacji) fazy ruchomej z wyizolowanych frakcji należy wnosić, że rozpad adduktów ma miejsce w deuterowanej wodzie przed pomiarem NMR. Zaprezentowane wyniki sugerują, że tworzący się w trakcie ekstrakcji 5-CQA wodny addukt tego kwasu ulega rozkładowi w roztworze wodnym z odtworzeniem 5-CQA. Wstępnym potwierdzeniem powolnego rozpadu wodnych adduktów 5-CQA są zaprezentowane na rys. 20 fragmenty widm ^1H dla roztworu 5-CQA-OH-1 w D_2O uzyskane niedługo po rozpuszczeniu



Rys. 20. Fragmenty widm ^1H (D_2O , 600 MHz) zawierające obszary z sygnałami protonów H3 5-CQA-OH-1 i 5-CQA zarejestrowane od razu po rozpuszczeniu suchej frakcji 5-CQA-OH-1 (A) oraz po 5-cio dniowej inkubacji roztworu w temperaturze 25 C (B). Wartości intensywności integralnych pochodzące od 5-CQA-OH zostały na każdym z widm przyjęte jako wartość równa 1.00.

tego adduktu i po jego 5-cio dniowej inkubacji. Jak widać, podczas inkubacji otrzymanego roztworu zwiększyła się ilość 5-CQA, na co wskazuje wzrost stosunku intensywności integralnych 5-CQA i 5-CQA-OH-1.

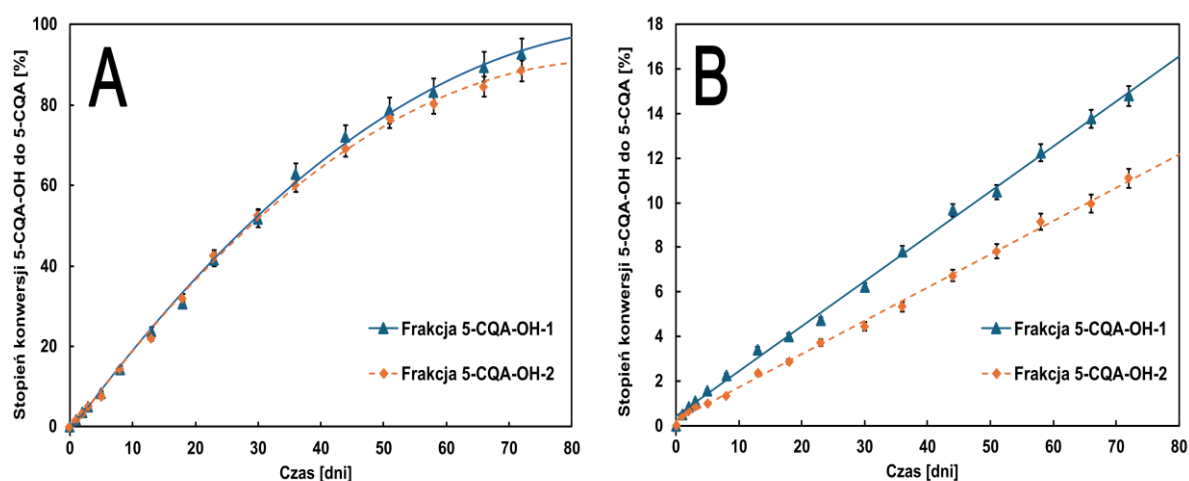
Bardziej jednoznacznym dowodem niestabilności wodnych adduktów 5-CQA są dane na rys. 21. Przedstawia on chromatogramy LC-MS świeżo wyizolowanych frakcji 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2 (patrz odpowiednio rys. 21 A i B) oraz tych samych frakcji po ich inkubacji przez 30 i 72 dni w temp 25°C (patrz odpowiednio rys. 21 A1, A2, B1 i B2) i w temp 5°C (patrz odpowiednio rys. 21 A1', A2' B1' i B2'). Jak wynika z chromatogramów, w badanym okresie czasu w temperaturze 25°C zachodzi niemal całkowite przekształcenie 5-CQA-OH do 5-CQA w każdej z frakcji. W temp 5°C proces ten jest znacznie wolniejszy. Poza tym ogólnym wnioskiem chromatogramy na rys. 21 wskazują na przekształcenie jednego izomeru w drugi (5-CQA-OH-1 w 5-CQA-OH-2 i 5-CQA-OH-2 w 5-CQA-OH-1). Jest to bardzo wyraźne w temp. 25°C (patrz zbliżone co do wielkości sygnały od każdego z izomerów), zaś mniej wyraźne w temp 5°C. Kinetykę degradacji 5-CQA-OH



Rys. 21. Chromatogramy LC-MS (tryb SIM):
 (A) wyjściowej frakcji 5-CQA-OH-1,
 (A1) frakcji 5-CQA-OH-1 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
 (A2) frakcji 5-CQA-OH-1 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
 (A1') frakcji 5-CQA-OH-1 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 5°C,
 (A2') frakcji 5-CQA-OH-1 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 5°C,
 (B) wyjściowej frakcji 5-CQA-OH-2,
 (B1) frakcji 5-CQA-OH-2 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
 (B2) frakcji 5-CQA-OH-2 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
 (B1') frakcji 5-CQA-OH-2 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 5°C,
 (B2') frakcji 5-CQA-OH-2 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 5°C.
 Pik 1 – 5-CQA-OH-1, pik 2 – 5-CQA-OH-2, pik 3 – 5-CQA.

zaprezentowano na rys. 22. Zależności dla frakcji 5-CQA-OH-1 oraz 5-CQA-OH-2 w temperaturze 25°C dla okresu pierwszych 30 dni mają liniowy przebieg. Dalszy przebieg zmian charakteryzuje się niewielkim spadkiem szybkości degradacji 5-CQA-OH w każdej z frakcji (patrz rys. 22A). Jak wynika z rys. 22B, przekształcenie 5-CQA-OH do 5-CQA w temperaturze 5°C przebiega ze stałą szybkością. Zakładając, że degradacja 5-CQA-OH zachodzi według tego samego mechanizmu w każdej z temperatur, to należy się spodziewać podobnych zmian szybkości reakcji w temperaturze 5°C jak w 25°C. Nie jest to jednak obserwowane w okresie 72 dni (rys. 22B). Warto również zauważyć, że szybkość degradacji 5-CQA-OH w temperaturze 5°C w poszczególnych frakcjach jest zróżnicowana – rozpad 5-CQA-OH-1 zachodzi szybciej niż 5-CQA-OH-2.

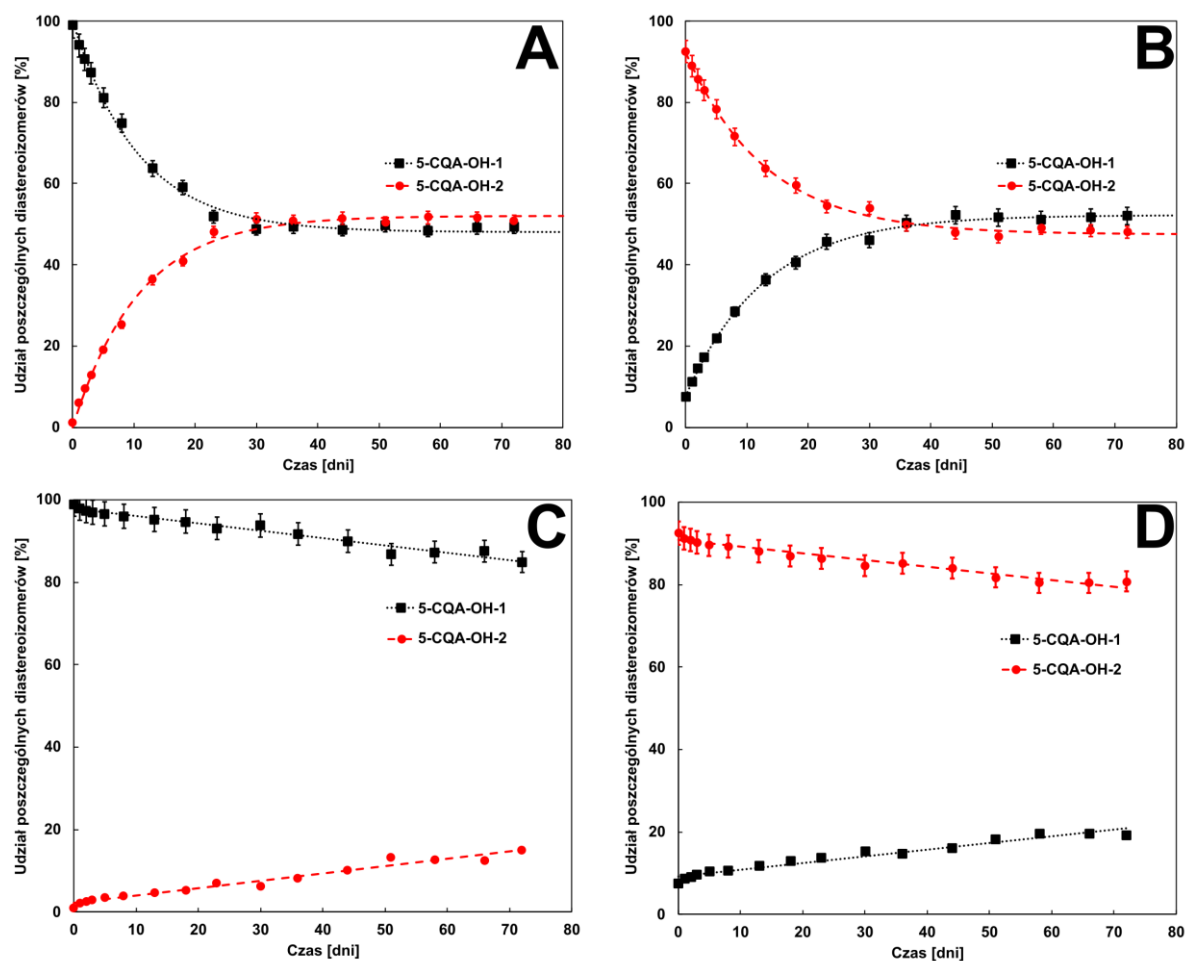
Wobec powyższych dowodów wskazujących na powolny rozpad wodnego adduktu 5-CQA w trakcie inkubacji jego wodnego roztworu zastanawiające jest tworzenie się tego adduktu w trakcie wysokotemperaturowej ekstrakcji 5-CQA. Można to jednak wytłumaczyć niewielką różnicą w kinetyce tworzenia i rozpadu adduktu, która w warunkach wysokotemperaturowej ekstrakcji (w temperaturze wrzenia wodnego roztworu 5-CQA) może być na tyle „korzystna” dla tworzenia adduktu, że za pomocą analizy LC-MS można stwierdzić jego 1-3 % ilości w ekstrakcie.



Rys. 22. Degradacja 5-CQA-OH do 5-CQA w trakcie inkubacji wyizolowanych za pomocą chromatografii preparatywnej frakcji 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2 w temperaturze 25 (A) i 5°C (B).

11.3. Izomeryzacja 5-CQA-OH w trakcie inkubacji

Zasadniczy wniosek wynikający z poprzedniego podrozdziału to powolny rozpad wodnych adduktów 5-CQA w ich roztworach wodnych. Inną istotną informacją jest izomeryzacja każdego z adduktów w trakcie inkubacji ich chromatograficznie wyizolowanych frakcji. Przebieg tego procesu podczas długookresowej inkubacji w temperaturze 25°C oraz



Rys. 23. Przebieg izomeryzacji 5-CQA-OH w trakcie inkubacji frakcji: 5-CQA-OH-1 w temperaturze 25°C (A) i 5°C (C) oraz 5-CQA-OH-2 w temperaturze 25°C (B) i 5°C (D).

5°C w każdej z wyizolowanych frakcji prezentuje rys. 23. Z jego analizy wynika, że:

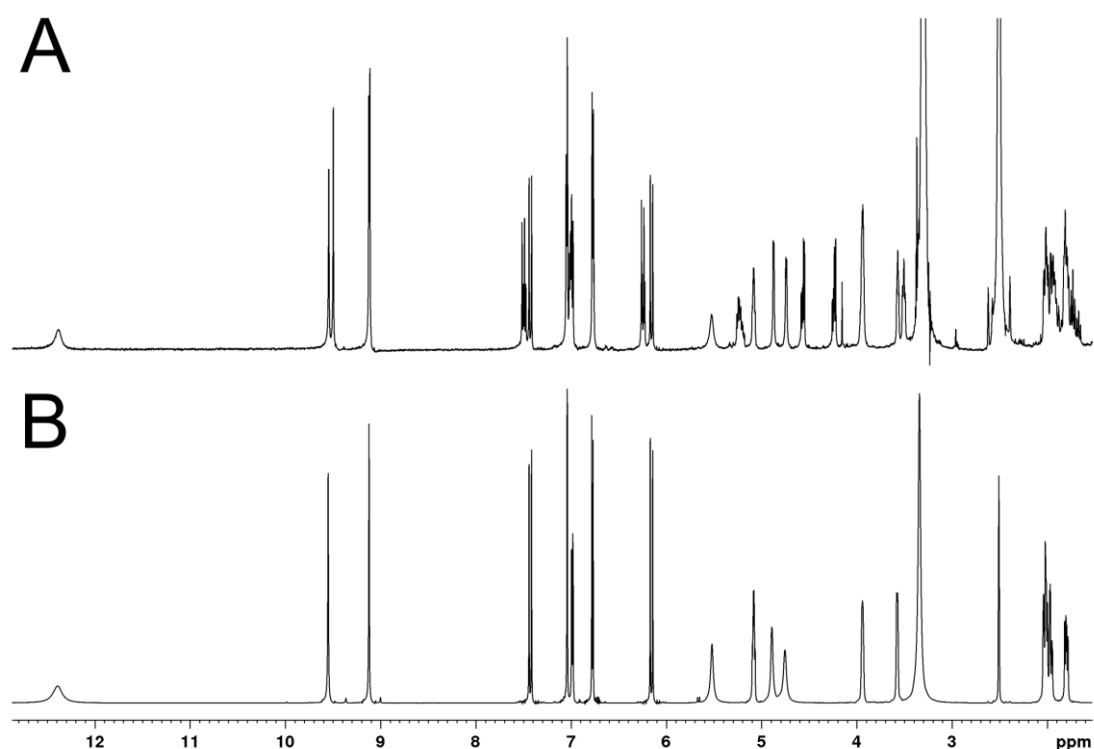
- pełna izomeryzacja poszczególnych diastereoizomerów w temp. 25°C do mieszaniny około 50/50 % następuje po około 23 dniach w przypadku 5-CQA-OH-1 (patrz rys. 23A) i około 30 dniach w przypadku 5-CQA-OH-2 (patrz rys. 23B),
- w temp. 5°C w badanym okresie izomeryzacja każdego z diastereoizomerów nie przekracza 20 %,
- dłuższy czas potrzebny na pełną izomeryzację 5-CQA-OH-2 w temp. 25°C (patrz rys. 23A i 23B) oraz mniejsza szybkość jego izomeryzacji w temp 5°C (patrz nachylenia prostych na rys. 23C i 23D) wskazują na jego wyższą stabilność w badanych frakcjach.

Ostatni wniosek dodatkowo potwierdza wcześniej sformułowane twierdzenie o wolniejszej kinetyce reakcji przekształcenia 5-CQA-OH-2 do 5-CQA w temp. 5°C (patrz rys. 22B).

12. Analiza NMR suchych pozostałości po odparowaniu wody z ekstraktów 5-CQA

Jak zauważono wyżej, w trakcie ekstrakcji 5-CQA tworzą się wodne addukty 5-CQA (hydroksylowe pochodne 5-CQA). Ponieważ w roztworach wodnych ulegają one rozpadowi dlatego postanowiono przebadac metodą NMR suchą pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika z symulowanego ekstraktu 5-CQA spodziewając się uzyskania widm potwierdzających obecność związków będących przedmiotem zainteresowania. W badaniach tych sucha pozostałość była rozpuszczana nie w D₂O, a w innym klasycznym rozpuszczalniku wykorzystywanym w badaniach NMR'owskich, t.j. w DMSO-d₆. Ponieważ w wielu publikacjach sucha pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika z ekstraktu jest często określana mianem „suchy ekstrakt” dlatego też w dalszej części tej pracy termin ten będzie często wykorzystywany, co niejednokrotnie pozwoli skrócić sposób wyrażanej myśli.

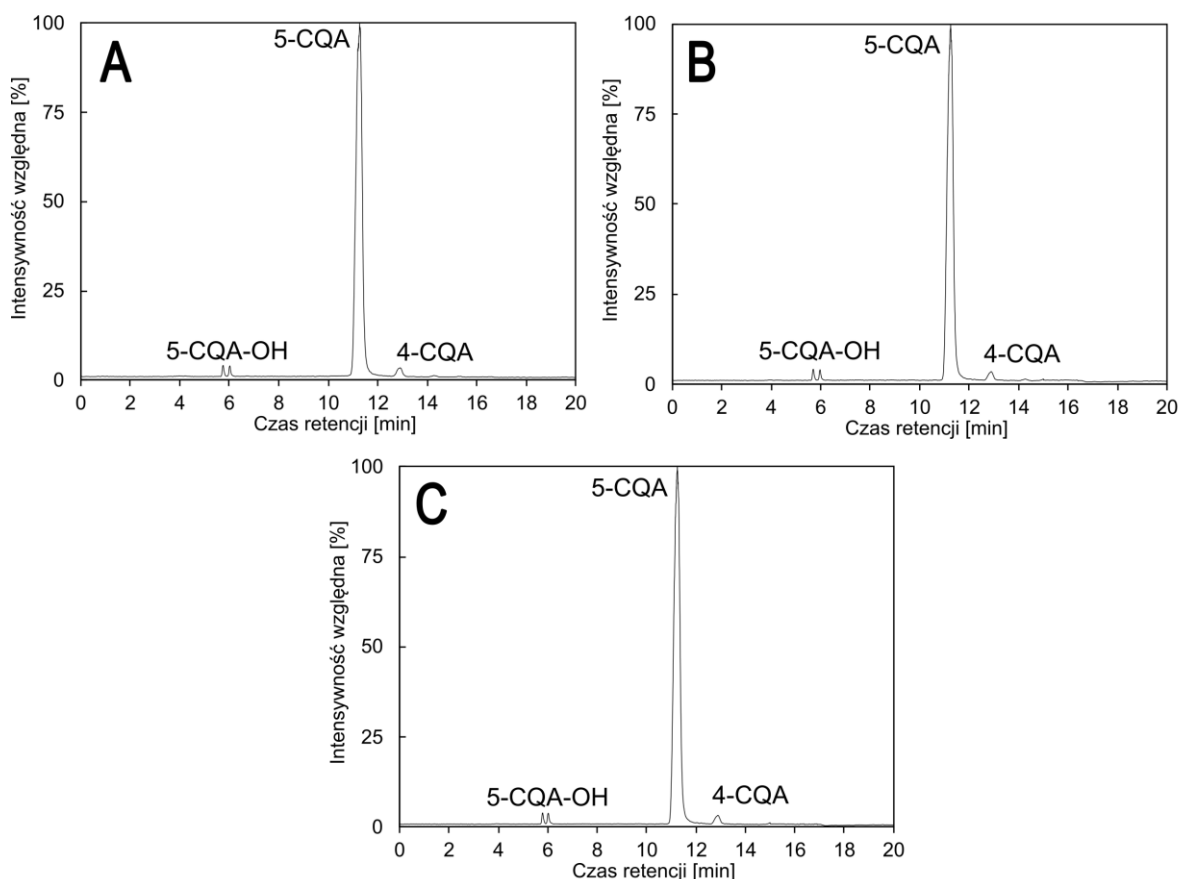
Rys. 24A przedstawia widmo suchej pozostałości uzyskanej po odparowaniu rozpuszczalnika z wodnego ekstraktu 5-CQA, którą rozpuszczono w DMSO-d₆.



Rys. 24. Widma ¹H (DMSO-d₆, 600 MHz) suchej pozostałości wodnego ekstraktu 5-CQA (A) oraz 5-CQA (B).

Widoczne są na nim częściowo nakładające się sygnały rezonansowe pochodzące od przynajmniej czterech substancji. Z porównania widma z rys. 24A z widmem 5-CQA (patrz rys. 24B) (oba w DMSO- d_6) wynika, że jedną z nich jest nieprzekształcony 5-CQA. Drugą substancją są wodne addukty 5-CQA o czym świadczą niewielkie sygnały w zakresie 6.8 – 6.6 ppm pochodzące od ich protonów aromatycznych grup katecholowych (patrz tabela 1). Na Rys. 24A widoczne są jeszcze sygnały pochodzące prawdopodobnie od dwóch kolejnych pochodnych 5-CQA. O obecności tych kolejnych pochodnych 5-CQA w badanej próbce dowodzi to, że w każdym z zakresów przesunięć chemicznych charakterystycznych dla poszczególnych jąder 5-CQA widoczne są trzy częściowo rozdzielone struktury multipletowe - jedna pochodzi od 5-CQA a dwie pozostałe od tych kolejnych pochodnych 5-CQA. Porównanie intensywności integralnych jasno wskazuje, że te dwie kolejne pochodne 5-CQA występują w próbce w podobnych ilościach jak sam 5-CQA.

Należy w tym miejscu podkreślić, że sama sucha pozostałość po jej rozpuszczeniu w wodzie, jak i sucha pozostałość rozpuszczona w DMSO- d_6 zostały poddane analizie LC-MS. Analizie LC-MS poddano także wyjściowy ekstrakt, z którego uzyskano suchą pozostałość. Ich chromatogramy prezentują odpowiednio rys. 25A, B i C. Jak widać, wszystkie trzy chromatogramy pod względem ilości pików i ich retencji są niemal identyczne. Żaden z chromatogramów nie wskazuje obecności dwóch kolejnych, wspomnianych wyżej pochodnych 5-CQA, które są widoczne na widmie NMR w suchej pozostałości rozpuszczonej DMSO- d_6 . Tak więc, wysoka zawartość 5-CQA w ekstraktach (patrz rys. 25A-C) sugeruje, że dwa dodatkowe układy sygnałów zaobserwowane na widmie 1H (rys. 24A) mogą pochodzić od pochodnych 5-CQA nietrwałych w warunkach rozdzielania chromatograficznego. Dotychczas w literaturze nie stwierdzono obecności pochodnych 5-CQA do których można byłoby przypisać dodatkowe układy sygnałów z widma na rysunku 24A. Mając na uwadze fakt, że pochodne te tworzą się w znacznych ilościach (jak na produkty przekształceń polifenoli) postanowiono poddać je szczegółowej identyfikacji z zastosowaniem technik NMR.



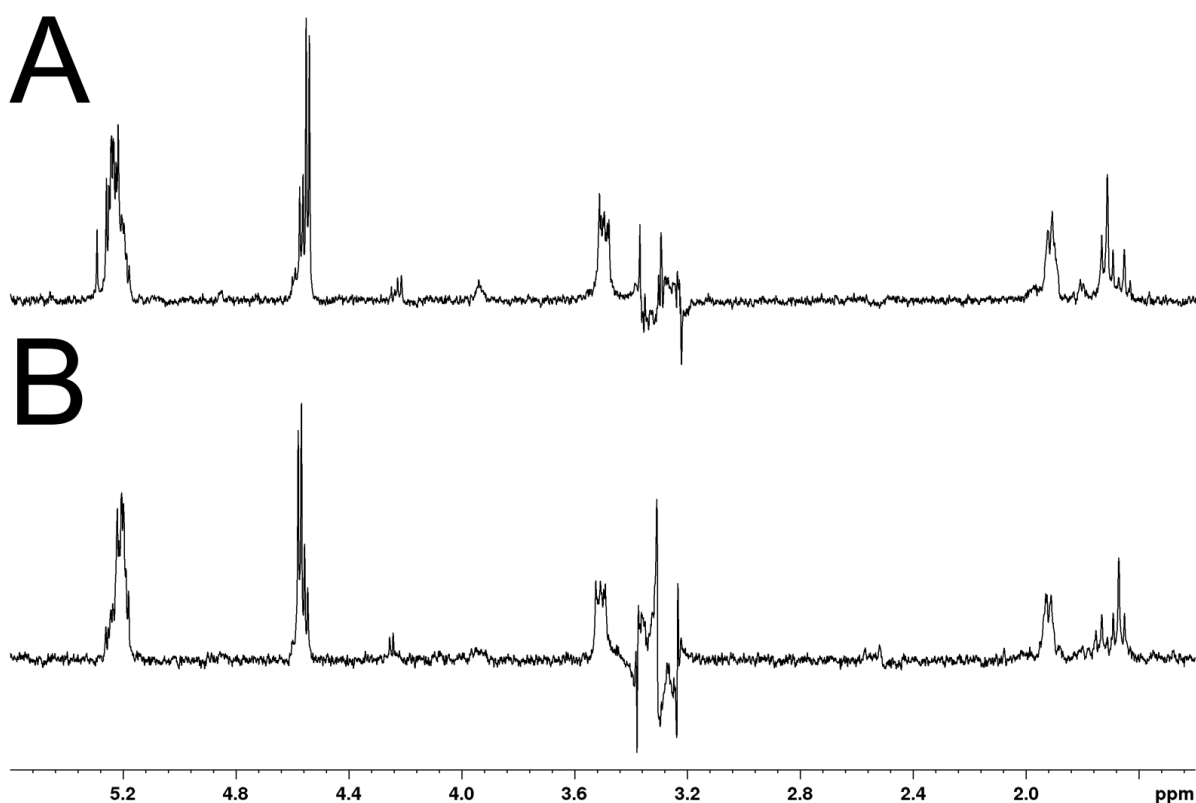
Rys. 25. Chromatogramy LC-MS (tryb SCAN):
 (A) suchego ekstraktu 5-CQA rozpuszczonego w wodzie,
 (B) suchego ekstraktu 5-CQA rozpuszczonego w DMSO- d_6 i
 (C) wyjściowego ekstraktu 5-CQA.
 Chromatogramy prezentują sygnały z zakresu m/z 300-1000.

12.1. Analiza widm NMR dwóch nowo wykrytych pochodnych 5-CQA

W celu identyfikacji dwóch nowo wykrytych pochodnych 5-CQA zarejestrowano szereg widm 2D oraz selektywnych widm 1D (patrz rys. 26 i 27).

W regionie przesunięć chemicznych 5.0-5.5 ppm, który jest zakresem charakterystycznym dla protonów metinowych przyłączonych do atomów węgla z atomem tlenu grupy estrowej (oznaczanych w przypadku 5-CQA jako H5), obecne są trzy sygnały. Multiplet występujący w pozycji 5.06 ppm pochodzi od jądra H5 5-CQA, natomiast dwa częściowo nakładające się na siebie multiplety w zakresie od 5.17 do 5.26 ppm pochodzą od jąder H5 nowo wykrytych pochodnych. Celem dalszej identyfikacji układów spinowych zawierających powyższe jądra zarejestrowano selektywne widma 1D TOCSY (patrz rys. 26)

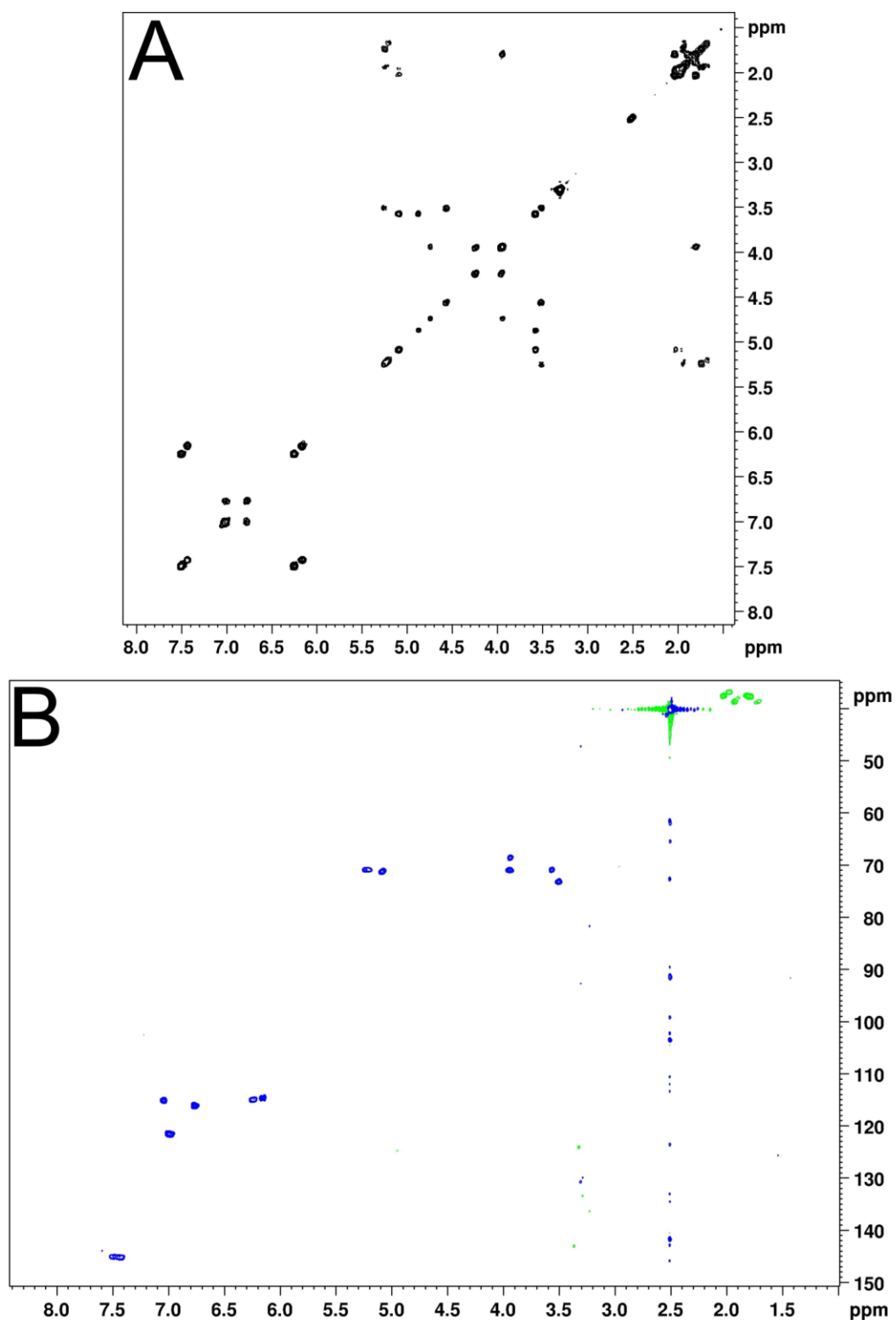
oraz widma 2D ^1H - ^1H COSY, 2D ^1H - ^{13}C HSQC suchych pozostałości w DMSO- d_6 (patrz rys. 27). Widma 1D TOCSY wykorzystują selektywne wzbudzenie lub selektywne echo spinowe magnetyzacji określonego jądra, która jest następnie przenoszona do pozostałych jąder w układzie spinowym [216]. Otrzymane w ten sposób widma zawierają wyłącznie sygnały rezonansowe pochodzące od początkowego jądra oraz kolejnych jąder z układu spinowego. Na widmie 1D TOCSY otrzymanym dla jądra H5 o przesunięciu 5.23 ppm widoczne są sygnały w pozycjach 5.23 ppm, 4.60 ppm, 4.23 ppm, 3.97 ppm, 3.51 ppm, 1.93 ppm, 1.81–1.79 ppm oraz 1.73 ppm (patrz rys. 26A). Widmo COSY zawiera sygnały korelacyjne występujące pomiędzy protonem H5 oraz sygnałami protonów w pozycjach 3.51 ppm, 1.93 ppm i 1.73 ppm. Piki korelacyjne widoczne na widmie HSQC dla dwóch ostatnich sygnałów protonowych występują przy takiej samej wartości przesunięcia chemicznego jąder ^{13}C , t.j. 38.7 ppm, co jasno wskazuje, że omawiane sygnały pochodzą od protonów grupy metylenowej. Ich pozycje rezonansowe oraz korelacje są analogiczne jak w przypadku protonów H6 5-CQA (patrz tabela 5). Proton w pozycji



Rys. 26. Widma 1D TOCSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) otrzymane w wyniku selektywnego echa spinowego protonów H5 w pozycjach 5.23 ppm (A) i 5.19 ppm (B). Sygnały w zakresie 3.2-3.4 ppm pochodzą od wody.

3.51 ppm wykazuje kolejne korelacje względem jąder generujących sygnały o wartościach przesunięć 4.56 ppm oraz 3.97 ppm. Brak pików korelacyjnych dla protonu 4.56 ppm na widmie HSQC wskazuje na obecność grupy hydroksylowej. Biorąc pod uwagę pozycję sygnału korelacyjnego HSQC występującego dla protonu 3.51 ppm (wartość przesunięcia jądra ^{13}C wynosi 73.2 ppm) oraz dodatnią wartość tego pik, pochodzi on od protonu metinowego oznaczanego jako H4, a wykryta grupa hydroksylowa jest przyłączona do atomu C4. Analogiczny układ sygnałów korelacyjnych pozwala na zidentyfikowanie sygnałów o przesunięciach 3.97 ppm i 4.23 ppm odpowiednio jako protonu H3 z grupy metinowej i protonu grupy hydroksylowej przyłączonej do tej grupy metinowej (grupy OH3). W przypadku sygnałów protonowych z zakresu 1.81-1.79 ppm obserwuje się sygnał korelacyjny względem protonu H3 i wartości przesunięć węglowych charakterystycznych dla grup metylenowych. Sygnały te odpowiadają protonom metylenowym H2. Analiza przeprowadzona dla sygnałów protonów z układu spinowego zawierającego proton dający sygnał w pozycji 5.19 ppm (patrz rys. 26B) wykazuje obecność analogicznych grup oraz ich połączeń w drugiej z pochodnych. Przedstawione rozważania pokazują, że obydwa produkty przemian 5-CQA zawierają w swojej strukturze resztę kwasu chinowego z grupą estrową przyłączoną do atomu C5. Na widmach ^1H nie obserwuje się odrębnych sygnałów pochodzących od grup OH1 oraz grupy karboksylowej. Jednak biorąc pod uwagę, że w przypadku 5-CQA sygnały od tych protonów występują w postaci szerokich singletów, mogą one tworzyć nierozdzielone sygnały ze względu na niewielkie różnice w przesunięciach chemicznych.

Stereochemia omawianych fragmentów alkilowych została określona na podstawie wartości stałych sprzężeń spinowo-spinowych. Sygnały pochodzące od protonów H5 pochodnych 5-CQA występują w postaci dubletów dubletów dubletów. Zaobserwowane wartości stałych sprzężeń jąder H5 - 11.0 Hz, 9.9 Hz, 5.0 Hz oraz 10.7 Hz, 9.8 Hz, 5.0 Hz są wartościami stałych sprzężeń odpowiednio z protonami H2_{ax}, H4 oraz H2_{eq} (indeksy dolne ax oraz eq wskazują na aksjalną oraz ekwatorialną orientację jądra). Wysokie wartości stałych sprzężeń pomiędzy jądrami H5 oraz H4 wskazują na ich aksjalną orientację. Stałe sprzężeń zaobserwowana dla pary jąder H4-H3 wynoszące 3.4 Hz w każdej z pochodnych wynikają z ekwatorialnego położenia jąder H3. Przytoczone argumenty pokazują, że stereochemia grup kwasu chinowego w omawianych pochodnych jest identyczna jak w przypadku tej grupy w nieprzekształconym 5-CQA.

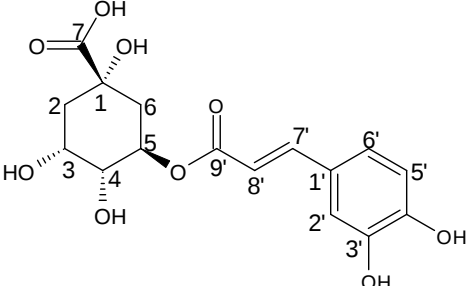


Rys. 27. Widma (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz) ^1H - ^1H COSY (A) oraz ^1H - ^{13}C HSQC (B) suchej pozostałości wodnego ekstraktu 5-CQA.
Na widmie HSQC sygnały dodatnie (kolor niebieski) pochodzą od grup CH oraz CH₃, a sygnały ujemne (kolor zielony) pochodzą od grup CH₂.

Wartości przesunięć chemicznych zaobserwowane na widmach jednowymiarowych i widmach korelacyjnych oraz częściowo widoczne struktury multipletowe sygnałów w zakresie od 6.7 do 7.1 ppm wskazują na obecność pierścieni aromatycznych w postaci grup katecholowych (tj. grup 3,4-dihydroksyfenylowych) w strukturze pochodnych 5-CQA, co potwierdza obecność dodatkowych sygnałów protonów OH w zakresie 9-10 ppm. W obszarach przesunięć 6.1-6.3 ppm oraz 7.4-7.55 ppm obserwuje się obecność dubletów, które można przypisać do trzech par sprzężonych ze sobą protonów alkenowych, gdzie jedna z nich pochodzi od 5-CQA, a pozostałe są grupami zawartymi w produktach przemian 5-CQA. Stałe sprzężeń protonów olefinowych badanych związków wynoszą 16.0 Hz, co świadczy o konfiguracji trans wiązań alkenowych. Zaobserwowane fragmenty nienasycone obecne w pochodnych 5-CQA wskazują więc na obecność reszt kwasu kawowego.

Liczba sygnałów rezonansowych i rodzaj przypisanych im grup, połączenia występujące pomiędzy poszczególnymi fragmentami strukturalnymi oraz stereochemia grup kwasu kawowego i grup kwasu chininowego w pochodnych 5-CQA są takie same jak w przypadku związku wyjściowego. Ponadto na omawianych widmach nie obserwuje się sygnałów od grup, które nie należą do układów spinowych kwasów chlorogenowych. Omawiane pochodne nie są w takim razie związkami powstającymi w wyniku reakcji chemicznych. Wskazuje to, że są one kompleksami powstającymi w wyniku oddziaływania 5-CQA z innymi cząsteczkami, np. wodą lub DMSO lub w wyniku samoasocjacji. Ostatnia z przedstawionych propozycji jest mało prawdopodobna w przypadku DMSO, który tworzy silne oddziaływania z grupami nienasyconymi [33, 218-221], co w znacznym stopniu wyklucza powstawanie oddziaływań π - π odpowiedzialnych za samoasocjację kwasów chlorogenowych [34]. Gdyby z kolei tworzyły się asocjaty 5-CQA i DMSO (kompleksy 5-CQA-DMSO), to ich pasma powinny być widoczne nie tylko na widmie NMR badanej próbki, ale także na widmie 5-CQA rozpuszczonego w DMSO (bez wcześniejszej ekstrakcji 5-CQA w środowisku wodnym). Jak pokazano w następnym akapicie zawartość obserwowanych kompleksów 5-CQA zmienia się wraz z warunkami prowadzenia jego symulowanej ekstrakcji wodnej. Tak więc na podstawie powyższych argumentów należy stwierdzić, że na widmach obserwuje się pasma pochodzące od kompleksów powstających pomiędzy 5-CQA oraz cząsteczkami wody (oznaczanych dalej jako 5-CQA*H₂O oraz 5-CQA*H₂O-1 i 5-CQA*H₂O-2).

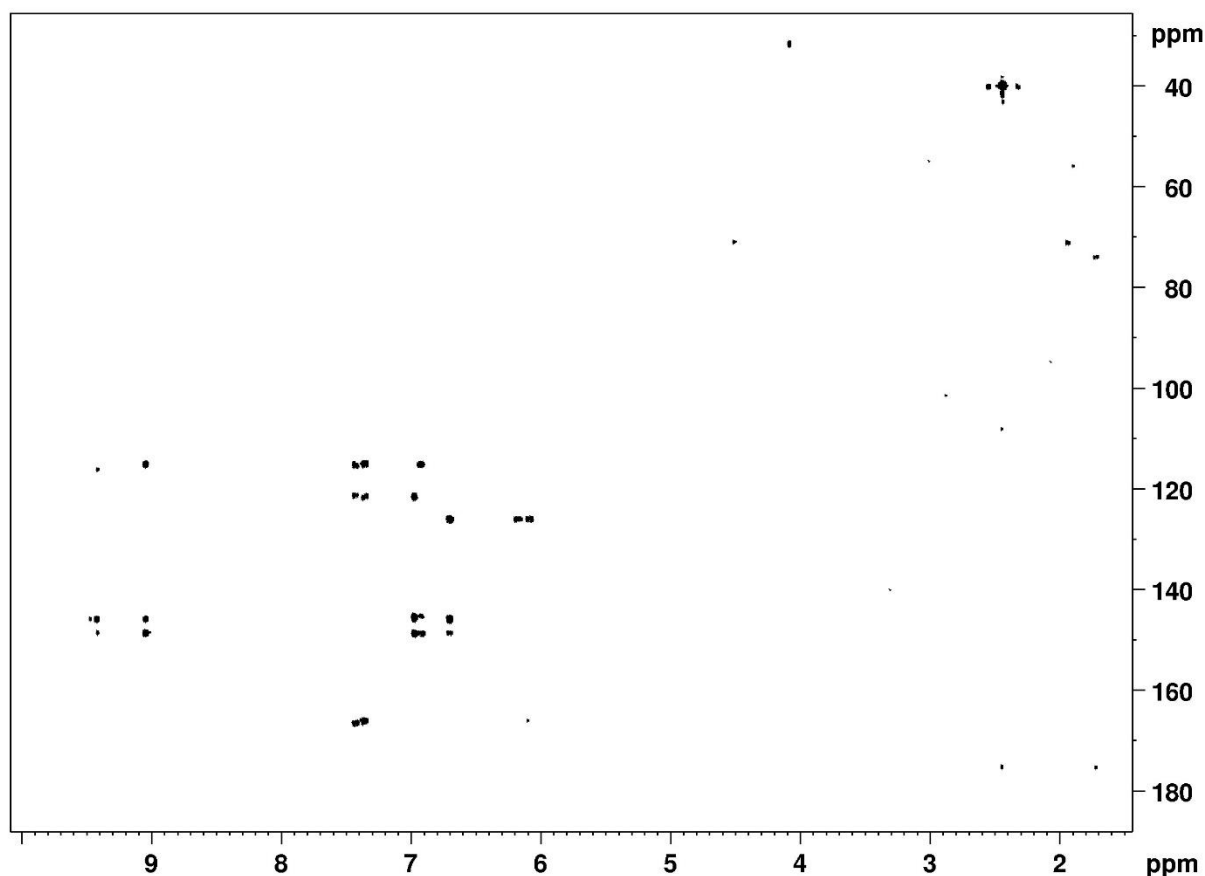
Tabela 5 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA oraz kompleksów 5-CQA*H₂O (DMSO-d₆, 600 MHz i 125 MHz).

						
Nr jądra ^(a)	5-CQA		Kompleks 5-CQA*H ₂ O-1		Kompleks 5-CQA*H ₂ O-2	
	¹ H ^(a)	¹³ C	¹ H ^(a)	¹³ C	¹ H ^(a)	¹³ C
1	-	74.0	-	79.5	-	79.3
OH1	5.53 (brs)	-	5.53 (brs)	-	5.53 (brs)	-
2_{ax}	2.02 (dd, <i>J</i> = 13.1, 3.8 Hz)	37.7	1.81-1.79 (m)	37.6	1.81-1.79 (m)	37.6
2_{eq}	1.78 (dd, <i>J</i> = 13.1, 7.6 Hz)		1.81-1.79 (m)		1.81-1.79 (m)	
3	3.94 (m)	68.8	3.97 (m)	70.9	3.94 (m)	70.9
OH3	4.74 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz)	-	4.23 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	-	4.25 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	-
4	3.56 (ddd, <i>J</i> = 6.5, 5.2, 3.1 Hz)	70.8	3.51 (ddd, <i>J</i> = 9.8, 7.0, 3.3 Hz)	73.2	3.50 (ddd, <i>J</i> = 9.7, 7.1, 3.4 Hz)	73.2
OH4	4.88 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz)	-	4.56 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz)	-	4.58 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz)	-
5	5.06 (td, <i>J</i> = 6.9, 4.1 Hz)	71.3	5.23 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 9.9, 5.0 Hz)	71.0	5.19 (ddd, <i>J</i> = 10.7, 9.8, 5.0 Hz)	71.0
6_{ax}	2.00 (m)	36.7	1.73 (t, <i>J</i> = 11.8 Hz)	38.7	1.67 (t, <i>J</i> = 11.8 Hz)	38.7
6_{eq}	1.94 (dd, <i>J</i> = 13.2, 3.9 Hz)		1.93 (m)		1.91 (m)	
7	12.4 (brs)	175.5	12.4 (brs)	178.0	12.4 (brs)	178.0
2'	7.03 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	115.1	7.05 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	115.3	7.04 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz)	115.3
5'	6.76 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	116.2	6.77 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	116.3	6.76 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	116.3
6'	6.98 (dd, <i>J</i> = 8.2, 2.0 Hz)	121.8	7.02-7.00 (m)	121.7	7.02-7.00 (m)	121.7
7'	7.41 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	145.4	7.50 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz)	145.3	7.48 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz)	145.3
8'	6.15 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	114.7	6.26 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	115.1	6.25 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz)	115.1
9	-	166.2	-	166.6	-	166.6

a) ax – położenie aksjalne, eq – położenie ekwatorialne.

b) brs- szeroki singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, ddd – dublet dubletów dubletów, dt – dublet tripletów, t – triplet, td – triplet dubletów, m – złożony multiplet.

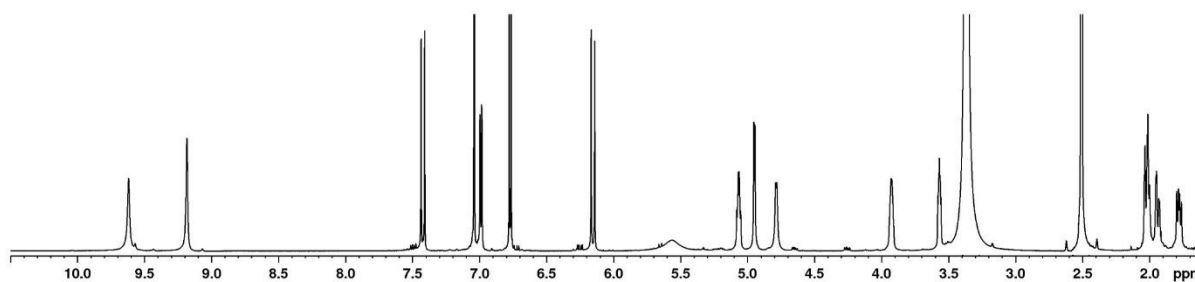
Dane z widm NMR dla 5-CQA oraz jego nowo wykrytych pochodnych przedstawiono w tabeli 5. Wartości przesunięć chemicznych jąder ¹³C zostały odczytane z widm 1D ¹³C oraz 2D ¹H-¹³C HSQC. Widmo ¹H-¹³C HMBC otrzymane dla badanej próbki przedstawiono na rys. 28. Piki korelacyjne widoczne dla protonów z grup nienasyconych potwierdzają przypisanie sygnałów w tabeli 5. W przypadku grup alifatycznych obserwuje się znacznie mniej pików korelacyjnych, co może być spowodowane ograniczoną ilością poszczególnych form badanego kwasu chlorogenowego (całkowita ilość 5-CQA w próbce wykorzystanej do symulowanej ekstrakcji wynosiła 2 mg) oraz małymi wartościami stałych sprzężeń. W celu



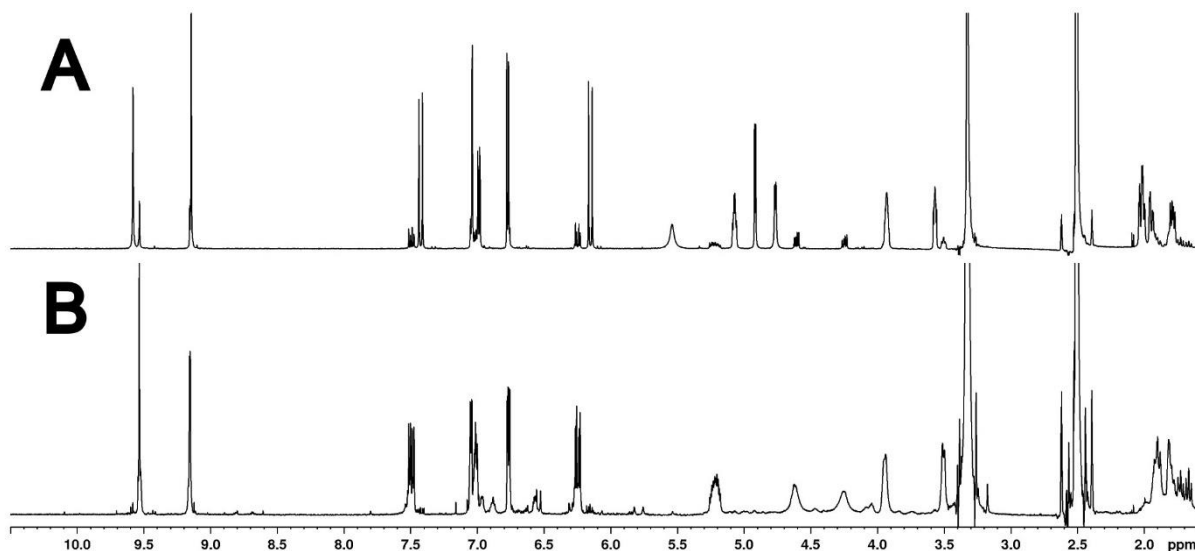
Rys. 28. Widmo ^1H - ^{13}C HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz) suchej pozostałości wodnego ekstraktu 5-CQA.

otrzymania większych ilości identyfikowanych pochodnych 5-CQA przeprowadzono ekstrakcję jego większej próbki (5 mg) stosując tą samą objętość wody jak w przypadku 2 mg próbki. Widmo ^1H suchej pozostałości otrzymanej z większej próbki przedstawia rys. 29. Jedynie 6 % całkowitej zawartości 5-CQA stanowią jego kompleksy z wodą. To sugeruje, że na wydajność powstawania kompleksów 5-CQA z wodą ma wpływ początkowe stężenie 5-CQA. Ze względu na niski stopień konwersji 5-CQA do jego pochodnych w roztworach o jego wysokim stężeniu nie podejmowano dalszych prób rejestracji widm ^1H - ^{13}C HMBC.

Dla pełnego obrazu należy w tym miejscu zaznaczyć, że widma przedstawione na rys. 24 i 29 zostały otrzymane dla suchych pozostałości uzyskanych po odparowaniu wody z ekstraktów 5-CQA otrzymanych w temp. wrzenia roztworów (ok. 100°C). Na rys. 30 zaprezentowano widma odpowiadające suchym pozostałościom uzyskanym po odparowaniu wody z ekstraktów 2 mg próbki 5-CQA, które otrzymano odpowiednio w temp.



Rys. 29. Widmo ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) suchej pozostałości z wodnego ekstraktu 5-CQA o stężeniu 2.5 mg/mL.



Rys. 30. Widma ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) suchych pozostałości otrzymanych z ekstraktów 5-CQA, które przed odparowaniem wody inkubowano 1 godz. w temperaturach 30°C (A) oraz 140°C (B). Wyściowe stężenie 5-CQA - 1 mg/mL.

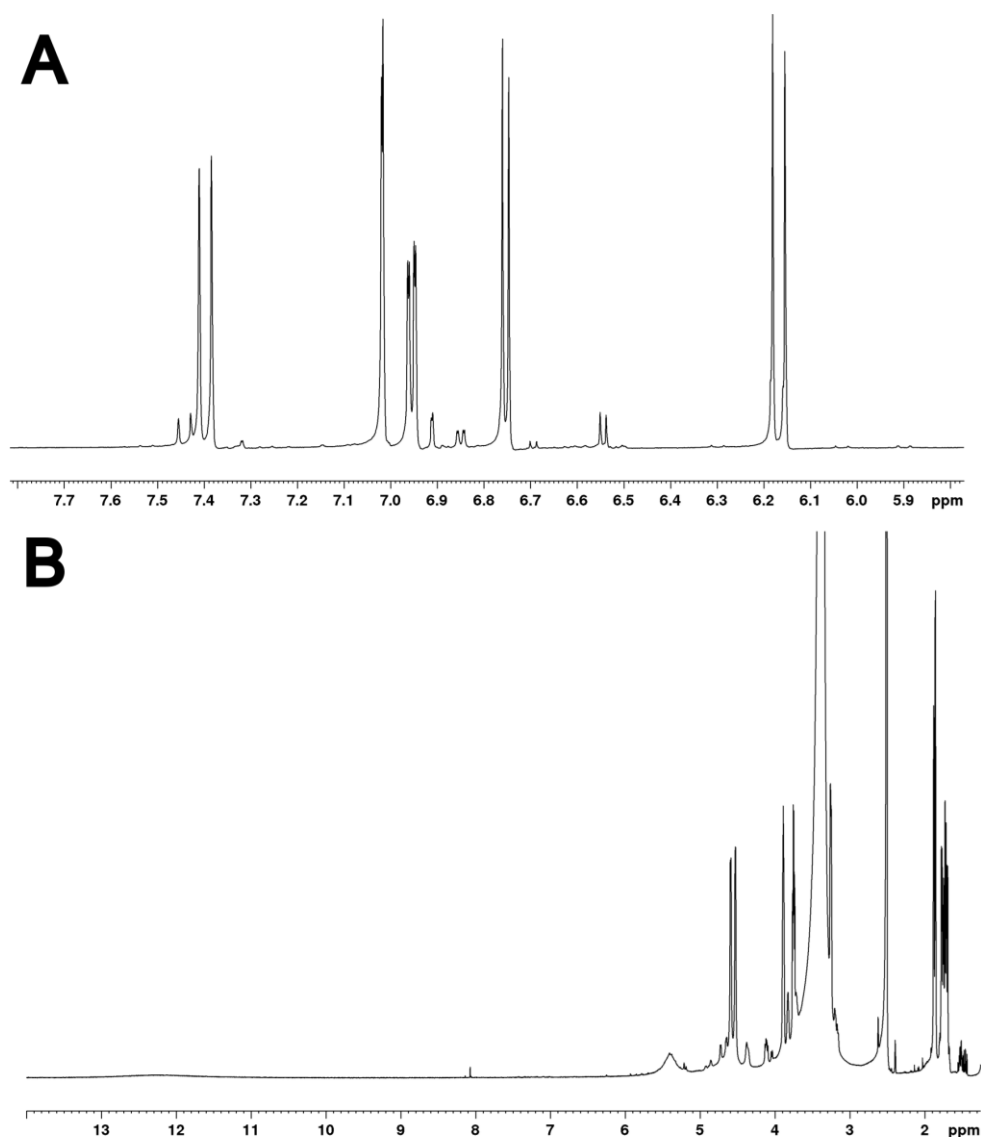
30 (A) i 140°C (B). Jak widać, w pierwszym przypadku badana próbka zawiera około 21 %, a w drugim 90 % wodnych kompleksów 5-CQA. Wynika z tego, że na wydajność tworzenia się tych kompleksów ma wpływ nie tylko stężenie 5-CQA, ale także warunki prowadzenia procesu ekstrakcji.

12.2. Struktura kompleksów 5-CQA*H₂O

Jak wykazano na podstawie analizy widm przedstawionych na rys. 24 i 26-28, w wyniku symulowanej ekstrakcji roztworów wodnych 5-CQA pod refluksiem oraz inkubacji wodnych roztworów 5-CQA powstają kompleksy 5-CQA z wodą, które są stabilne w roztworach DMSO- d_6 , zaś rozpadają się podczas chromatograficznego rozdzielania prowadzonego w odwróconym układzie faz. Na widmach NMR tych próbek nie obserwuje się

jednak odrębnego sygnału lub sygnałów pochodzących od wody skoordynowanej z 5-CQA. Nie jest to zaskoczeniem, gdyż takie protony ulegają wymianie chemicznej z innymi silnie polarnymi grupami. Zazwyczaj w takich wypadkach wykonuje się analizy NMR w niższych temperaturach, co zmniejsza szybkość wymiany chemicznej i w wielu przypadkach prowadzi do pojawienia się odrębnych sygnałów od jąder, które wcześniej zbyt szybko zmieniały swoje otoczenie chemiczne [216, 222]. W przypadku dimetylosulfotlenku, wysoka wartość jego temperatury topnienia uniemożliwia takie postępowanie. Dlatego też potwierdzenie obecności skoordynowanej wody oraz określenie sposobu jej oddziaływania z cząsteczką 5-CQA w kompleksach 5-CQA*H₂O zostało dokonane na bazie dodatkowych eksperymentów z wykorzystaniem kwasu chinowego i kawowego oraz bardziej dogłębnej analizy widm kompleksów.

Jak wiadomo kwas chlorogenowy jest estrem kwasu chinowego oraz kawowego. Każdy z wymienionych kwasów zawiera grupy zdolne do oddziaływania z wodą. Dlatego postanowiono zbadać za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego suche pozostałości po ekstrakcji tych związków wodą. Widma ¹H otrzymanych próbek w DMSO-d₆ przedstawiono na rys. 31A i 31B. W przypadku próbki kwasu kawowego widoczne są dodatkowe sygnały pochodzące od protonów aromatycznych i alkenowych, co świadczy o tym, że obecne w próbce cząsteczki kwasu kawowego najprawdopodobniej uczestniczą w dodatkowych oddziaływaniach. Jednak zaobserwowane zmiany przesunięć chemicznych (zmiany wynoszące od 0.05 ppm do 0.2 ppm) nie są zgodne z różnicami pozycji rezonansowych występującymi pomiędzy protonami aromatycznymi 5-CQA i jego kompleksami z wodą, w przypadku których są one znacznie mniejsze i wynoszą 0.01-0.03 ppm. Na dodatek jest to wzrost wartości przesunięć w przeciwieństwie spadku do zaobserwowanego na rys. 31A. Widmo protonowe suchej pozostałości ekstraktu kwasu chinowego (patrz rys. 31B) zawiera sygnały od związku wyjściowego oraz dodatkowe sygnały, których intensywności integralne nie przekraczają 10 % intensywności sygnałów związku nieprzekształconego, co wraz z ich nakładaniem się uniemożliwia jednoznaczne przypisanie ich do określonych jąder. Jednak na widmie 2D NOESY otrzymanym dla kwasu chinowego (patrz rys. 32) obserwuje się sygnały korelacyjne występujące pomiędzy protonami metinowymi i wodą (z wyjątkiem protonu H₄) oraz słabsze sygnały korelacyjne pomiędzy ekwatorialnymi protonami metylenowymi i wodą. Wymienione sygnały



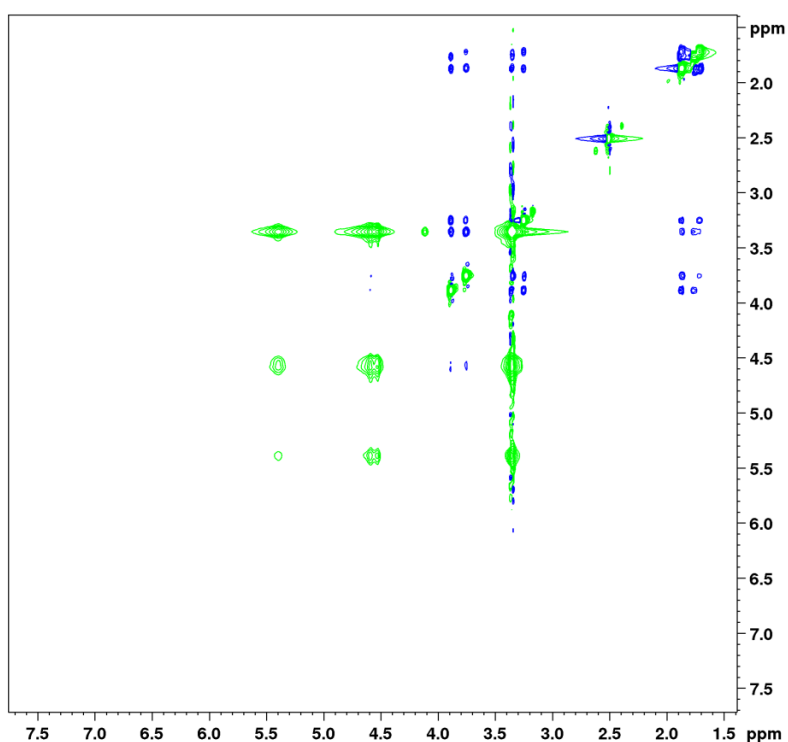
Rys. 31. Widma ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchych pozostałości otrzymanych po odparowaniu wody z symulowanego ekstraktu kwasu kawowego (A) oraz kwasu chinowego (B). Wg. [P1].

świadczą o występowaniu oddziaływań pomiędzy grupami hydroksylowymi oraz wodą, które są obecne nawet w tak silnie polarnym rozpuszczalniku jakim jest dimetylosulfotlenek.

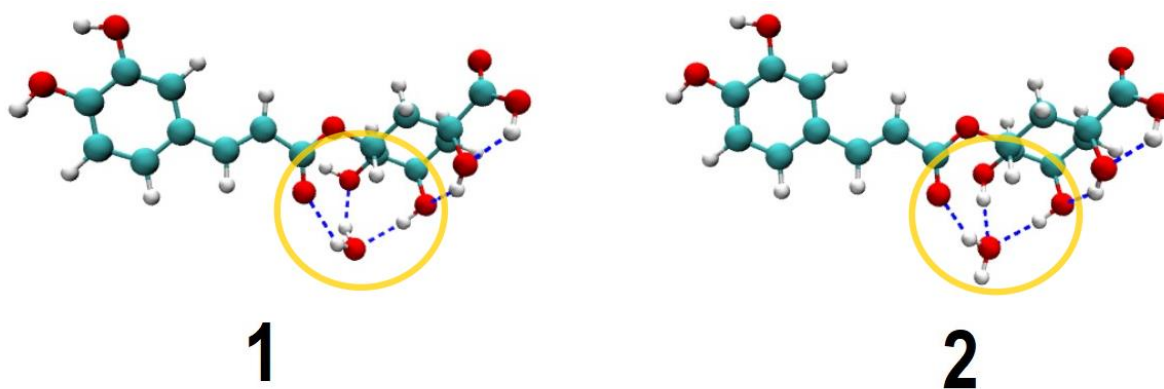
Warto w tym miejscu zauważyć, że kwas chlorogenowy posiada także grupę estrową. Położona jest ona blisko grup OH, które zaangażowane są w hydratację samego kwasu chinowego. Obecność silnego akceptora wiązania wodorowego w pobliżu wymienionych grup hydroksylowych może tworzyć centrum wiążące dla cząsteczki wody, z którym tworzy ona jednocześnie trzy wiązania wodorowe z powyższymi grupami tzn. z grupą estrową oraz

grupami OH3 i OH4. Taki układ oddziaływań może tłumaczyć stabilność otrzymanych wodnych kompleksów 5-CQA w suchych pozostałościach ekstraktów 5-CQA. Rys. 33 przedstawia prawdopodobne struktury tych kompleksów.

Szczegółowa analiza zmian przesunięć chemicznych oraz zmian wartości stałych sprzężeń następujących w 5-CQA na skutek przyłączenia wody dostarcza kolejnych dowodów świadczących o jej przyłączeniu do wyżej wymienionego centrum. Sygnały protonów OH3 i OH4 kompleksów 5-CQA*H₂O występują odpowiednio w pozycjach 4.23 ppm i 4.25 ppm oraz 4.54 ppm i 4.56 ppm. Natomiast w przypadku 5-CQA sygnały tych protonów zajmują pozycje w zakresie od 4.8 ppm do 5.0 ppm. Jak wynika z badań teoretycznych, w najbardziej stabilnych konformerach 5-CQA występują wiązania wodorowe powstające pomiędzy grupą estrową i OH4 [217]. Wprowadzenie wody (będącej słabszym akceptorem wiązania wodorowego i tym samym powodującej mniejsze odsłanianie niż grupa karbonylowa) w miejsce grupy karbonylowej w tym oddziaływaniu (t.j. pomiędzy grupą estrową i OH4) tłumaczy niższe wartości przesunięć chemicznych jąder OH4 w kompleksach.



Rys. 32. Widmo 2D ¹H-¹H NOESY (DMSO-d₆, 600 MHz) kwasu chinowego. Wg. [P1].



Rys. 33. Struktury kompleksów 5-CQA*H₂O-1 oraz 5-CQA*H₂O-2. Wg. [P1].

Przytoczone badania teoretyczne [217] wskazują ponadto, że grupa OH4 tworzy jednocześnie wiązanie wodorowe z grupą OH3 uczestniczącą jeszcze w kolejnym oddziaływaniu (taka sieć oddziaływań stabilizuje cząsteczkę 5-CQA). Tym samym niższe wartości przesunięć protonów OH3 w kompleksach 5-CQA*H₂O związane są z pośrednim wpływem przyłączonej/skoordynowanej wody. Należy zauważyć, że w przypadku kompleksów 5-CQA*H₂O sieci wiązań wodorowych są bardziej rozbudowane niż w samym 5-CQA, co dodatkowo tłumaczy ich stabilność.

Kolejnymi argumentami świadczącymi o skoordynowaniu wody są widoczne zmiany stałych sprzężeń spinowych oraz przesunięć chemicznych jąder H5. Stałe sprzężeń tych jąder przyjmują większe wartości niż w 5-CQA (patrz tabela 5), szczególnie dla sprzężeń z jądrami H4 oraz H6_{ax}. Zmiany te są związane ze wzrostem kątów torsyjnych pomiędzy poszczególnymi parami jąder. Wartości kątów torsyjnych w układzie H4-C-C-H5 dla kompleksu 5-CQA*H₂O-1 oraz 5-CQA*H₂O-2 wynoszą odpowiednio 178° oraz 176.7°. Obecność wody tworzącej wiązania wodorowe w znacznym stopniu ogranicza rotację wokół sąsiednich wiązań, co sprawia, że w cząsteczkach 5-CQA tych kompleksów prawdopodobnie dominują konformacje charakteryzujące się tak dużymi wartościami powyższych kątów torsyjnych. Mając na uwadze, że rozważane protony H5 posiadają orientację aksjalną już w niezwiązanym 5-CQA, to znaczny wzrost wartości stałych sprzężeń może być jednak zaskoczeniem, jako że zmiany kątów torsyjnych spowodowane przyłączeniem wody są zapewne niewielkie. Należy jednak pamiętać, iż zgodnie z równaniem Karplusa, krzywa przedstawiająca zależność wicynalnych stałych sprzężeń w funkcji kątów torsyjnych przyjmuje wysokie wartości nachylenia w zakresach pomiędzy 90° i 180° [173, 216]. Tym samym nawet niewielkie zmiany kątów torsyjnych mogą istotnie wpływać na sprzężenia spinowo-spinowe.

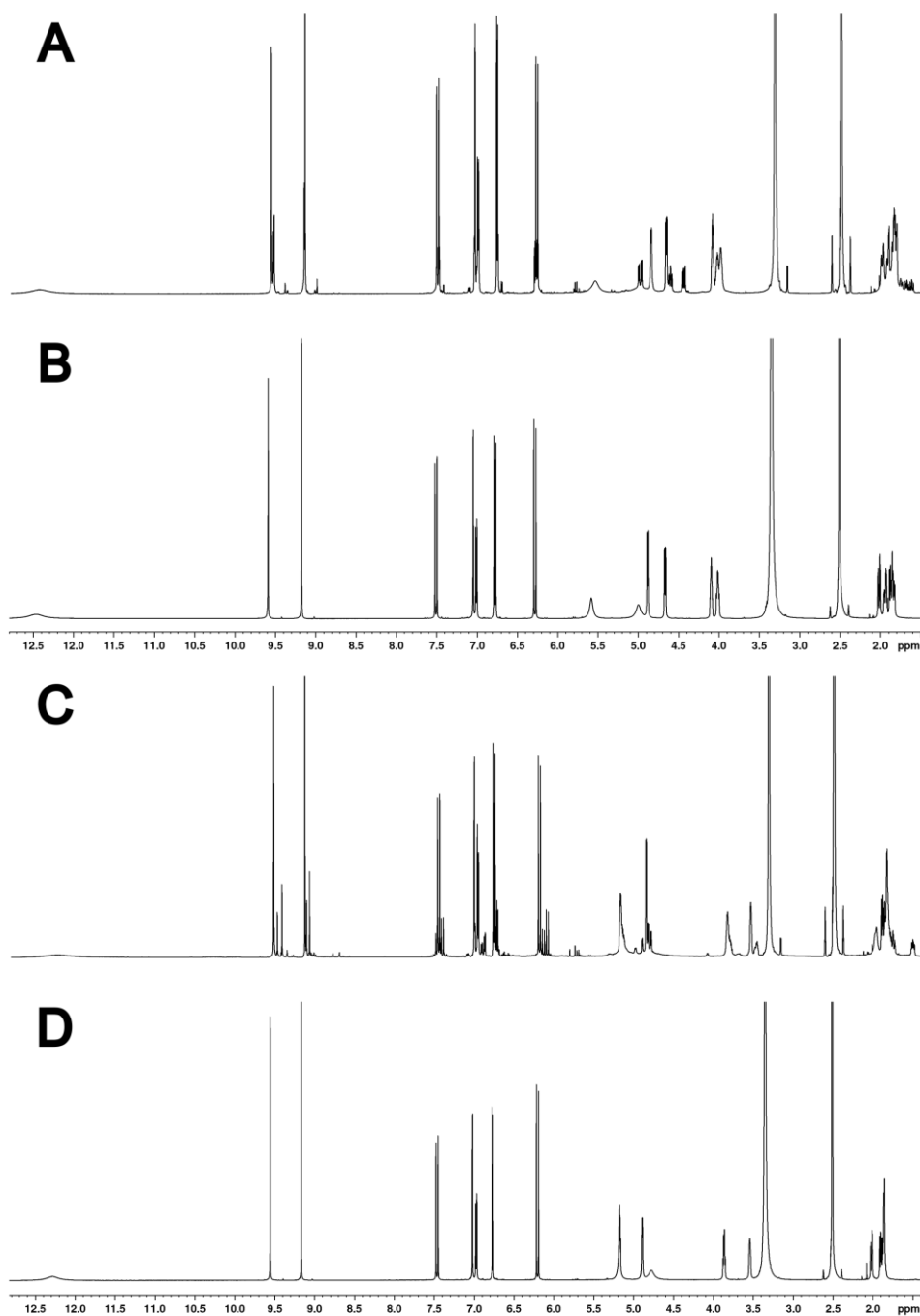
Natomiast wzrost wartości przesunięć chemicznych jąder H5 w kompleksach 5-CQA*H₂O można powiązać ze zmianą orientacji wiązania karbonylowego względem tej grupy metinowej. Warto zauważyć, że anizotropia magnetyczna wiązania C=O powoduje odsłanianie jąder położonych blisko płaszczyzny tego wiązania [216, 223]. W przypadku kompleksów 5-CQA*H₂O płaszczyzna grupy karbonylowej znajduje się blisko jąder H5, co wyjaśnia zaobserwowane przesunięcia ich sygnałów protonowych. Tak więc przedstawione na rys. 33 struktury kompleksów 5-CQA*H₂O są bardzo prawdopodobne.

12.3. Kompleksy 4- i 3-CQA z wodą

Według przedstawionych badań, układ składający się z grupy estrowej oraz grup hydroksylowych jest odpowiedzialny za wiązanie wody przez 5-CQA, co prowadzi do powstania jego hydratów widocznych na widmach NMR suchych pozostałości ekstraktów tego kwasu. Pozostałe izomery kwasu monokawilochinowego również zawierają w swojej budowie podobne motywy strukturalne jak 5-CQA. Jedyną różnicę stanowi miejsce występowania grupy estrowej (patrz rys. 8 w części teoretycznej). Obecność takich centrów wiązania sugeruje, że stabilne kompleksy z wodą mogą także tworzyć się w przypadku 4- oraz 3-CQA.

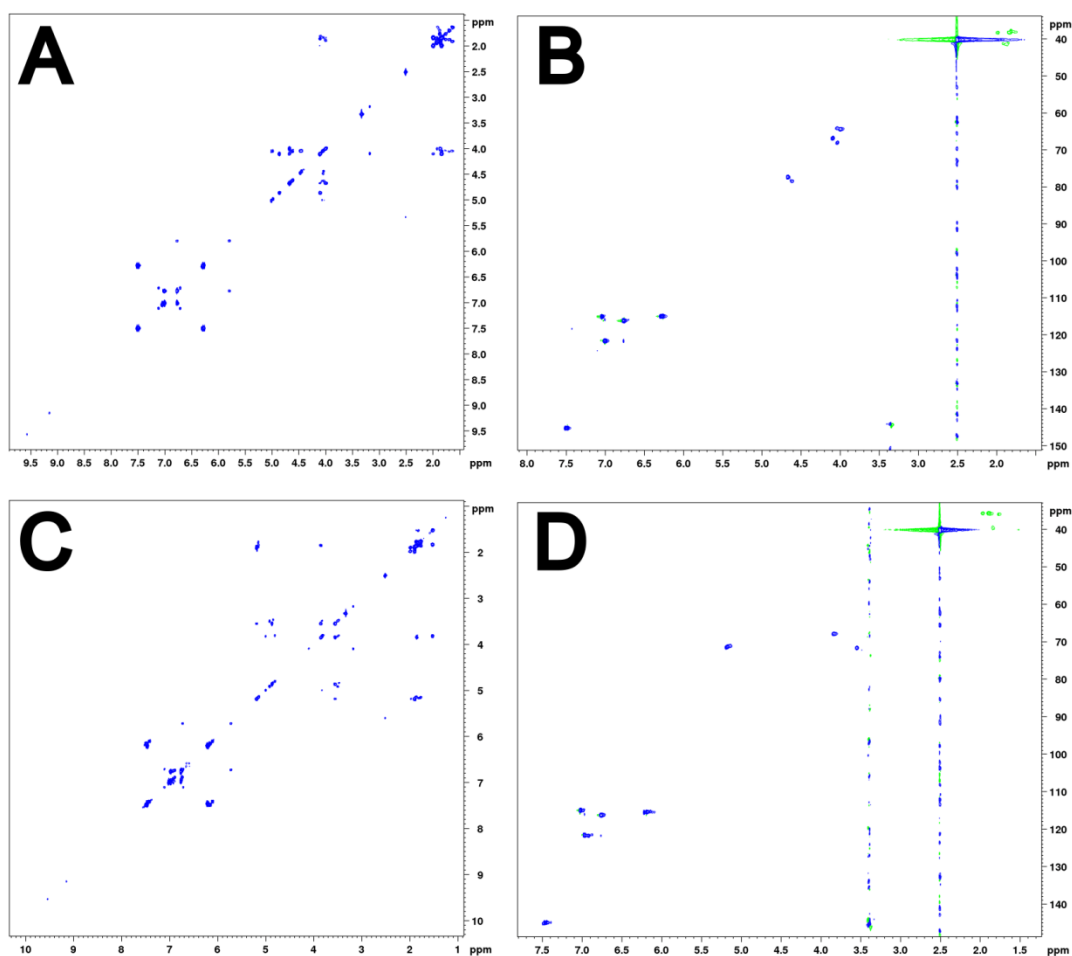
Widma ¹H otrzymane po odparowaniu wody z ekstraktów 4-CQA oraz 3-CQA są widoczne na rys. 34A oraz 34C. Ich porównanie z widmami roztworów tych kwasów (patrz rys. 34B oraz 34D) wskazuje na obecność dwóch dodatkowych układów sygnałów nie pochodzących od wyjściowych związków w każdej z suchych pozostałości. Oznacza to istnienie w osadach dwóch nowych pochodnych 4-CQA oraz dwóch nowych pochodnych 3-CQA (tak jak ma to miejsce w przypadku suchego ekstraktu 5-CQA). Analiza widm 2D (patrz rys. 35A oraz 35B) suchej pozostałości po ekstrakcji 4-CQA pozwala na zidentyfikowanie następujących fragmentów strukturalnych:

- reszty kwasu chinowego z grupą estrową przyłączoną do atomu węgla C4,
- dwóch protonów alkenowych, których sygnały mają przesunięcia chemiczne oraz wartości sprzężeń spinowo-spinowych wskazując na istnienie wiązania alkenowego o geometrii E, sprzężonego z grupą estrową oraz aromatyczną,
- pierścienia aromatycznego podstawionego grupami OH w pozycjach 3 i 4 względem podstawnika alkenowego.



Rys. 34. Widma ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz)
 (A) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 4-CQA,
 (B) 4-CQA,
 (C) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 3-CQA oraz
 (D) 3-CQA.
 Wg. [P1].

Wartości przesunięć chemicznych oraz informacje opisujące struktury multipletowe poszczególnych sygnałów dla suchego ekstraktu 4-CQA zamieszczono w tabeli 6.

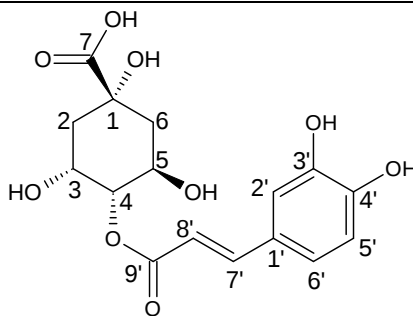


Rys. 35. Widma (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz) ^1H - ^1H COSY (A) i ^1H - ^{13}C HSQC (B) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 4-CQA oraz widma ^1H - ^1H COSY (C) i ^1H - ^{13}C HSQC (D) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 3-CQA. Sygnały dodatnie (kolor niebieski) widoczne na widmach HSQC pochodzą od grup CH oraz CH₃, a sygnały ujemne (kolor zielony) pochodzą od grup CH₂. Wg. [P1].

Z powyższej analizy oraz tabeli 6 wynika, że te dwie nowe pochodne 4-CQA składają się z grup kwasu kawowego oraz kwasu chininowego o niezmienionej stereostrukturze i charakterze chemicznym, co pozwala zidentyfikować je jako kompleksy powstające pomiędzy 4-CQA oraz wodą.

Widma 2D zarejestrowane dla suchej pozostałości ekstraktu 3-CQA są zaprezentowane na rys. 35C oraz 35D. Podobnie jak w przypadku analogicznych próbek 5- i 4-CQA stwierdza się, że powstające pochodne 3-CQA składają się z grup kwasu kawowego i kwasu chinowego, które nie uległy żadnym reakcjom chemicznym co wskazuje, że są to kompleksy 3-CQA*woda. Wartości przesunięć chemicznych oraz stałych sprzężeń 3-CQA i kompleksów 3-CQA*H₂O są przedstawione w tabeli 7.

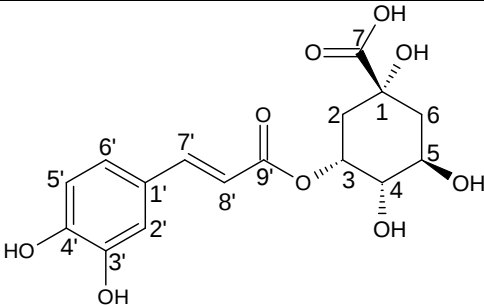
Tabela 6 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 4-CQA oraz kompleksów 4-CQA*H₂O (DMSO-d₆, 600 MHz i 125 MHz). Wg. [P1].



Nr jądra ^(a)	4-CQA		Kompleks 4-CQA•H ₂ O-1 ^(d)		Kompleks 4-CQA•H ₂ O-2 ^(d)	
	¹ H ^(b)	¹³ C	¹ H ^(b)	¹³ C ^(c)	¹ H ^(b)	¹³ C ^(c)
2_{ax}	1.99 (dd, $J = 13.7$, 3.1 Hz)	38.3	1.87 (m) lub 1.78-1.74 (m)	38.0	1.87 (m) lub 1.78-1.74 (m)	38.0
2_{eq}	1.85 (dd, $J = 13.8$, 6.0 Hz)		1.87 (m) lub 1.78-1.74 (m)		1.87 (m) lub 1.78-1.74 (m)	
3	4.10 (m)	66.8	4.05 (m)	68.1	4.04 (m)	68.1
OH3	4.86 (d, $J = 6.6$ Hz)	-	4.47 (d, $J = 8.2$ Hz)	-	4.45 (d, $J = 8.3$ Hz)	-
4	4.67 (dd, $J = 8.0$, 2.9 Hz)	77.6	4.63 (dd, $J = 9.0$, 2.9 Hz)	78.5	4.61 (dd, $J = 9.2$, 2.9 Hz)	78.5
5	4.00 (td, $J = 8.1$, 4.6 Hz)	64.4	4.06 (m)	64.1	4.04 (m)	64.1
OH5	5.00 (brs)	-	5.01 (d, $J = 6.5$ Hz)	-	4.98 (d, $J = 6.4$ Hz)	-
6_{ax}	1.87 (dd, $J = 13.2$, 8.7 Hz)	41.1	1.69 (dd, $J = 13.1$, 10.5 Hz)	41.6	1.63 (dd, $J = 12.9$, 10.8 Hz)	41.7
6_{eq}	1.92 (dd, $J = 13.2$, 2.7 Hz)		1.87 (m)		1.91 (m)	
8'	6.28 (d, $J = 15.9$ Hz)	115.0	6.30 (d, $J = 15.9$ Hz)	115.0	6.29 (d, $J = 15.9$ Hz)	115.0
OH3'	9.15 (brs)	-	9.16 (brs)	-	9.16 (brs)	-
OH4'	9.57 (brs)	-	9.54 (brs) lub 9.55 (brs)	-	9.54 (brs) lub 9.55 (brs)	-

- a) ax – położenie aksjalne, eq – położenie ekwatorialne.
- b) brs- szeroki singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, ddd – dublet dubletów dubletów, dt – dublet tripletów, t – triplet, td – triplet dubletów, m – złożony multiplet.
- c) Przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C kompleksów 4-CQA*H₂O określono na podstawie pików korelacyjnych zaobserwowanych na widmie HSQC.
- d) Dane rezonansowe pozostałych jąder kompleksów 4-CQA*woda nie zostały określone ze względu na nakładanie się ich sygnałów na analogiczne sygnały pochodzące od 4-CQA.

Tabela 7 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 3-CQA oraz kompleksów 3-CQA*H₂O (DMSO-d₆, 600 MHz i 125 MHz). Wg. [P1].

						
Nr jądra ^(a)	3-CQA		Kompleks 3-CQA*H ₂ O-1 ^(d)		Kompleks 3-CQA*H ₂ O-1 ^(d)	
	¹ H ^(b)	¹³ C	¹ H ^(b)	¹³ C ^(c)	¹ H ^(b)	¹³ C ^(c)
2 _{ax}	1.98 (dd, <i>J</i> = 13.3, 3.9 Hz)	35.6	1.85 (m) lub 1.76(m)	35.8	1.85 (m) lub 1.76(m)	35.8
2 _{eq}	1.89 (dd, <i>J</i> = 13.3, 7.6 Hz)		1.85 (m) lub 1.76(m)		1.85 (m) lub 1.76(m)	
3	5.19 (m)	71.4	5.15 (m)	71.1	5.14 (m)	71.1
4	3.54 (m)	71.6	3.47 (m)	72. 2	3.50 (m)	72. 2
OH4	4,87 (d, <i>J</i> = 4.4 Hz)	-	4.84 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz)	-	4.92 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz)	-
5	3.84 (m)	67.9	3.81 (m)	67.9	3.83 (m)	67.9
OH5	4.78 (brs)	-	4.80 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz)	-	5.00 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	-
6 _{ax}	1.86-1.84 (m)	39.7	1.83 (m) or 1.54 (m)	40.1	1.83 (m) or 1.50 (m)	40.1
6 _{eq}	1.86-1.84 (m)		1.83 (m) or 1.54 (m)		1.83 (m) or 1.50 (m)	
2'	7.02 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz)	115.0	7.01 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz) lub 6.99 (m)	115.0 lub 114.7	7.01 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz) lub 6.99 (m)	115.0 lub 114.7
5'	6.77 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	116.3	6.73 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	116.2	6.75 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz)	116.2
6'	6.98 (dd, <i>J</i> = 8.2, 2.0 Hz)	121.6	6.89 (dd, <i>J</i> = 8.2, 2.0 Hz)	121.5	6.93 (dd, <i>J</i> = 8.2, 2.0 Hz)	121.8
7'	7.46 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	144.9	7.42 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz)	144.9	7.49 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz)	145.1
8'	6.20 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	115.5	6.10 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz)	115.5	6.15 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz)	115.3
OH3'	9.14 (brs)	-	9.08 (brs)	-	9.12 (brs)	-
OH4'	9.53 (brs)	-	9.43 (brs)	-	9.49 (brs)	-

- a) ax – położenie aksjalne, eq – położenie ekwatorialne.
b) brs- szeroki singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, ddd – dublet dubletów dubletów, dt – dublet tripletów, t – triplet, td – triplet dubletów, m – złożony multiplet.
c) Przesunięcia chemiczne jąder ¹³C kompleksów 3-CQA*H₂O określono na podstawie pików korelacyjnych zaobserwowanych na widmie HSQC.
d) Dane rezonansowe pozostałych jąder kompleksów 3-CQA*woda nie zostały określone ze względu na nakładanie się ich sygnałów na analogiczne sygnały pochodzące od 3-CQA.

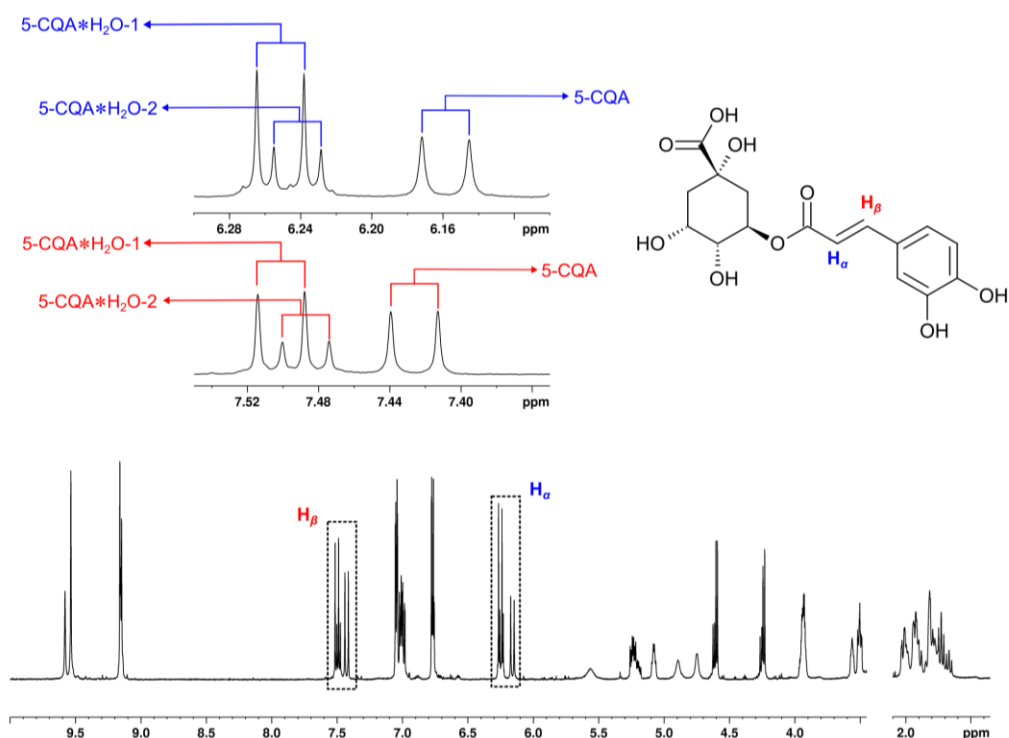
13. Kinetyka powstawania kompleksów 5-CQA*H₂O

Wyniki badań przedstawione w poprzednim rozdziale pokazują, że w suchych pozostałościach po ekstrakcji 5-CQA (tzw. suchych ekstraktach) znajdują się hydraty tego kwasu, a więc kompleksy, których masa, tak jak masa wodnego adduktu 5-CQA, jest o 18 Da większa od masy ich prekursora. Te kompleksy 5-CQA i wody generują dodatkowe, oddzielne (w porównaniu do 5-CQA i 5-CQA-OH) sygnały na widmach NMR suchych pozostałości rozpuszczonych w DMSO. Badania strukturalne wskazują, że trwałość tych hydratów wynika z trzech wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy cząsteczkami wody i polarnymi grupami 5-CQA (t.j. OH₃, OH₄ oraz grupą estrową). Ponieważ ilości tych kompleksów są znacznie większe nie tylko od ilości omawianych wcześniej wodnych adduktów 5-CQA, ale także od ilości pozostałych pochodnych 5-CQA, które są obecne w suchym ekstrakcie 5-CQA, dlatego postanowiono przebadać kinetykę powstawania tych nowych pochodnych (wodnych kompleksów) kwasu chlorogenowego.

Należy w tym momencie zauważyć, że proces otrzymywania wodnych kompleksów 5-CQA składa się z dwóch etapów: trwającej przez pewien czas ekstrakcji rozpuszczalnikiem (czyli inkubacji roztworów 5-CQA) oraz usunięcia wody z roztworu, np. w wyniku liofilizacji, w efekcie czego otrzymuje się suchą pozostałość, która zostaje rozpuszczona w DMSO-d₆ celem badań NMR. W związku z powyższym sprawdzono wpływ następujących czynników na wydajność tworzenia hydratów:

- czasu prowadzenia procesu inkubacji;
- początkowego stężenia 5-CQA;
- temperatury inkubacji;
- metody usuwania wody z inkubowanego roztworu, oraz
- sposobu prowadzenia inkubacji (statyczna lub dynamiczna).

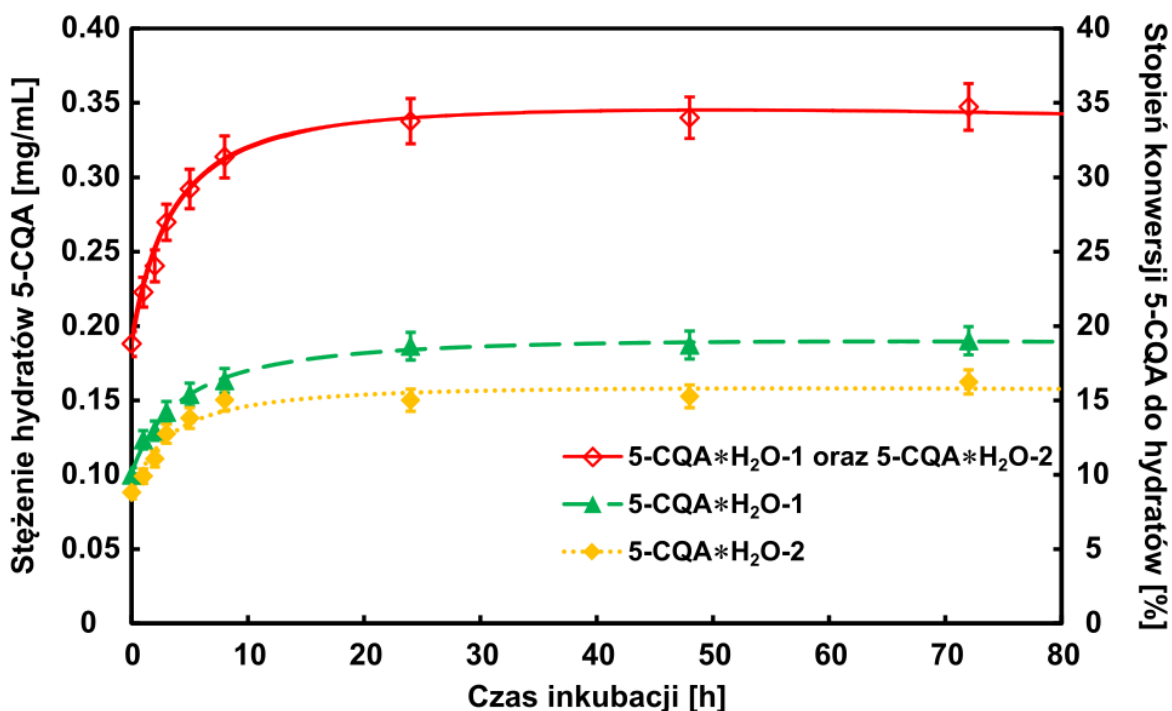
Rys. 36 przedstawia przykładowe widmo ¹H suchego ekstraktu 5-CQA, na którym zaznaczono sygnały protonów alkenowych wykorzystywanych w niniejszym rozdziale oraz w kolejnych rozdziałach do oceny ilości 5-CQA i jego hydratów w suchych ekstraktach.



Rys. 36. Widmo ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) otrzymane po rozpuszczeniu suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA. Powiększone zakresy widma zawierają sygnały rezonansowe pochodzące od 5-CQA oraz od jego hydratów - 5-CQA*H₂O-1 i 5-CQA*H₂O-2, które wykorzystywano przy prowadzeniu analiz ilościowych. Wg. [P2].

13.1. Wpływ czasu inkubacji na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O

Rys. 37 przedstawia wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA na stężenie jego poszczególnych hydratów oraz na ich stężenie sumaryczne (patrz lewa oś rzędnych). Hydraty zostały określone jako 5-CQA*H₂O-1 (linia przerywana) oraz 5-CQA*H₂O-2 (linia kropkowana). Linia ciągła odpowiada sumie obu hydratów. Z przebiegu krzywych wynika, że wzrost czasu inkubacji w zakresie 0-24 godzin powoduje przyrost zawartości hydratów. Przy dłuższych czasach inkubacji nie stwierdza się już dalszego wzrostu stężeń hydratów ($F_{\text{crit}} > F_{\text{exp}}$). Ponadto, zawartość hydratu 5-CQA*H₂O-1 jest wyraźnie większa niż w przypadku hydratu 5-CQA*H₂O-2 ($F_{\text{crit}} < F_{\text{exp}}$).



Rys. 37. Wpływ czasu inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na:

- stężenie 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz całkowite stężenie hydratów w suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA (lewa oś rzędnych), oraz
- stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1 lub 5-CQA*H₂O-2 lub sumy obu hydratów (prawa oś rzędnych).

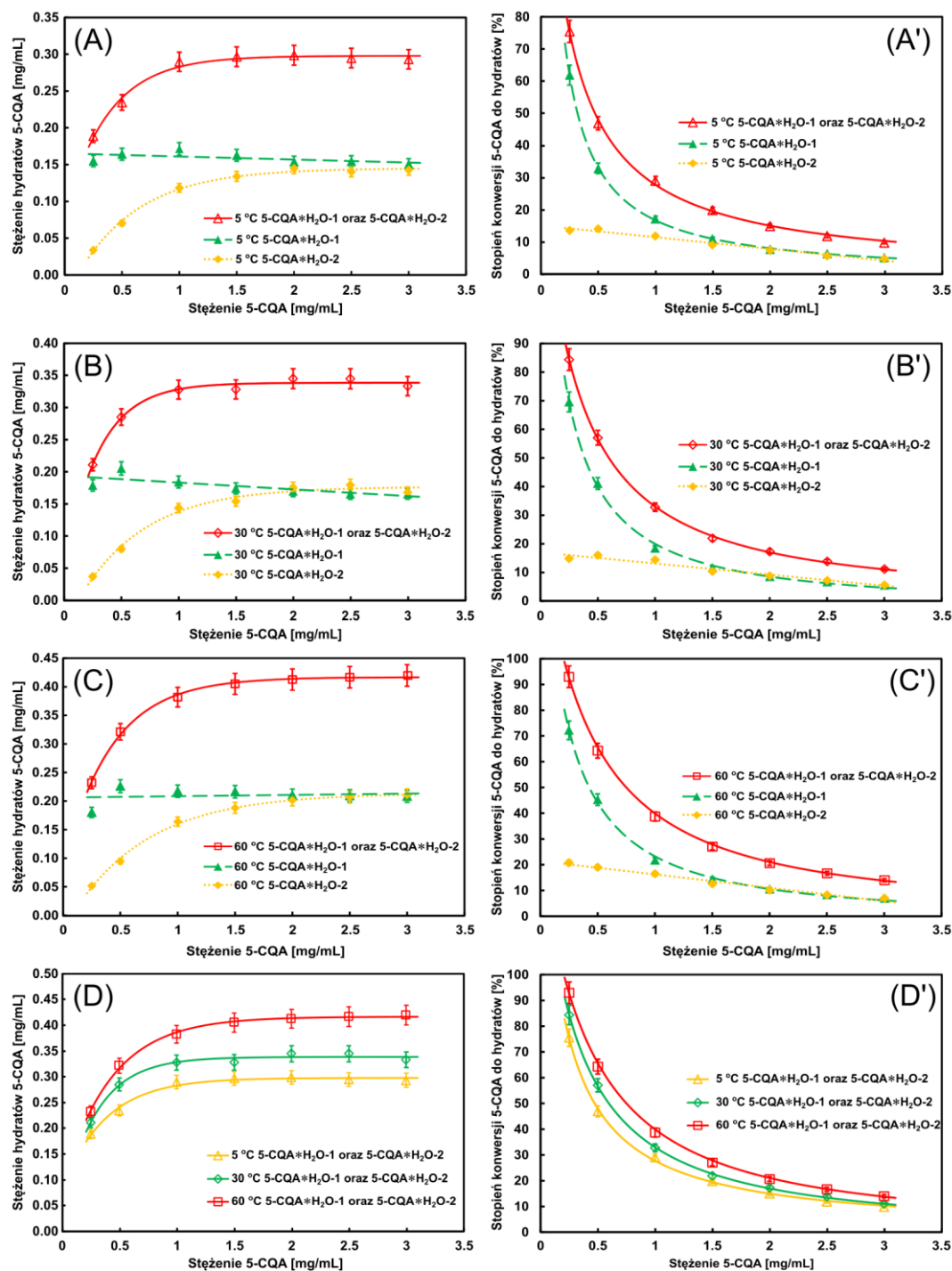
Warunki: stężenie 5-CQA w inkubowanym wodnym roztworze – 1 mg/mL; temperatura inkubacji – 30°C; inkubacja statyczna; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

Warto zauważyć, że wpływ czasu inkubacji na proces tworzenia hydratów 5-CQA można również przedstawić w postaci zależności stopnia konwersji 5-CQA do jego hydratów w funkcji czasu inkubacji (patrz prawa oś rzędnych na rys. 37). Chociaż przebieg krzywych jest w tym przypadku identyczny i prowadzi do analogicznych wniosków jak wyżej, to jednak wyraźniej jest w ten sposób podkreślony fakt, że w wymienionych warunkach tylko ograniczona ilość cząsteczek 5-CQA przekształca się w hydraty. Powyższe stwierdzenie wskazuje na istnienie w układzie czynników hamujących dalsze powstawanie kompleksów. Tę ograniczoną konwersję można tłumaczyć np. silnym związaniem cząsteczek wody w jej agregatach.

13.2. Wpływ początkowego stężenia 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H₂O

Wpływ początkowego stężenia 5-CQA na zawartość poszczególnych hydratów oraz ich całkowitą zawartość w suchych pozostałościach 24 godzinnych ekstraktów otrzymanych w temperaturach 5°C, 30°C i 60°C przedstawiono na rys. 38A-C. Wzrost stężenia powstających hydratów 5-CQA jest widoczny wyłącznie w zakresie niskich stężeń w przypadku całkowitego stężenia hydratów oraz hydratu 5-CQA*H₂O-2 ($F_{crit} < F_{exp}$). Dla hydratu 5-CQA*H₂O-1 obserwuje się nieznaczny spadek jego zawartości lub brak zmian jego stężenia. Zakładając, że zależności przedstawione na rys. 38A-C są zbieżne do punktu 0.0 należałoby spodziewać się podobnego przebiegu krzywych dla każdego z tych kompleksów. Eksperymentalne potwierdzenie tego przypuszczenia dla silnie rozcieńczonych wodnych roztworów z wykorzystaniem metod NMR nie było możliwe. Większa zawartość hydratu 5-CQA*H₂O-1 w zakresie niskich stężeń może sugerować, że powstaje on szybciej niż kompleks 5-CQA*H₂O-2. Różnice w kinetyce tworzenia obydwu hydratów nie są już widoczne w przypadku początkowych stężeń 5-CQA przekraczających 2 mg/mL ($F_{crit} > F_{exp}$). Jak można zauważyć, w suchych ekstraktach 5-CQA powstałych z wodnych roztworów zawierających wysokie stężenia 5-CQA ilości hydratów są stałe. Przedstawione wyniki jasno potwierdzają uwagę зробioną w poprzednim podrozdziale, iż badane układy mają ograniczoną zdolność do tworzenia hydratów. Może to wynikać ze zmian stosunku liczby cząsteczek 5-CQA i liczby cząsteczek wody zdolnych do tworzenia odpowiednich oddziaływań z kwasem chlorogenowym w układzie, np. monomerycznych/dimerycznych cząsteczek wody lub klasterów wody zdolnych do przekazania cząsteczki wody cząsteczce 5-CQA.

Na rys. 38 A'-C' zaprezentowano w innej formie wpływ początkowego stężenia 5-CQA w wodnych roztworach na zawartość jego hydratów w suchych ekstraktach – jako zależność stopnia konwersji 5-CQA do jego hydratów w funkcji początkowego stężenia 5-CQA w wodnych roztworach. Przedstawione wykresy stanowią potwierdzenie istoty wpływu stosunku molowego 5-CQA i wody na proces tworzenia hydratów, a także w jasny sposób pokazują, że wraz ze wzrostem początkowego stężenia 5-CQA w wodnym roztworze maleje stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O w całym zakresie badanych stężeń.



Rys. 38. Wpływ początkowego stężenia 5-CQA w jego wodnym roztworze na:

- stężenie 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz na stężenie obu hydratów w suchych ekstraktach wodnych roztworów 5-CQA inkubowanych w temperaturach 5 (A), 30 (B) i 60°C (C); oraz
- stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1 lub do 5-CQA*H₂O-2 lub do sumy obu hydratów po procesie usunięcia wody z wodnych roztworów 5-CQA inkubowanych w temperaturach 5 (A'), 30 (B') i 60°C (C').

Dane z wykresów (A-C) oraz (A'-C') podsumowano odpowiednio na wykresach D oraz D'.

Warunki: czas inkubacji – 24 godziny; inkubacja statyczna; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

Dokładna analiza krzywych zaprezentowanych na rys. 38A-C oraz 38A'-C' dowodzi, że temperatura inkubacji wodnego roztworu 5-CQA ma także wpływ na proces tworzenia hydratów. W celu lepszego podkreślenia wpływu temperatury na tworzenie się hydratów na rys. 38D oraz D' zebrano wyniki dotyczące zmian całkowitej ilości obydwu hydratów w każdej temperaturze (5°C, 30°C oraz 60°C).

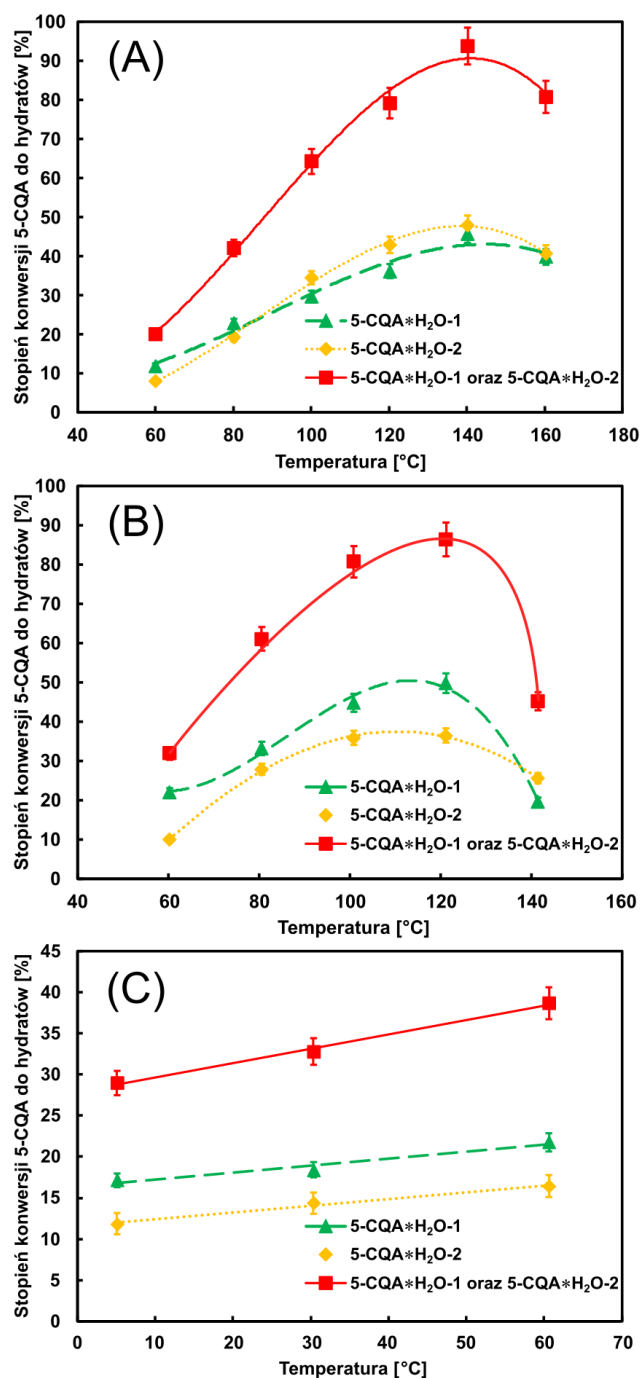
13.3. Wpływ temperatury inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H₂O

Na rys. 39A-C przedstawiono wpływ temperatury na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1 (linia przerywana), 5-CQA*H₂O-2 (linia kropkowana) oraz 5-CQA*H₂O-1 i 5-CQA*H₂O-2 (linia ciągła) w roztworach wodnych 5-CQA inkubowanych przez okres 1 (A), 5 (B) oraz 24 godzin (C). Jak widać, w przypadku 1 godzinnej inkubacji jednoznaczny wzrost stopnia konwersji 5-CQA do jego hydratów ($F_{crit} < F_{exp}$) obserwowany jest w zakresie do 140°C, a w przypadku 5 godzinnej w obszarze do 120°C (patrz odpowiednio rys. 39 A i B). W przypadku próbek inkubowanych przez 1 godzinę konwersja kwasu chlorogenowego sięga blisko 100 %.

Zmiany wydajności tworzenia hydratów 5-CQA powodowane wzrostem temperatury inkubacji wodnych roztworów mogą wynikać z:

- rozpadu aglomeratów cząsteczek wody i utworzenia większej liczby monomerów/dimerów lub innych mniejszych klasterów cząsteczek wody, które mogą być donorami wody podczas tworzenia kompleksu 5-CQA*H₂O;
- zwiększenia liczby aktywnych kolizji 5-CQA oraz cząsteczek wody.

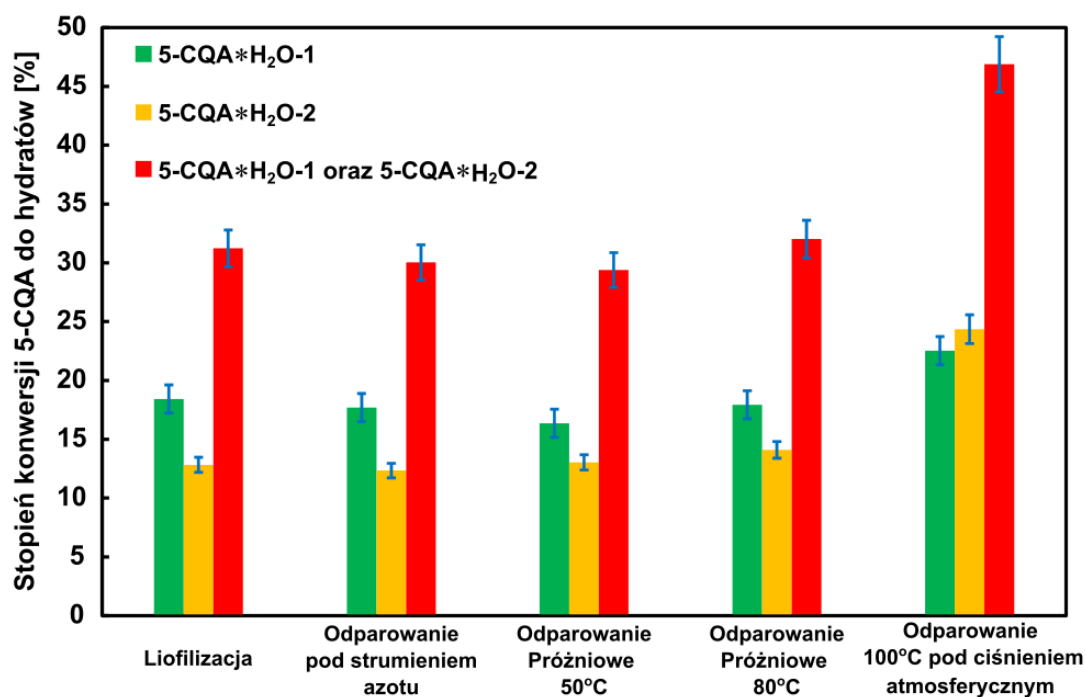
W przypadku temperatur przekraczających 140°C (inkubacja przez 1 godzinę) oraz 120°C (inkubacja przez 5 godziny) widoczny jest spadek stopnia konwersji, który może być wytłumaczony hydrolizą 5-CQA (oraz jego hydratów).



Rys. 39. Wpływ temperatury inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz całości 5-CQA*H₂O. Zależności dla 1 (A), 5 (B) oraz 24 godzinnej (C) inkubacji. Warunki: stężenie 5-CQA w wodnym roztworze – 1 mg/mL; inkubacja statyczna; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

13.4. Wpływ metody usuwania wody z wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H₂O

Podczas badań, których wyniki zaprezentowano w poprzednich podrozdziałach jako metodę usuwania wody z roztworów poddanych inkubacji w celu uzyskania suchego ekstraktu wykorzystano liofilizację. Mając na uwadze wpływ temperatury inkubacji, czasu inkubacji oraz wpływ stężenia 5-CQA na stopień konwersji 5-CQA do hydratów postanowiono zbadać czy podczas stosowania innych metod usuwania wody nastąpią zmiany wydajności tworzenia kompleksów 5-CQA*H₂O. Wyniki tej serii eksperymentów zaprezentowano na rys. 40. Uzyskane wyniki pokazują, że wyłącznie w przypadku odparowania wody w temperaturze wrzenia (ciśnienie atmosferyczne) obserwuje się istotny wzrost konwersji 5-CQA. Zastosowanie pozostałych metod powoduje niewielkie zmiany



Rys. 40. Wpływ metody usuwania wody z roztworu 5-CQA na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz do sumy obu hydratów. Warunki: stężenie 5-CQA w wodnym roztworze – 1 mg/mL; temperatura inkubacji – 30°C; czas inkubacji – 24 godziny; inkubacja statyczna. Wg. [P2].

w stopniu konwersji w odniesieniu do liofilizacji. W świetle wyników z poprzedniego podrozdziału większa wartość stopnia konwersji przy odparowaniu wody w temperaturze 100°C (ciśnienie atmosferyczne) jest zrozumiała. Dużym zaskoczeniem jest natomiast brak istotnych zmian w przypadku pozostałych metod. Może on być wytłumaczony, jeśli weźmie się pod uwagę iż:

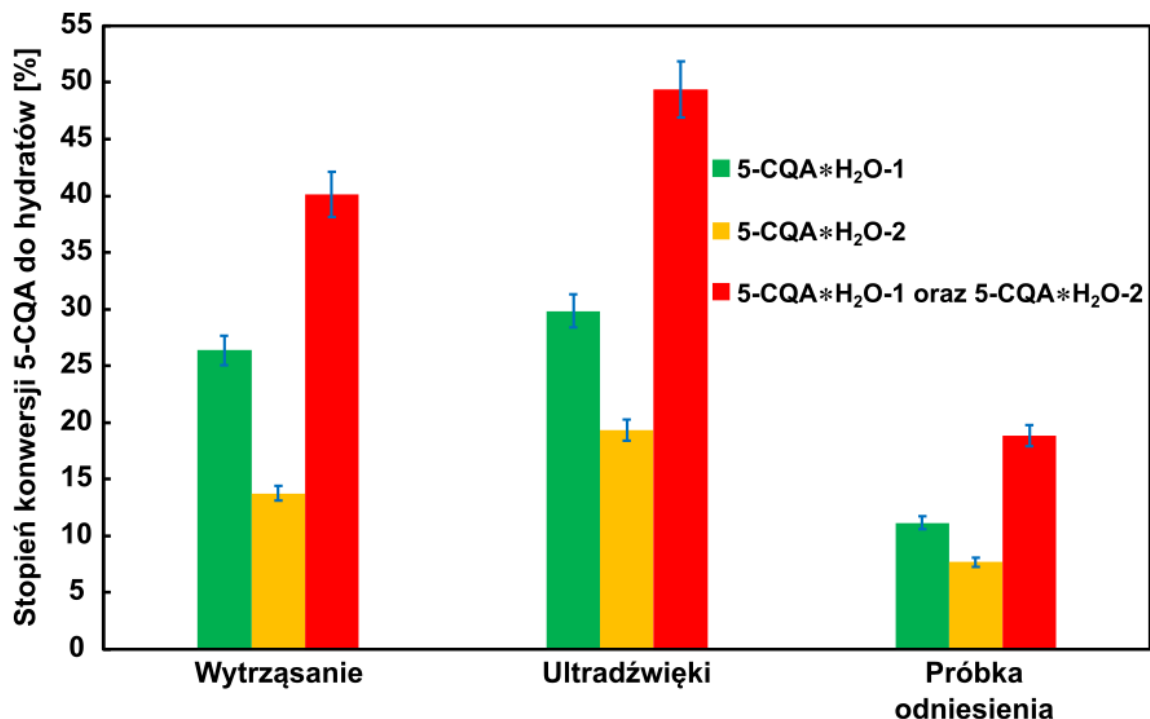
- kompleks 5-CQA*H₂O powstaje w wyniku reakcji cząsteczki 5-CQA i wody w postaci monomeru lub dimeru, oraz
- podczas odparowania cząsteczki wody opuszczają roztwór w postaci niewielkich aglomeratów, (m.in. dimerów oraz monomerów [224]) co powoduje zubożenie układu w tego typu twory.

Bardzo zbliżona wartość stopnia konwersji w trakcie liofilizacji, odparowania w strumieniu azotu oraz odparowania w warunkach próżni w temperaturze 50 i 80°C, wskazuje, że proces wymieniony w drugim punkcie następuje znacznie szybciej, czego wynikiem jest brak zmian wydajności tworzenia hydratów 5-CQA.

13.5. Wpływ inkubacji statycznej i dynamicznej wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji tego kwasu do 5-CQA*H₂O

W każdej z wcześniejszych serii eksperymentów dotyczących inkubacji wodnych roztworów 5-CQA prowadzono ich statyczną inkubację. Diagram widoczny na rys. 41 pokazuje, że dynamiczna inkubacja (wyrząsanie lub zastosowanie ultradźwięków) zwiększa stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O w porównaniu do tej zachodzącej w warunkach statycznych (patrz próbka odniesienia na rys. 41). Mechaniczne zaburzenia struktur aglomeratów, z których składa się woda, powodowane dynamicznym prowadzeniem inkubacji przyczynia się do wzrostu stopnia konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O. Najprawdopodobniej jest on związany z:

- powstaniem większej liczby cząsteczek wody występujących w postaci monomerów/dimerów lub aglomeratów zdolnych do bycia potencjalnymi donorami wody podczas tworzenia hydratów z 5-CQA, oraz
- zwiększeniem prawdopodobieństwa efektywnego zderzenia pomiędzy cząsteczkami 5-CQA oraz cząsteczkami wody.



Rys. 41. Stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz do sumy obu hydratów w suchych ekstraktach otrzymanych po liofilizacji wodnych roztworów 5-CQA inkubowanych statycznie, wytrząsanych oraz poddawanych działaniu ultradźwięków.

Warunki: stężenie 5-CQA w wodnym roztworze – 1 mg/mL; temperatura inkubacji – 30°C; czas inkubacji – 15 minut; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

13.6. Prawdopodobny mechanizm tworzenia kompleksów 5-CQA*H₂O

Jak zaznaczono w rozdziale 12.2, stabilność kompleksów 5-CQA*H₂O jest konsekwencją utworzenia trzech wiązań wodorowych pomiędzy grupami OH₃, OH₄ i grupą estrową 5-CQA a cząsteczką wody. Powstanie takiego układu wymaga przyjęcia odpowiedniej konformacji przez kwas chlorogenowy oraz obecności cząsteczki wody we właściwym położeniu względem wymienionych grup 5-CQA. Należy pamiętać, że woda jest układem silnie zasocjowanych molekuł H₂O, z których każda może utworzyć maksymalnie cztery wiązania wodorowe z molekułami sąsiednimi. Wiązania te dzięki ciągłym termicznym ruchom cząsteczek wody pękają i odbudowują się, co oznacza, że woda może być traktowana jako zbiór bardziej lub mniej złożonych konglomeratów molekuł H₂O – trójwymiarowych, cyklicznych i liniowych [225, 226].

Zaprezentowane wyniki sugerują dwa możliwe mechanizmy tworzenia kompleksów 5-CQA*H₂O w wodnych roztworach kwasu chlorogenowego:

- reakcję 5-CQA z wodą w postaci monomerów/dimerów, lub
- odłączenie cząsteczki wody przez 5-CQA z wodnych aglomeratów, które mogą być donorami wody.

Wyniki przedstawiające wpływ temperatury na proces tworzenia kompleksów 5-CQA*H₂O (patrz podrozdział 13.3) właściwie nie wykluczają żadnej z opcji. Wzrost temperatury niewątpliwie przyczynia się do rozpadu klasterów wodnych na coraz to mniejsze ugrupowania, także dimery oraz monomery. Jednak wyniki innych serii eksperymentów, takie jak:

- obecność plateau na wykresie pokazującym zależności pomiędzy stężeniem 5-CQA*H₂O a stężeniem 5-CQA (patrz rys. 38A-D),
- wyraźny wzrost stopnia konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O wraz ze spadkiem początkowego stężenia 5-CQA (patrz rys. 38A'-D'),
- brak wpływu metody usuwania wody z wodnych roztworów 5-CQA na jego konwersję do 5-CQA*H₂O (patrz rys. 40 oraz rozdział 13.4),
- wzrost konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O spowodowany dynamiczną inkubacją wodnych roztworów 5-CQA (patrz rys. 41), oraz
- początkowy wzrost stopnia konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O wraz ze wzrostem czasu inkubacji oraz następujące po nim plateau (patrz rys. 37) – sugerujące, że przy niskim stężeniu monomerycznych/dimerycznych form H₂O czas tworzenia 5-CQA*H₂O rośnie, a na dodatek, proces zwalnia na skutek zużywania się substratów, wskazują, że to pierwszy z wymienionych mechanizmów jest bardziej prawdopodobny (t.j. aktywna kolizja odpowiednio zorientowanych molekuł 5-CQA z monomerami/dimerami wody, które są obecne w niskich stężeniach w układzie reakcyjnym).

13.7. Eksperymenty dodatkowe

Suche pozostałości otrzymane po inkubacji wodnego roztworu 5-CQA w warunkach zapewniających blisko 100 % konwersję 5-CQA do 5-CQA*H₂O (patrz rys. 39 – inkubacja przez 1 godzinę w temperaturze 120°C) zbadano przy wykorzystaniu metody Karla-Fischera oraz analizy elementarnej. Pierwsza z nich służąca do oznaczania zawartości wody

w rozpuszczalnikach i ciałach stałych nie wykazała obecności wody w badanej próbce, wskazując tym samym na bardzo silne związanie cząsteczek wody przez 5-CQA. Z kolei z drugiej wynikało, że skład pierwiastkowy próbki jest następujący:

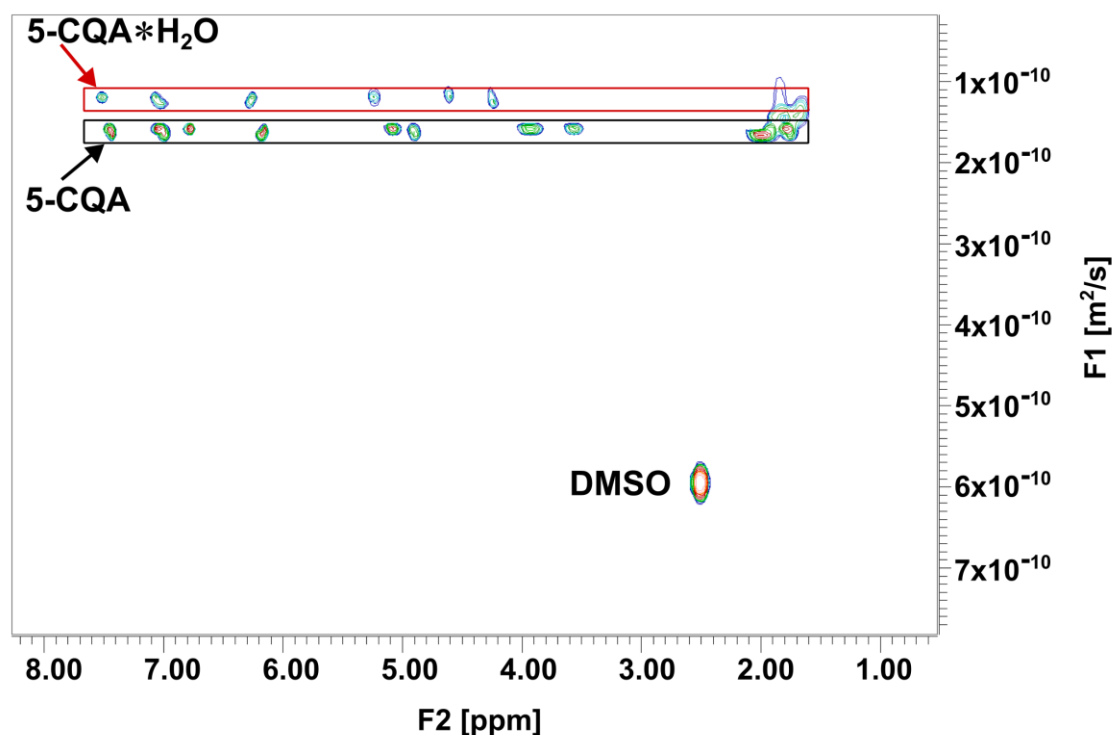
węgiel – 51.7 %,

wodór -5.3 %,

tlen – 43.0 %,

co odpowiada hydratowi o wzorze $m \times 5\text{-CQA} \cdot n \times \text{H}_2\text{O}$, gdzie m/n wynosi 1.

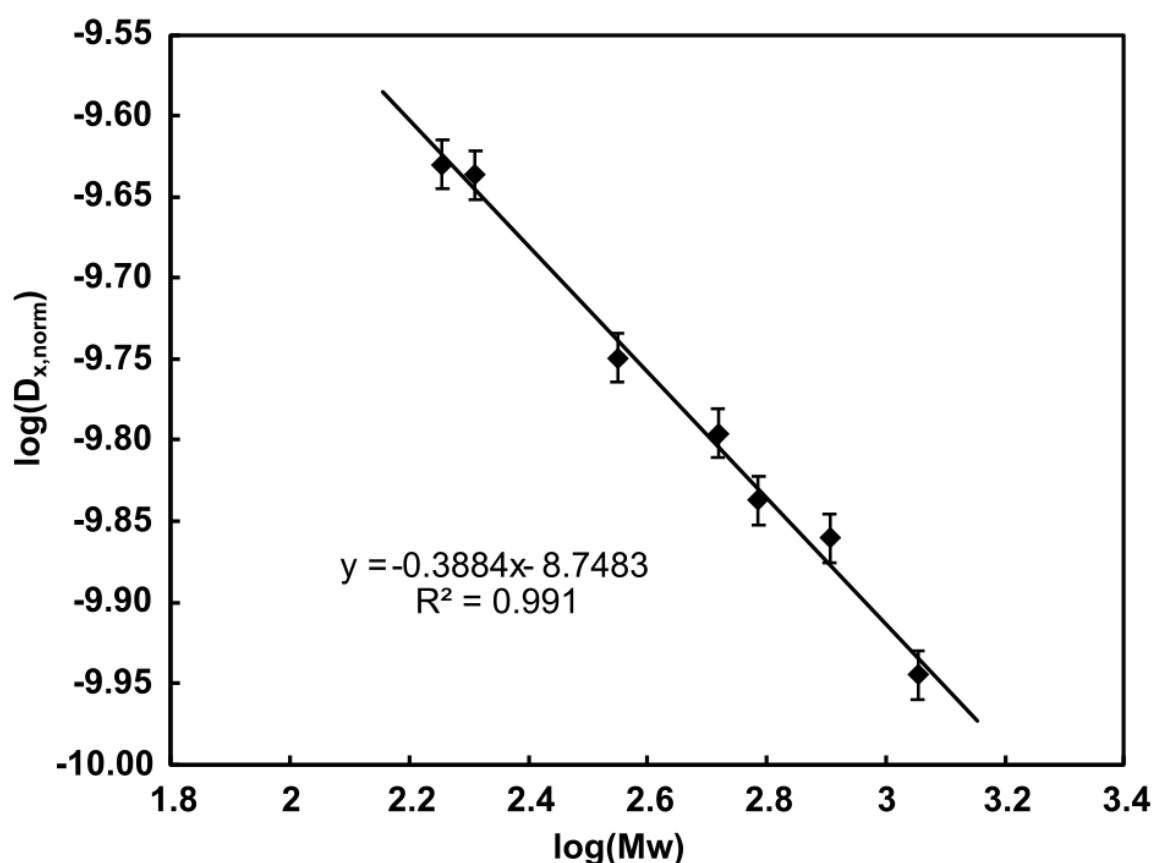
Kolejnych informacji odnośnie struktury hydratów 5-CQA dostarczyła spektroskopia dyfuzyjna NMR. Widmo ^1H DOSY próbki suchej pozostałości inkubowanego roztworu 5-CQA o stopniu konwersji 5-CQA do $5\text{-CQA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ równym 35 % (24 godziny inkubacji, temperatura 30 C stopni) rozpuszczonej w DMSO-d_6 przedstawiono na rys. 42. Oś F1 odpowiada wartościom współczynników dyfuzji, a oś F2 reprezentuje wartości przesunięć chemicznych jąder ^1H . Dla sygnałów 5-CQA oraz $5\text{-CQA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ obserwuje się znaczną różnicę wartości ich współczynników dyfuzji. W tym miejscu należy zauważyć, że



Rys. 42 Przykładowe widmo ^1H DOSY (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA. Sucha pozostałość zawierała 35 % hydratów i 65 % 5-CQA. Na widmie zaznaczono sygnały pochodzące od 5-CQA oraz $5\text{-CQA} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Wg. [P2].

samo skoordynowanie wody (masa 18 Da) odpowiadałoby zmianom dyfuzji na poziomie błędów metody [216]. Tak więc, widoczne różnice we współczynnikach dyfuzji wskazują, że hydraty 5-CQA występują w formie większych tworów. Dla uzupełnienia warto dodać, iż wartości współczynników dyfuzji dla poszczególnych hydratów są bardzo podobne (różnice w granicach błędów pomiarowych).

W celu określenia masy molowej hydratów 5-CQA zastosowano metodę wzorca zewnętrznego zaproponowaną przez Stalkego i współpracowników [196, 197] (patrz część eksperymentalna). W tym celu przygotowano krzywą kalibracyjną, która łączy znormalizowany współczynnik dyfuzji substancji z jej masą molową. Prezentuje ją rys. 43. Odnosząc odczytane wartości współczynników dyfuzji dla sygnałów 5-CQA*H₂O stwierdza się, że masa molowa każdego z hydratów wynosi 805.42 g mol⁻¹ (patrz tabela 8), co wskazuje, że sygnały obserwowane na widmach NMR pochodzą od układów składających się z dwóch cząsteczek 5-CQA i dwóch cząsteczek wody. Hydraty oznaczone jako 5-CQA*H₂O-1



Rys. 43. Krzywa kalibracyjna wykorzystana przy wyznaczaniu masy molowej 5-CQA*H₂O metodą wzorca zewnętrznego. Współczynniki dyfuzji wyznaczono metodą NMR. Wg. [P2].

Tabela 8 Dane NMR DOSY oraz obliczone masy molowe dla kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O]. Dane wg. [P2].

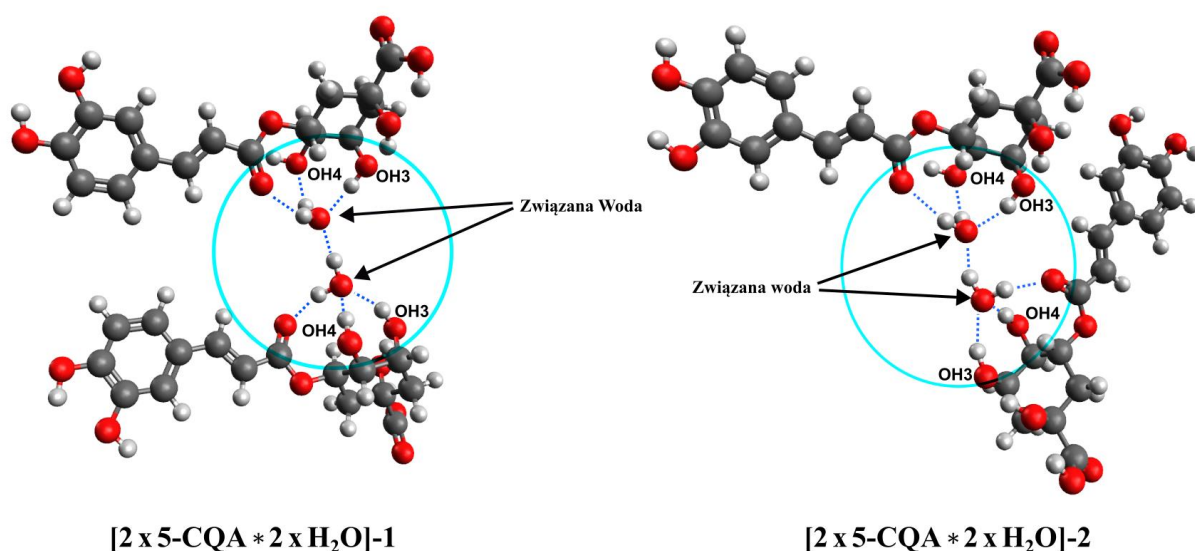
Średnia wartość współczynników dyfuzji 5-CQA*H ₂ O ^a [m ² /s]	1.20•10 ⁻¹⁰
Logarytm znormalizowanego współczynnika dyfuzji 5-CQA*H ₂ O	-9.877
Wyznaczona eksperymentalnie masa molowa 5-CQA*H ₂ O [g/mol]	805.42
Teoretyczna masa molowa [2 x 5-CQA*2 x H ₂ O] [g/mol]	744.65

^a Średnia została policzona na podstawie wartości odczytanych dla wszystkich sygnałów 5-CQA*H₂O-1 oraz 5-CQA*H₂O-2, których struktury multipletowe były wyraźnie rozdzielone.

oraz 5-CQA*H₂O-2 są faktycznie kompleksami o wzorach [2x5-CQA*2xH₂O] (odpowiednio [2x5-CQA*2xH₂O]-1 oraz [2x5-CQA*2xH₂O]-2).

W poprzednim rozdziale stwierdzono, że w wyniku utworzenia hydratów 5-CQA następuje migracja sygnałów protonów reszty kwasu kawowego w kierunku wyższych wartości przesunięć. Z jednej strony takie zmiany wykluczają możliwość wystąpienia oddziaływań π - π (powodujących migrację sygnałów w kierunku niższych wartości przesunięć), które odpowiadają za agregację cząsteczek kwasu chlorogenowego w obszarze powyżej jego krytycznego stężenia agregacji [34]. Z drugiej strony wysoka stabilność kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O]-1 i [2x5-CQA*2xH₂O]-2 oraz umiejscowienie wody w hydratách (patrz rys. 33) mogą sugerować, że wzajemnie oddziałujące ze sobą cząsteczki wody są położone pomiędzy dwiema cząsteczkami 5-CQA. W każdym z kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O] cząsteczka wody z ugrupowania 5-CQA*H₂O oprócz trzech wiązań wodorowych z grupami kwasu chlorogenowego tworzy kolejne oddziaływanie z cząsteczką wody z drugiego ugrupowania 5-CQA*H₂O. Dzięki temu powstaje połączenie pomiędzy jednostkami 5-CQA*H₂O.

Prawdopodobne struktury [2x5-CQA*2xH₂O]-1 i [2x5-CQA*2xH₂O]-2 otrzymane z wykorzystaniem mechaniki molekularnej (pole siłowe MMFF94s) przedstawiono na rys. 44.



Rys. 44. Struktury kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O]-1 i [2x5-CQA*2xH₂O]-2. Dane wg. [P2].

Jak wynika z rysunku, najbardziej istotne różnice w strukturze kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O]-1 i [2x5-CQA*2xH₂O]-2 są widoczne w położeniu reszt kwasu kawowego względem pozostałych grup funkcyjnych. W przypadku kompleksu [2x5-CQA*2xH₂O]-1 obecne jest oddziaływanie krawędź-krawędź (ang. edge-to-edge) reszt kwasu kawowego skutkujące zmniejszeniem ekranowania jąder znajdujących się w płaszczyźnie fragmentów nienasyconych, co może wyjaśniać wyższe wartości przesunięć protonów nienasyconych tego kompleksu. Brak takiego oddziaływania w kompleksie [2x5-CQA*2xH₂O]-2 tłumaczy mniejsze zmiany przesunięć chemicznych protonów w jego grupach nienasyconych spowodowane już wyłącznie przyłączeniem wody.

14. Hydraty 5-CQA w roztworach wodnych oraz produktach spożywczych zawierających ten kwas

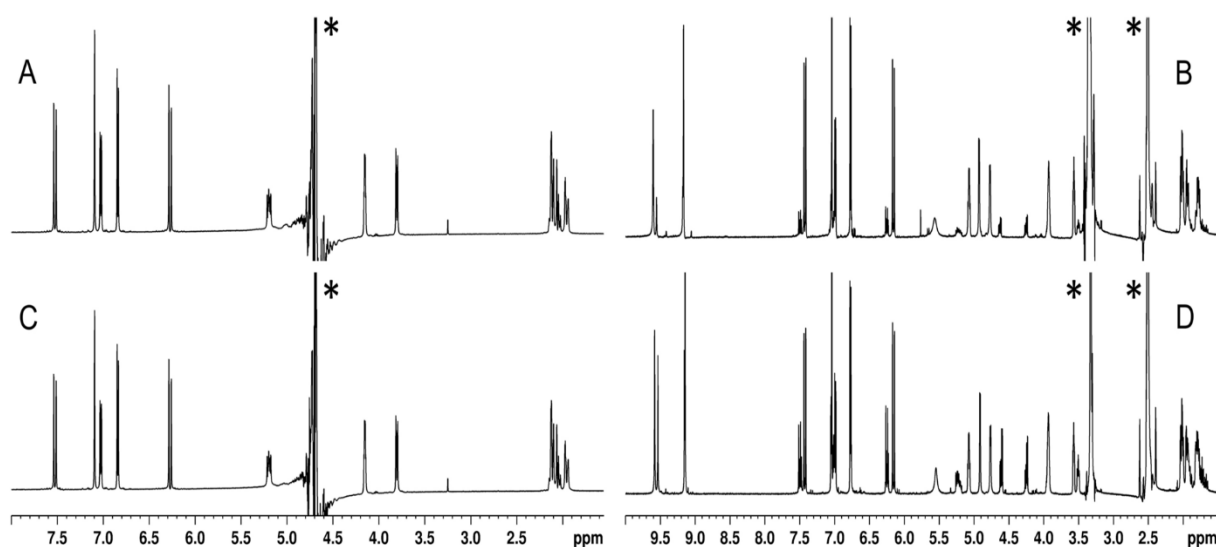
Jak wykazano w poprzednim rozdziale, ilości $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ obecne w suchych ekstraktach inkubowanych wodnych roztworów 5-CQA zależą w znacznym stopniu od czasu inkubacji. Przykładowo, im dłuższy jest czas inkubacji roztworu 5-CQA tym większa jest zawartość $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ w suchym ekstrakcie. Taka relacja sugeruje, że hydraty 5-CQA prawdopodobnie powstają już w roztworach wodnych tego kwasu, a ich ilości zależą od czasu inkubacji roztworu. Aby sprawdzić powyższą hipotezę postanowiono przebadąć roztwory wodne 5-CQA pod kątem obecności jego hydratów. Badaniami postanowiono objąć także modelowe produkty spożywcze zawierające 5-CQA.

14.1. Bezpośrednia analiza NMR wodnych roztworów 5-CQA

W celu stwierdzenia obecności kompleksów 5-CQA w roztworach wodnych analizie NMR poddano roztwory 5-CQA w mieszaninie 90 % H_2O i 10 % D_2O . Rys. 45A przedstawia widmo ^1H świeżo otrzymanego wodnego roztworu 5-CQA. Są na nim widoczne jedynie sygnały pochodzące od nieprzereagowanego 5-CQA. Brak jest sygnałów pochodzących od jego hydratów. Przedstawione na rys. 45B widmo ^1H suchego ekstraktu powyższej próbki po jego rozpuszczeniu w DMSO-d_6 zawiera natomiast zarówno sygnały pochodzące od 5-CQA, jak i układy sygnałów generowane przez $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ -1 i $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ -2. Wartości przesunięć chemicznych oraz struktury multipletowe obserwowane dla hydratów 5-CQA są zgodne z danymi NMR zaprezentowanymi w rozdziałach 12 i 13. Biorąc pod uwagę:

- brak sygnałów rezonansowych pochodzących od hydratów 5-CQA w jego wodnym roztworze i obecność $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ w suchym ekstrakcie z tego nieinkubowanego roztworu, oraz
- zaobserwowany w poprzednim rozdziale wzrost zawartości $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ w suchych ekstraktach spowodowany wydłużeniem czasu inkubacji wodnych roztworu 5-CQA,

postanowiono powtórzyć powyższy eksperyment biorąc do badań roztwór 5-CQA inkubowany przez 24 godziny w temperaturze 25°C oraz jego suchy ekstrakt. Z rys. 45C



Rys. 45. Widma ^1H (90 % $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$, 600 MHz) świeżo przygotowanego (A) i inkubowanego przez 24 godziny (C) wodnego roztworu 5-CQA oraz widma ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchych ekstraktów ze świeżo przygotowanego wodnego roztworu 5-CQA (B) i roztworu inkubowanego przez 24 godziny (D). Wg. [P3].

wynika, że na widmie ^1H inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA nie obserwuje się sygnałów pochodzących od $[2\text{x}5\text{-CQA}\cdot 2\text{xH}_2\text{O}]$, natomiast są one wyraźnie widoczne na widmie suchego ekstraktu (patrz rys. 45D). Porównanie widm zaprezentowanych na rys. 45B i D dowodzi, że w suchym ekstrakcie otrzymanym po inkubacji obecne są wyraźnie większe ilości hydratów 5-CQA niż w suchym ekstrakcie uzyskanym ze świeżo sporządzonego roztworu. Powyższe wyniki mogą sugerować nieobecność kompleksów $[2\text{x}5\text{-CQA}\cdot 2\text{xH}_2\text{O}]$ w roztworach wodnych 5-CQA lub to, że metody NMR nie są odpowiednie do ich wykrycia w roztworach wodnych. Jednak, jeśli hydraty 5-CQA powstają już w jego roztworach wodnych i ich stężenia wzrastają wraz z wydłużaniem czasu inkubacji to podczas takiego procesu należałoby się spodziewać zmian pewnych właściwości fizykochemicznych roztworów 5-CQA i samego 5-CQA. Dlatego też postanowiono przebadать zmiany wybranych fizykochemicznych właściwości roztworów 5-CQA w czasie.

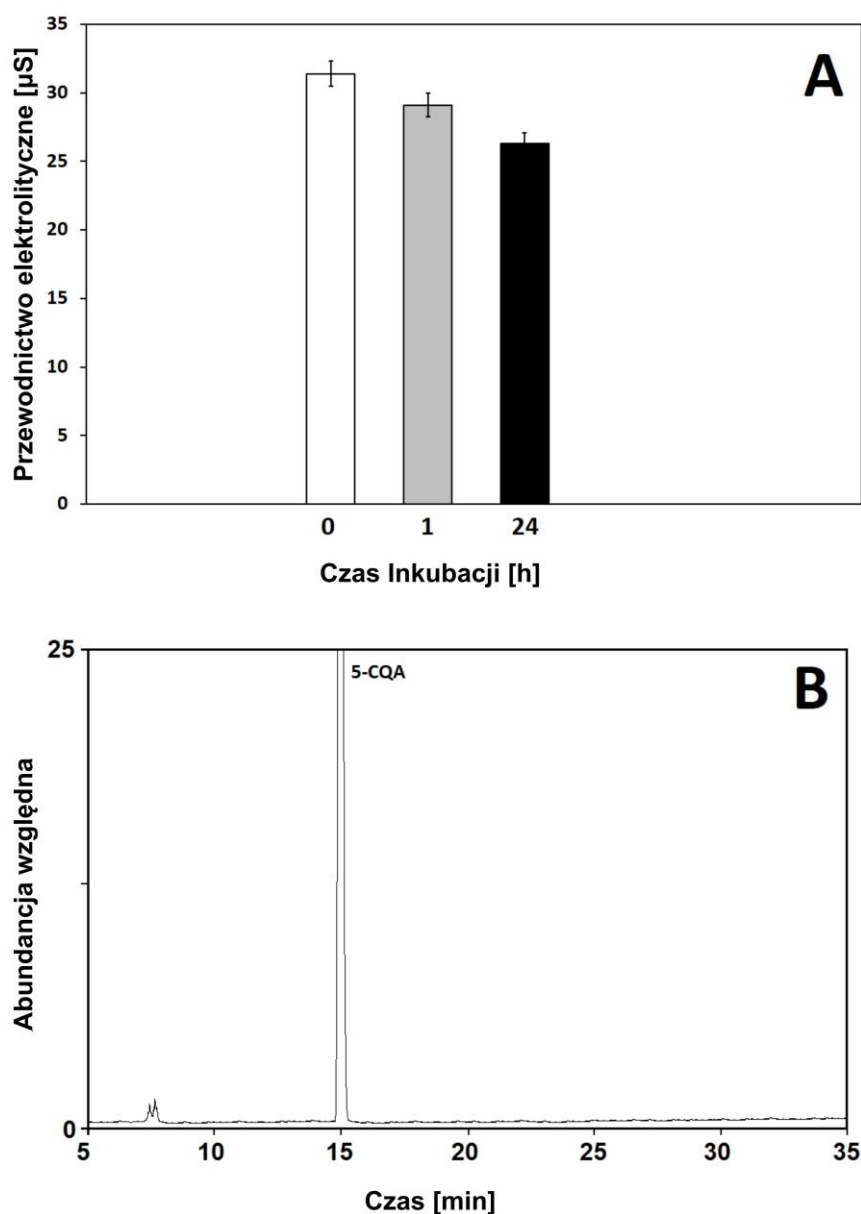
14.2. Ocena wybranych właściwości fizykochemicznych wodnych roztworów 5-CQA

Przewodnictwo elektrolityczne

Jedną z podstawowych wielkości fizykochemicznych, której pomiary mogą dostarczyć przydatnych informacji o roztworach 5-CQA jest przewodnictwo elektrolityczne. Konduktometria jest techniką stosunkowo prostą i nieinwazyjną względem cząsteczek przenoszących ładunek elektryczny, co może mieć szczególne znaczenie w przypadku ewentualnie tworzących się hydratów 5-CQA w trakcie inkubacji jego roztworu. Wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA na ich przewodnictwo elektrolityczne przedstawia rys. 46A. Wszystkie pomiary przewodnictwa zostały przeprowadzone w jednej serii pomiarowej w celu uniknięcia efektów związanych ze starzeniem elektrod. Z przedstawionych danych wynika, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji maleje przewodnictwo otrzymanych roztworów ($F_{\text{crit}} < F_{\text{exp}}$). W tym miejscu należy podkreślić, że ładunek swobodnej/niezwiązanej cząsteczki 5-CQA oraz ładunek 5-CQA w jego hydratách (w odniesieniu do pojedynczej molekuly) są takie same. Potwierdzeniem tego jest identyczne pH każdego z otrzymanych roztworów, którego wartość wynosiła 4.09. Ponadto, inkubowane roztwory nie zawierały żadnych dodatkowych nośników ładunku elektrycznego, jakimi w przypadku 5-CQA mogłyby być kwas chinowy oraz kawowy powstające podczas jego hydrolizy (patrz rys. 46B przedstawiający chromatogram wodnego roztworu 5-CQA po 24 godzinach inkubacji). Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, iż obserwowany spadek przewodnictwa następujący w skutek wydłużenia czasu inkubacji jest prawdopodobnie związany z tworzeniem się coraz większej liczby hydratów 5-CQA o zmniejszonej mobilności w porównaniu do mobilności swobodnych/niezwiązanych cząsteczek 5-CQA. Tak więc, obserwowane zmiany przewodnictwa elektrolitycznego mogą być uznane za pośredni dowód tego, że hydraty 5-CQA powstają już podczas inkubacji wodnych roztworów 5-CQA.

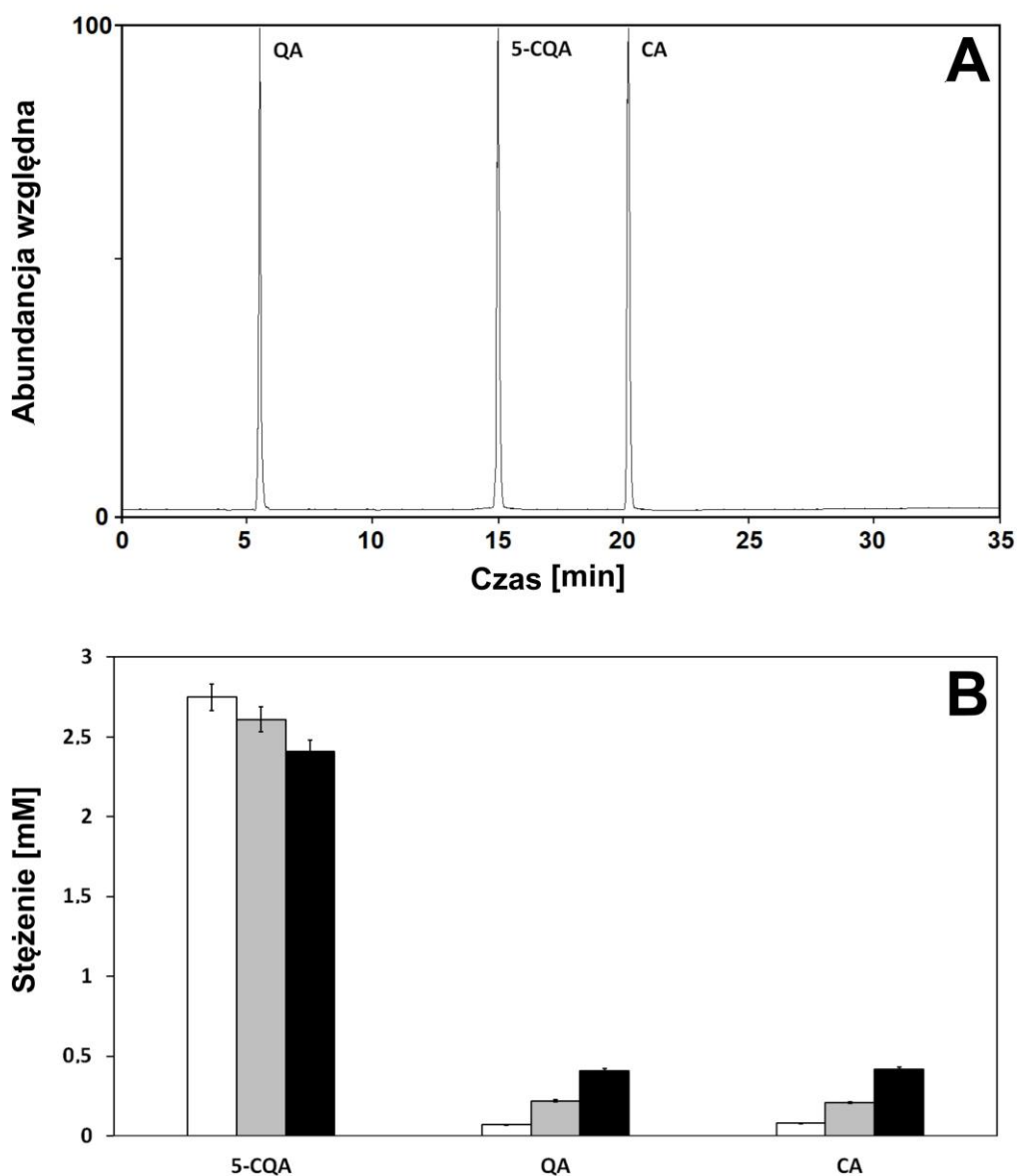
Hydroliza 5-CQA

Kwas 5-kawoilochinowy jest estrem kwasu chinowego i kwasu kawowego (patrz podrozdział 2.1). Te dwa ostatnie kwasy mogą pojawiać się w wodnych roztworach 5-CQA na skutek jego hydrolizy. W efekcie takiego procesu powstają równomolowe ilości kwasu chinowego i kwasu kawowego. Jeśli hydraty 5-CQA powstają już podczas inkubacji jego wodnych roztworów i ich stężenie rośnie w czasie, to stopień hydrolizy 5-CQA powinien



Rys. 46. (A) - Wpływ czasu inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na przewodnictwo elektrolityczne oraz
(B) - przykładowy chromatogram LC-MS (tryb SCAN) wodnego roztworu 5-CQA po jego 24 godzinnej inkubacji. Wg. [P3].

zależać od czasu inkubacji przy założeniu, że podatność hydrolityczna niezwiązanego 5-CQA i jego hydratów jest różna. Przykładowy chromatogram hydrolizatu 5-CQA otrzymany po jego częściowej hydrolizie jest przedstawiony na rys. 47A. Roztwór otrzymany po godzinnej hydrolizie 5-CQA zawiera resztę nieprzereagowanego 5-CQA oraz produkty jego hydrolizy, t.j. kwas kawowy i chinowy. Należy podkreślić, że dwa ostatnie kwasy nie są obecne



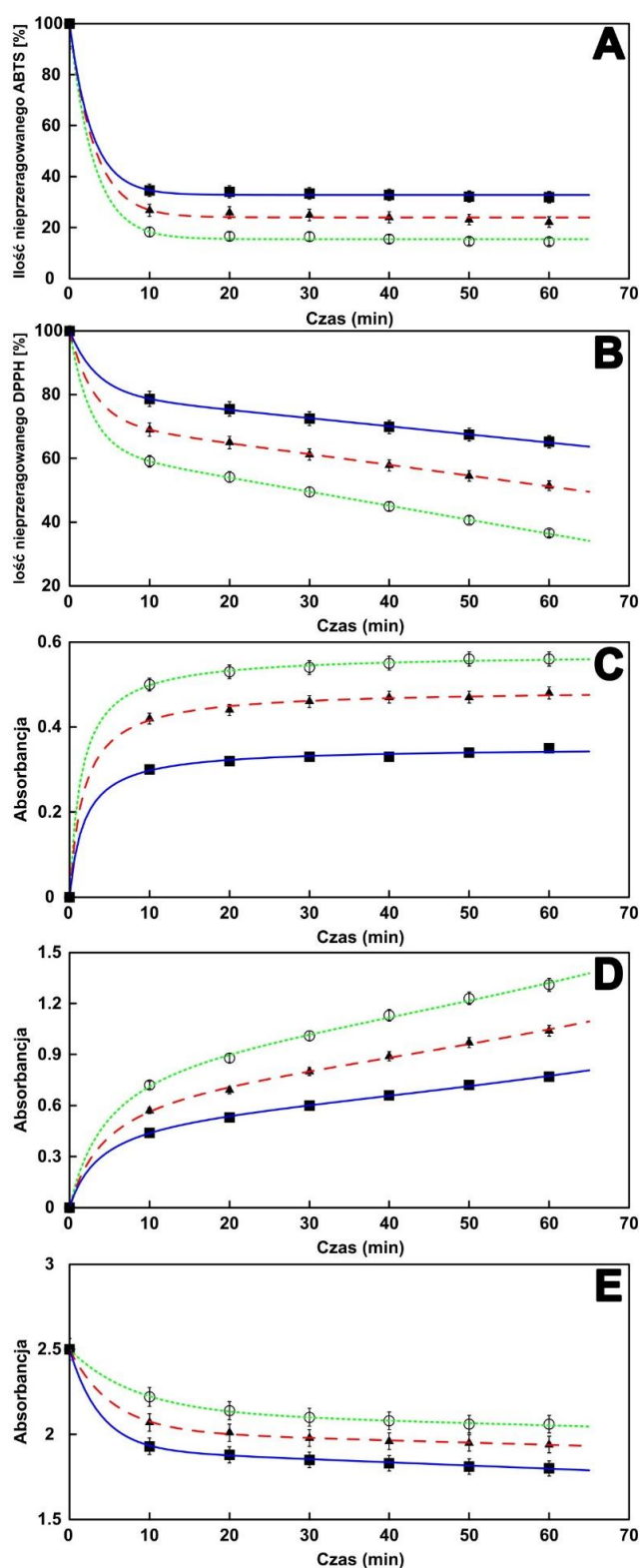
Rys. 47. (A) - Przykładowy chromatogram LC-MS (tryb SIM) hydrolizatu wodnego roztworu 5-CQA inkubowanego przez 24 godziny oraz
(B) - stężenia 5-CQA, kwasu kawowego i kwasu chininowego w hydrolizatach ze świeżo przygotowanych i inkubowanych przez 1 i 24 godziny wodnych roztworów 5-CQA. Wg. [P3].

w inkubowanych roztworach 5-CQA przed procesem hydrolizy (patrz rys. 46B). Rys. 47B pokazuje, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji (poprzedzającej hydrolizę) roztworów 5-CQA rośnie stopień jego hydrolizy ($F_{\text{crit}} < F_{\text{exp}}$). Biorąc pod uwagę zmniejszoną mobilność hydratów

5-CQA można byłoby spodziewać się odwrotnej zależności, tzn. spadku stopnia hydrolizy wraz ze wzrostem czasu inkubacji (wzrostem stężenia hydratów). Należy jednak pamiętać, że w hydratách 5-CQA obecne są wiązania wodorowe powstające pomiędzy cząsteczką wody oraz grupami OH₃, OH₄ i grupą estrową kwasu chlorogenowego. Występowanie wymienionego oddziaływania może skutkować tym, że grupa estrowa w hydratách 5-CQA jest bardziej podatna na hydrolizę niż analogiczna grupa w wolnej cząsteczce 5-CQA. Tak więc, obserwowany wzrost stopnia hydrolizy 5-CQA wraz ze wzrostem czasu inkubacji jego roztworów też najprawdopodobniej jest związany ze wzrostem ilości hydratów 5-CQA powstających podczas inkubacji. Tym samym przedstawione wyżej wyniki to kolejny pośredni dowód tego, że hydraty 5-CQA powstają już podczas inkubacji jego wodnych roztworów.

Właściwości przeciwutleniające

Jednym z najbardziej istotnych atrybutów kwasów chlorogenowych są ich silne właściwości przeciwutleniające (patrz podrozdział 2.4), które najczęściej określa się oceniając ich zdolność do: zmiatania wolnych rodników, spowalniania reakcji utleniania wybranych związków oraz redukcji jonów metali. Ocena właściwości przeciwutleniających zazwyczaj obejmuje badanie kinetyki wymienionych powyżej procesów. Jeśli hydraty 5-CQA powstają już w inkubowanych roztworach i ich ilość wzrasta wraz z czasem inkubacji roztworu to kinetyka reakcji wykorzystywanych do oceny właściwości utleniających 5-CQA także powinna ulegać zmianom. Rys. 48A–E przedstawiają krzywe opisujące kinetykę: (1) zmiatania kationorodników ABTS i rodników DPPH (patrz odpowiednio rys. 48A i B), (2) redukcji jonów Cu²⁺ w postaci kompleksów z neokupreina i redukcji jonów Fe³⁺ w postaci kompleksów z 2,4,6-Tri(2-pirydylo)-s-triazyną (patrz odpowiednio rys. 48C i D) oraz (3) spowalniania utleniania beta-karotenu (patrz rys. 48E) w reakcjach z wodnymi roztworami 5-CQA inkubowanymi przez różny okres czasu. Porównanie poszczególnych krzywych wskazuje, że wydłużenie czasu inkubacji powoduje spowolnienie kinetyki zmiatania rodników (rys. 48A i B) oraz przyspieszenie reakcji redoks (rys. 48C–E). Innymi słowy, następuje spadek aktywności przeciwutleniającej 5-CQA wraz ze wzrostem czasu inkubacji jego roztworów ($F_{crit} < F_{exp}$ określona dla wartości otrzymanych po 60 minutach każdej z reakcji). Powyższe zmiany najprawdopodobniej wynikają ze wzrostu stężenia hydratów 5-CQA, które cechuje niższa aktywność przeciwutleniająca niż w przypadku swobodnych/niezwiązanych cząsteczek 5-CQA. Należy w tym miejscu podkreślić, że



Rys. 48. Krzywe przedstawiające kinetykę reakcji zachodzących pomiędzy kationorodnikami ABTS (A) lub rodnikami DPPH (B) lub kompleksami Cu(II)-neokupreina (C) lub kompleksami Fe(III)-2,4,6-Tri(2-pirydylo)-s-triazyna (D) lub rodnikami peroksyłowymi (E) a wodnymi roztworami 5-CQA, które były nieinkubowane (zielona kropkowana krzywa z okręgami) i inkubowane przez 1 i 24 godziny (odpowiednio przerywana czerwona krzywa z trójkątami i niebieska linia z kwadratami). Wg. [P3].

właściwości antyoksydacyjne polifenoli wynikają przede wszystkim z obecności grup fenolowych uczestniczących w reakcjach rodnikowych i redoks (patrz podrozdział 1.3). Powstawanie hydratów 5-CQA w postaci $[2x5-CQA \cdot 2xH_2O]$, w przypadku których dostęp rodników i kompleksów do grup Ar-OH jest utrudniony może tłumaczyć omawiane wyniki. Inną potencjalną przyczyną obserwowanych tendencji mogą być zmiany w strukturze wiązań wodorowych, które uczestniczą w stabilizacji powstających rodników 5-CQA. Niezależnie od tego, która z wymienionych przyczyn występowania słabszych właściwości przeciwutleniających hydratów 5-CQA jest bardziej prawdopodobna, wyniki zaprezentowane w niniejszym podrozdziale są kolejnym pośrednim dowodem powstawania hydratów 5-CQA w jego wodnych roztworach.

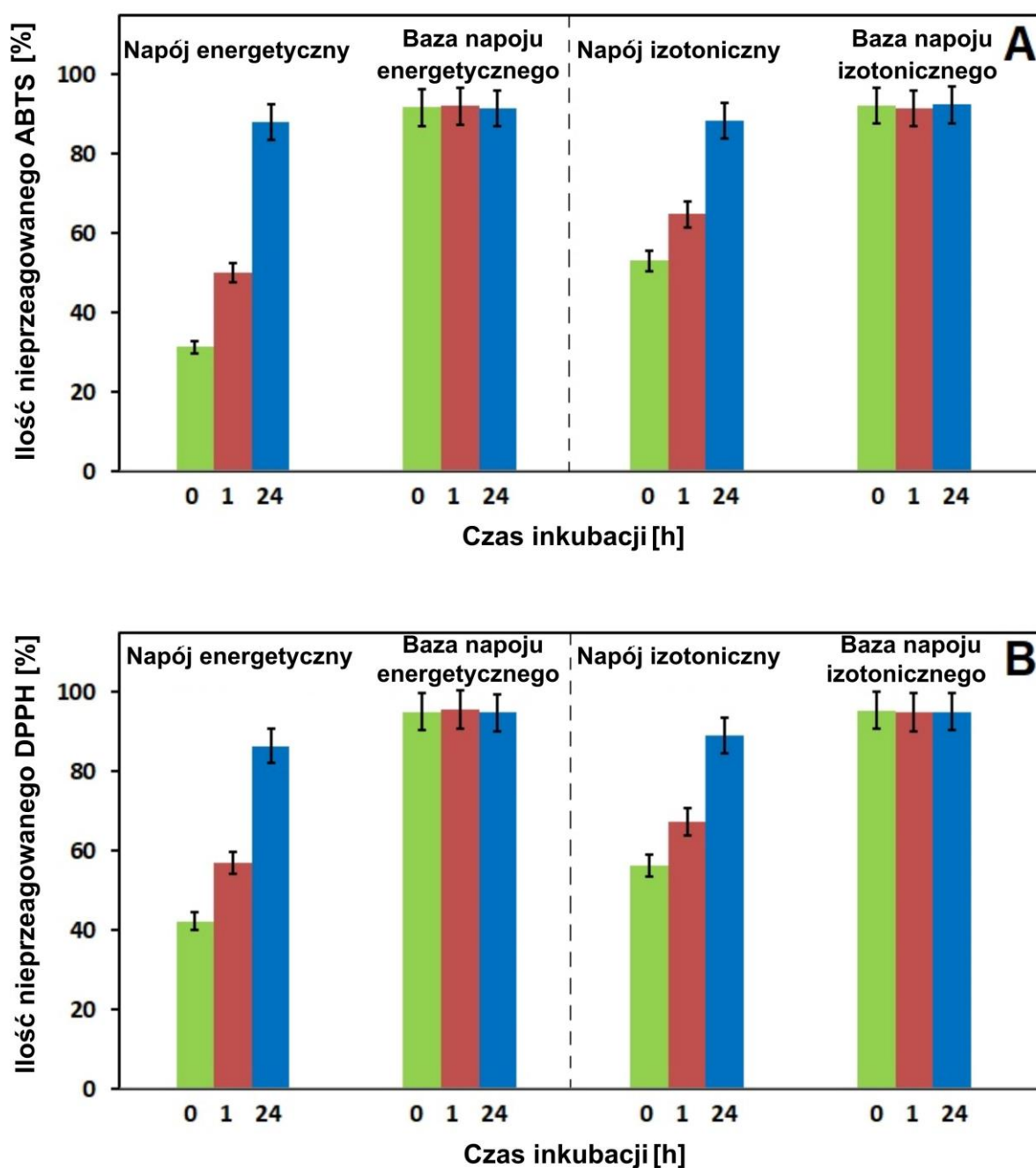
W świetle przedstawionych dowodów wskazujących na to, że hydraty 5-CQA tworzą się już w wodnych roztworach jego kwasu brak widocznych zmian na widmach 1H wodnych roztworów 5-CQA wydaje się zaskakujący. Wytlumaczeniem tego faktu mogą być:

- zbyt małe różnice wartości przesunięć chemicznych niezwiązanego 5-CQA i jego cząsteczek w hydratách,
- występowanie procesów wymiany chemicznej pomiędzy 5-CQA i jego hydratami, których szybkość jest zbyt wysoka by możliwe było zarejestrowanie poszczególnych form 5-CQA zaangażowanych w takie dynamiczne procesy.

Ocena właściwości przeciwutleniających modelowych produktów spożywczych zawierających 5-CQA

Jak wynika z poprzednich podrozdziałów przekształcenie 5-CQA do hydratów zachodzi już podczas inkubacji jego wodnych roztworów. W tym miejscu można postawić pytanie czy podobne procesy mają również miejsce w produktach spożywczych zawierających 5-CQA? Uzyskanie jednoznacznej i bezpośredniej odpowiedzi na postawiony problem wydaje się trudne z powodu wysokiej złożoności takich próbek. Dlatego w celu otrzymania przynajmniej uproszczonego obrazu postawionego problemu, postanowiono zbadać wpływ przechowywania modelowych produktów spożywczych (mieszanin o stosunkowo niskim stopniu złożoności, które mogą być już uznane za produkty spożywcze) na ich fizykochemiczne właściwości wskazujące powstawanie w nich hydratów 5-CQA. Jako przykładowe produkty wykorzystano modelowe napoje (napój energetyczny oraz napój izotoniczny), dla których badano zmiany kinetyki reakcji rodnikowych przed i po ich inkubacji. Rys. 49 przedstawia procent kationorodników ABTS i rodników DPPH pozostałych po 60 minutach prowadzenia reakcji ze

świeżo sporządzonymi oraz inkubowanymi modelowymi napojami i ich bazami (czyli napojami niezawierającymi 5-CQA). Jak widać, wzrost czasu inkubacji prowadzi do spadku zdolności zmiatania wolnych rodników przez modelowe produkty (procent nieprzereagowanych rodników w układzie pomiarowym wzrasta)



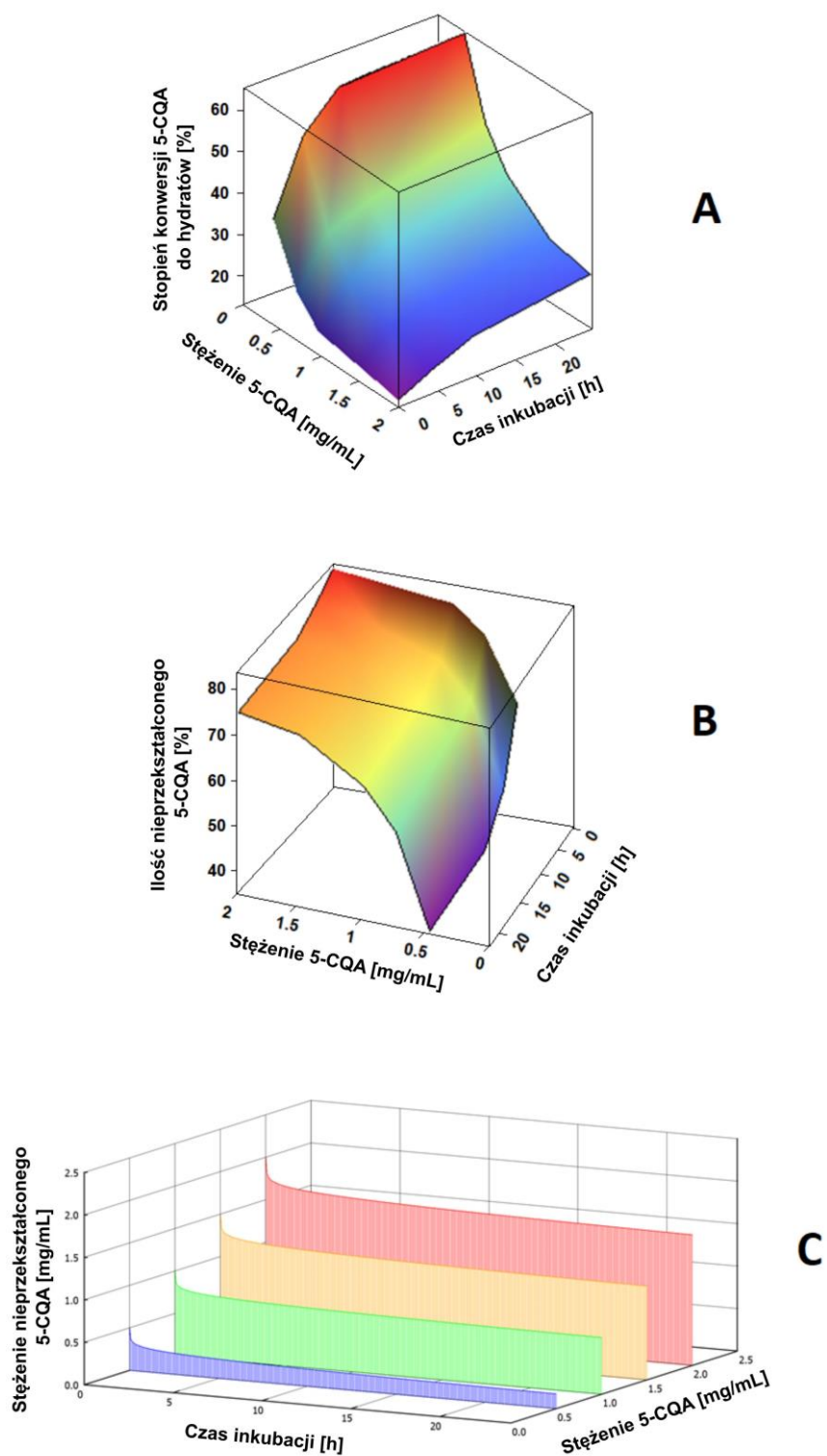
Rys. 49. Procent nieprzereagowanego kationorodnika ABTS (A) i rodnika DPPH (B) po 60 minutach reakcji ze świeżo przygotowanymi i inkubowanymi przez 1 i 24 godziny modelowymi napojami izotonicznymi, modelowymi napojami energetycznymi i ich bazami. Wg. [P3].

wraz z wydłużeniem czasu inkubacji). Należy zauważyć, że roztwory stanowiące bazy poszczególnych napojów nie wykazują zdolności zmiatania wolnych rodników. Tym samym, właściwości przeciwutleniające badanych modelowych produktów spożywczych i ich obniżenie wraz z wydłużeniem czasu inkubacji są związane odpowiednio z obecnością 5-CQA i jego transformacją podczas ich inkubacji. Podobnie jak w przypadku wodnych roztworów 5-CQA, tak i w przypadku modelowych produktów spożywczych obserwowane zmiany właściwości przeciwutleniających można wytłumaczyć przekształceniem 5-CQA do jego hydratów.

14.3. Częstkowy rząd reakcji tworzenia hydratów 5-CQA w jego roztworach wodnych

Badania omawiane w rozdziale 13 wskazują, że kompleksy $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ powstają w wyniku zderzeń zachodzących pomiędzy odpowiednio zorientowanymi cząsteczkami kwasu chlorogenowego oraz monomerami/dimerami wody. Dyskusja wyników zaprezentowana w tym rozdziale podkreśla, że stężenie monomerów/dimerów wody w roztworach 5-CQA jest bardzo niskie i tym samym jest czynnikiem decydującym o szybkości powstawania hydratów 5-CQA. Jeżeli taki mechanizm jest prawdziwy to cząstkowy rząd takiej reakcji względem 5-CQA powinien wynosić zero, t.j. kinetyka tworzenia kompleksów $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ nie powinna zmieniać się wraz ze stężeniem 5-CQA. Taka hipoteza wydaje się prawdopodobna jeżeli przyjmie się, że szybkość odtwarzania monomerów/dimerów wody w silnie zasocjowanych roztworach jest niewielka i stała. Tak więc, drugim celem badań przedstawionych w niniejszym rozdziale było zbadanie wpływu stężenia 5-CQA w jego wodnych roztworach na kinetykę reakcji tworzenia kompleksów $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$.

Rys. 50A przedstawia wpływ czasu inkubacji na stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów w jego wodnych roztworach o różnych początkowych stężeniach 5-CQA, natomiast rys. 50B pokazuje jak czas inkubacji wpływa na procent nieprzereagowanego 5-CQA w tych roztworach. Z analizy wykresu 3D na rys. 50B wynika, że kinetyka transformacji 5-CQA do $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ nie zależy od początkowego stężenia 5-CQA. Jest to lepiej widoczne na rys. 50C pokazującym wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA na spadek jego stężenia. Jak widać, ubytek 5-CQA podczas jego transformacji do hydratów jest stały w rozpatrywanym przedziale czasu i nie zależy od początkowego stężenia tego kwasu.



Rys. 50. Wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA o różnym stężeniu na:
 (A) - stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów,
 (B) - procentową zawartość nieprzekształconego 5-CQA i
 (C) - zawartość nieprzekształconego 5-CQA wyrażoną w [mg/mL]. Wg. [P3].

Pomimo malejącego stosunku liczby moli monomerycznej/dimerycznej wody do liczby moli 5-CQA w jego wodnych roztworach, szybkość powstawania hydratów jest niemal stała. Można to wytłumaczyć tym, że szybkość „odtworzenia” monomerów/dimerów wody w silnie zasocjowanych roztworach wodnych 5-CQA jest znacznie niższa od szybkości tworzenia hydratów 5-CQA. Tym samym, cząstkowy rząd reakcji powstawania hydratów 5-CQA względem stężenia 5-CQA jest pseudo-zeroowy, co dodatkowo potwierdza słuszność zaproponowanego mechanizmu tworzenia hydratów.

15. Wpływ metod przygotowania próbek do analizy na powstawanie hydratów 5-CQA

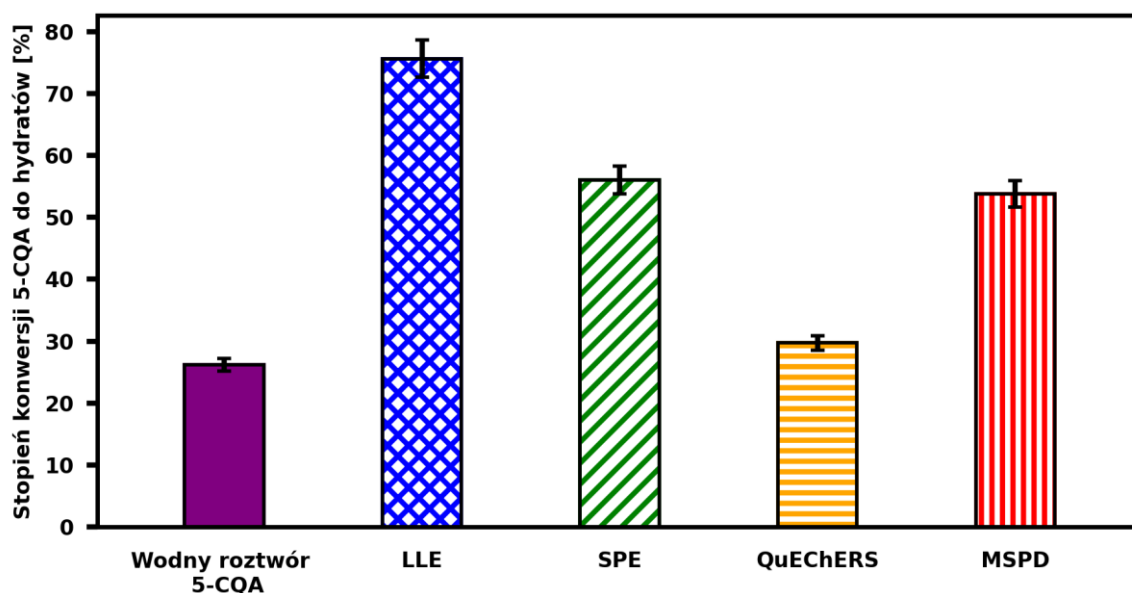
Rozpatrując możliwości analityczne techniki NMR należy zauważyć, że jej istotną wadą jest nie tylko niska czułość, ale także niepewność w przypadku identyfikacji nieznanymi związków w złożonych mieszaninach. Dlatego w wielu przypadkach próbki przeznaczone do badań z zastosowaniem NMR są najpierw zateżane i oczyszczane od zanieczyszczeń z użyciem technik przygotowania próbek. Przykładami tych metod są ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE), ekstrakcja do fazy stałej (SPE), technika QuEChERS, technika dyspersji matrycy w fazie stałej (MSPD), przy czym najczęściej do analiz NMR stosuje się LLE i SPE [227-229]. W każdej z wymienionych technik typowo wykorzystywane są rozpuszczalniki i/lub sorbenty o hydrofobowym charakterze (heksan, octan etylu, sorbenty C-18, C-8 itp.). W tym miejscu należy nadmienić, że na granicy faz woda/faza hydrofobowa i w jej pobliżu struktura wody jest silnie zaburzona [230-232]. Mając na uwadze fakt, iż hydraty 5-CQA powstają w jego reakcji z monomerycznymi/dimerycznymi cząsteczkami wody można postawić pytanie czy kontakt wodnego roztworu 5-CQA z hydrofobowymi rozpuszczalnikami w technice LLE lub z hydrofobowymi sorbentami w technikach SPE, QuEChERS i MSPD ma wpływ na stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$. Pytanie to jest uzasadnione, ponieważ na granicy faz w zaburzonej strukturze wody mogą być obecne większe ilości monomerycznych/dimerycznych cząsteczek wody lub mogą być one z tej zaburzonej struktury łatwiej wychwytywane przez 5-CQA niż z objętościowej części fazy wodnej. Wyniki badań przedstawione w niniejszym rozdziale pokazują wpływ wymienionych technik przygotowania próbek na stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ jaki obserwuje się w wyniku analizy NMR suchych pozostałości otrzymanych po odparowaniu ekstraktów LLE, SPE, QuEChERS i MSPD z wodnych roztworów 5-CQA oraz ekstraktów LLE i SPE z produktów spożywczych i roślinnych zawierających 5-CQA.

15.1. Wpływ metody przygotowania próbki do analiz na powstawanie hydratów 5-CQA - porównanie technik ekstrakcji

Rys. 51 przedstawia wartości stopnia transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określone za pomocą NMR w suchych ekstraktach otrzymanych po odparowaniu:

- wody z wodnego roztworu 5-CQA,
- octanu etylu z ekstraktu otrzymanego w wyniku ekstrakcji ciecz-ciecz wodnego roztworu 5-CQA,
- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent kolumnienki SPE na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA,
- acetonitrylu z końcowego ekstraktu uzyskanego w wyniku ekstrakcji wodnego roztworu 5-CQA techniką QuEChERS, oraz
- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent kolumnienki upakowanej zawiesziną sorbentu i wodnego roztworu 5-CQA po procedurze MSPD.

Zaprezentowany diagram wskazuje, że w przypadku wszystkich wykorzystanych technik przygotowania próbek w suchych ekstraktach obserwuje się większy stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ niż po odparowaniu wody z wodnego roztworu 5-CQA (t.j. większy niż 26 %) ($F_{\text{crit}} < F_{\text{exp}}$). Należy zauważyć, że w każdej z zastosowanych metod wodny roztwór 5-CQA miał kontakt z fazą hydrofobową, t.j. z octanem etylu lub sorbentem C-18, która zaburza silnie zasocjowaną strukturę wody. Tak więc, kontakt wodnych roztworów 5-CQA z fazami hydrofobowymi (rozpuszczalnikami ekstrakcyjnymi lub sorbentem C-18) zwiększa stopień konwersji 5-CQA do jego hydratów. Warto również podkreślić, że zastosowanie techniki QuEChERS powoduje znacznie mniejszy przyrost stopnia transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ niż w przypadku pozostałych technik. Wy tłumaczeniem tego mogą być bardzo wysokie stężenia soli ekstrakcyjnych (MgSO_4 i NaCl) stosowanych w układach QuEChERS (których jony są silnie hydratowane i tym samym ich solwatacja stanowi proces konkurencyjny względem procesu tworzenia hydratów 5-CQA) oraz małe ilości sorbentu C-18 wykorzystywanego wyłącznie do usuwania zanieczyszczeń w ostatnim etapie procedury. W takich układach liczba cząsteczek wody w postaci monomerów i dimerów jest prawdopodobnie niska, co utrudnia powstawanie hydratów 5-CQA.



Rys. 51. Stopień transformacji 5-CQA do $2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu:

- wody z wodnego roztworu 5-CQA;
- octanu etylu z ekstraktu otrzymanego w wyniku ekstrakcji ciecz-ciecz wodnego roztworu 5-CQA
- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent dla kolumnienki na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA w technice SPE;
- acetonitrylu z końcowego ekstraktu uzyskanego w wyniku ekstrakcji wodnego roztworu 5-CQA z wykorzystaniem techniki QuEChERS;
- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent dla kolumnienki upakowanej zawiesziną sorbentu i wodnego roztworu 5-CQA w technice MSPD. Wg. [P4].

Chociaż wzrost stopnia konwersji obserwuje się w przypadku zastosowania każdej z powyższych technik, dalsze badania omawiane w niniejszym rozdziale prowadzono z wykorzystaniem LLE i SPE, czyli technik, które z jednej strony są najczęściej stosowane w praktyce, a z drugiej generują znaczny wzrost stopnia konwersji.

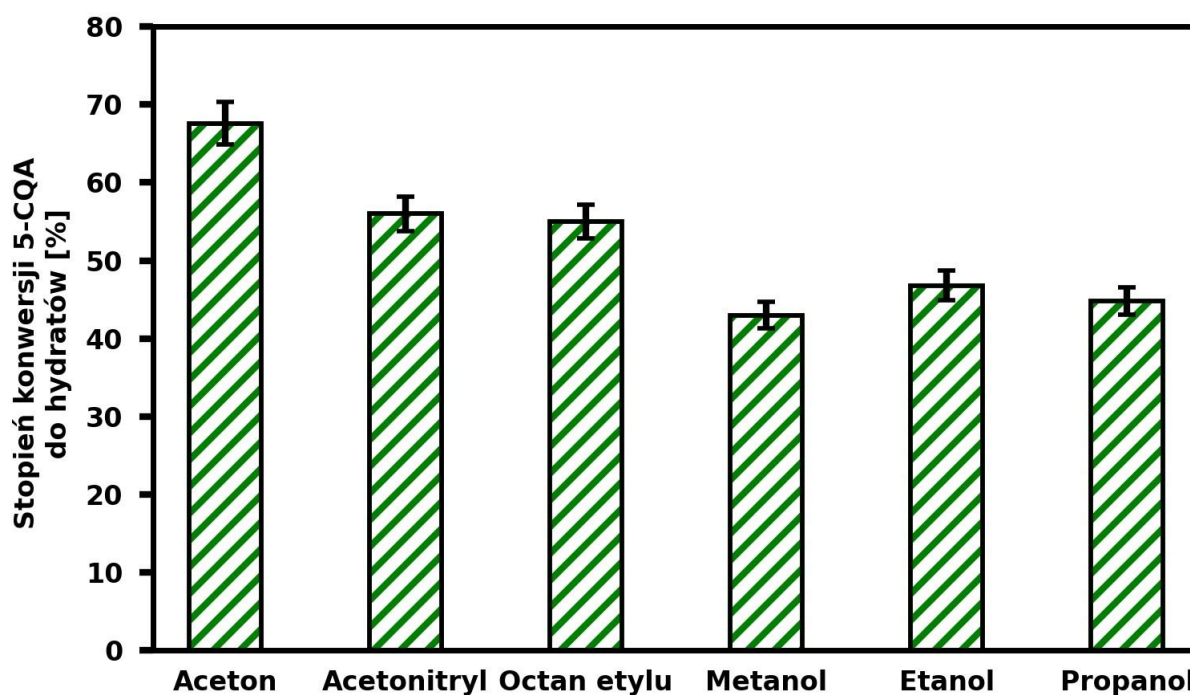
15.2. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji SPE - wpływ eluentu stosowanego w technice SPE

Ekstrakcja do fazy stałej jest jedną z najczęściej wykorzystywanych i najbardziej uniwersalnych metod przygotowania próbek do analiz instrumentalnych. Wprowadzie zastosowanie techniki SPE, podobnie jak technik LLE, QuEChERS i MSPD umożliwia:

- uproszczenie złożonych matryc,

- redukcję efektów matrycowych w układach GC-MS i LC-MS,
- frakcjonowanie składników próbek na poszczególne klasy związków, oraz
- zateżenie związków,

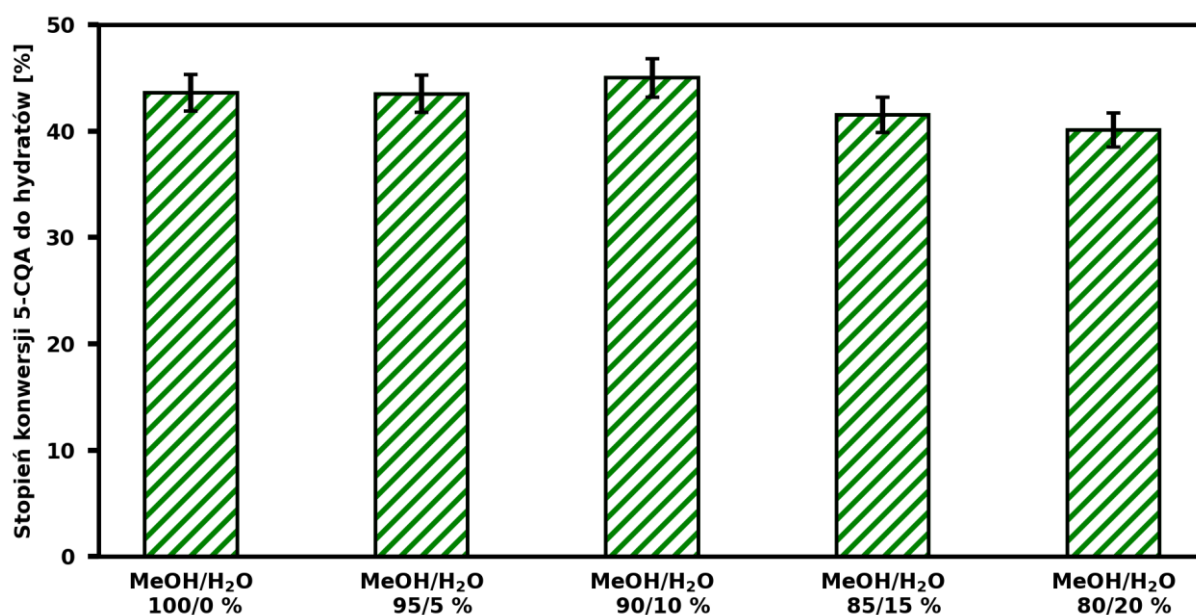
jednak te ostatnie w przeciwieństwie do SPE nie mogą być w prosty sposób zautomatyzowane. W zależności od właściwości związków obecnych w próbce poddawanej procesowi SPE, do prowadzenia elucji składników matrycy oraz analitów wykorzystuje się zarówno hydrofobowe (np. octan etylu, dichlorometan) jak i umiarkowanie polarne (alkohole) eluenty. Ponieważ do elucji 5-CQA z sorbentu C-18 można wykorzystać wiele rozpuszczalników pojawia się pytanie czy wybór eluentu ma wpływ na stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$. Odpowiedź na postawiony problem jest przedstawiona na rys. 52. Jak widać najniższy przyrost wartości stopnia konwersji 5-CQA (odnosząc do stopnia transformacji suchej pozostałości wodnego roztworu 5-CQA – patrz rys. 51) obserwuje się w przypadku alkoholi, natomiast największe wartości otrzymuje się po elucji 5-CQA za pomocą acetonu. Takie zmiany stopnia konwersji można tłumaczyć różnicami w zdolności poszczególnych rozpuszczalników do niszczenia silnie zasocjowanych struktur hydratów 5-CQA podczas ich elucji z sorbentu C-18 [230-232].



Rys. 52. Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu eluentu wykorzystanego do elucji 5-CQA z kolumny C-18 na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA. Wg. [P4].

15.3. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji SPE - elucja 5-CQA mieszaninami metanol/woda

Do elucji związków polifenolowych z kolumny SPE C-18 najczęściej wykorzystuje się metanol oraz jego wodne roztwory. Wpływ stężenia wody w eluencie MeOH/H₂O na stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów przedstawia rys. 53. Dotyczy on zmiany zawartości wody w eluencie w zakresie od 0 do 20 %, a więc w zakresie w którym eluent MeOH/H₂O charakteryzuje się wysoką siłą elucji. Jak wynika z rys. 53, w przypadku każdej zastosowanej mieszaniny MeOH/H₂O stopień konwersji w otrzymanych suchych ekstraktach jest znacznie wyższy niż po odparowaniu wody z wodnego roztworu 5-CQA, przy czym wzrost zawartości wody w tych eluentach nie ma istotnego wpływu na stopień transformacji (niewielkie różnice są w zakresie błędu pomiarowego, $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$). Powyższe wyniki wskazują, że zdolność poszczególnych mieszanin MeOH/H₂O do niszczenia silnie zasocjowanych struktur hydratów 5-CQA podczas ich elucji z sorbentu C-18 jest zbliżona.



Rys. 53. Wpływ stężenia wody w mieszaninach metanol/woda wykorzystanych do elucji 5-CQA z kolumny SPE na stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu rozpuszczalnika. Wg. [P4].

15.4. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji wodnych roztworów 5-CQA - eksperymenty dodatkowe

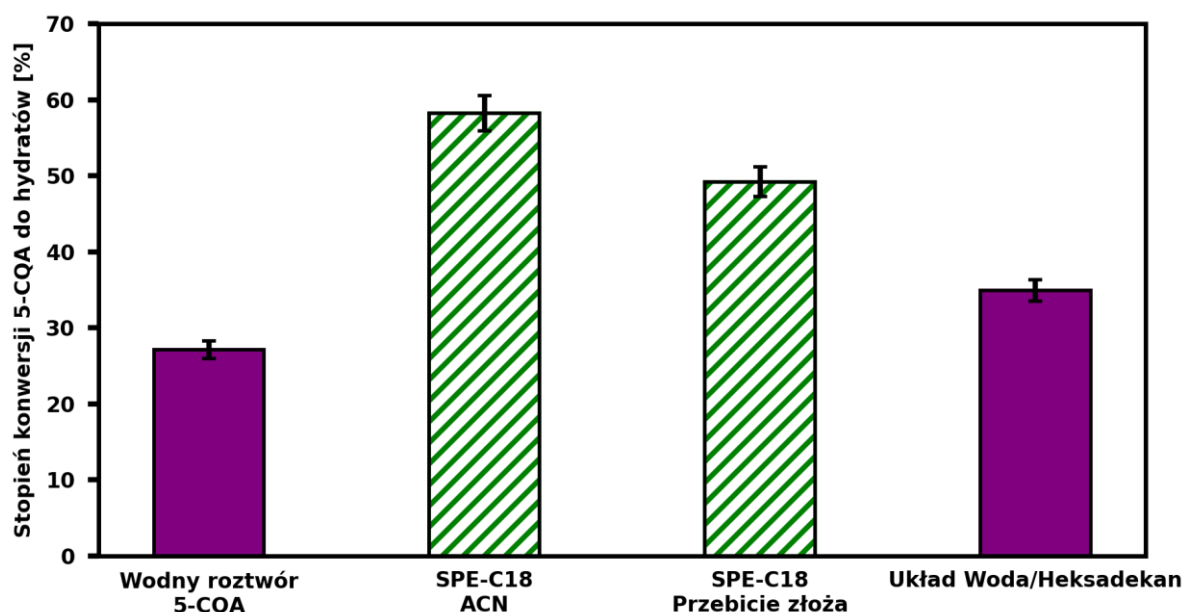
W celu dalszego potwierdzenia wpływu kontaktu mediów hydrofobowych z roztworem 5-CQA na konwersję 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ postanowiono przeprowadzić dodatkowe eksperymenty z udziałem techniki SPE oraz roztworów 5-CQA w wodzie zawierającej śladowe ilości rozpuszczalników hydrofobowych. W przypadku ekstrakcji do fazy stałej należy podkreślić, że zaburzenie struktury roztworu wodnego 5-CQA prowadzące do wzrostu konwersji 5-CQA do jego hydratów może mieć kilka przyczyn, takich jak:

- wpływ grup oktadecylowych przyłączonych do powierzchni żelu krzemionkowego (lub innych grup wykorzystywanych do modyfikacji powierzchni żelu krzemionkowego),
- kontakt z eluentem (co częściowo potwierdzają wyniki przedstawione w podrozdziałach 15.2 i 15.3), oraz
- występowanie oddziaływań 5-CQA z niezmodyfikowanymi fragmentami powierzchni żelu krzemionkowego.

Eksperymenty omawiane w tym rozdziale prowadzono przy wykorzystaniu sorbentu C-18, który był również poddawany procesowi „endcapping’u”, co wyklucza wpływ ostatniej z wymienionych przyczyn. W tym miejscu można postawić pytanie jaki jest wkład pozostałych czynników na wzrost konwersji 5-CQA do jego hydratów podczas ekstrakcji do fazy stałej. Odpowiedź zawarta jest na rys. 54, który prezentuje wartości stopnia konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ w suchych ekstraktach otrzymanych po odparowaniu:

- wody z wodnego roztworu 5-CQA,
- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent kolumnienki SPE wypełnionej sorbentem C-18 na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA,
- wody z wodnego roztworu 5-CQA naniesionego na kolumnkę SPE wypełnioną sorbentem C-18 po przekroczeniu jej objętości przebiecia, oraz
- wody z wodnego roztworu 5-CQA po jego wcześniejszym wytrząsaniu z heksadekanem.

Z porównania wartości stopnia konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określonych w suchych pozostałościach ekstraktów SPE otrzymanych przy wykorzystaniu różnych



Rys. 54. Stopień transformacji 5-CQA do $2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu:

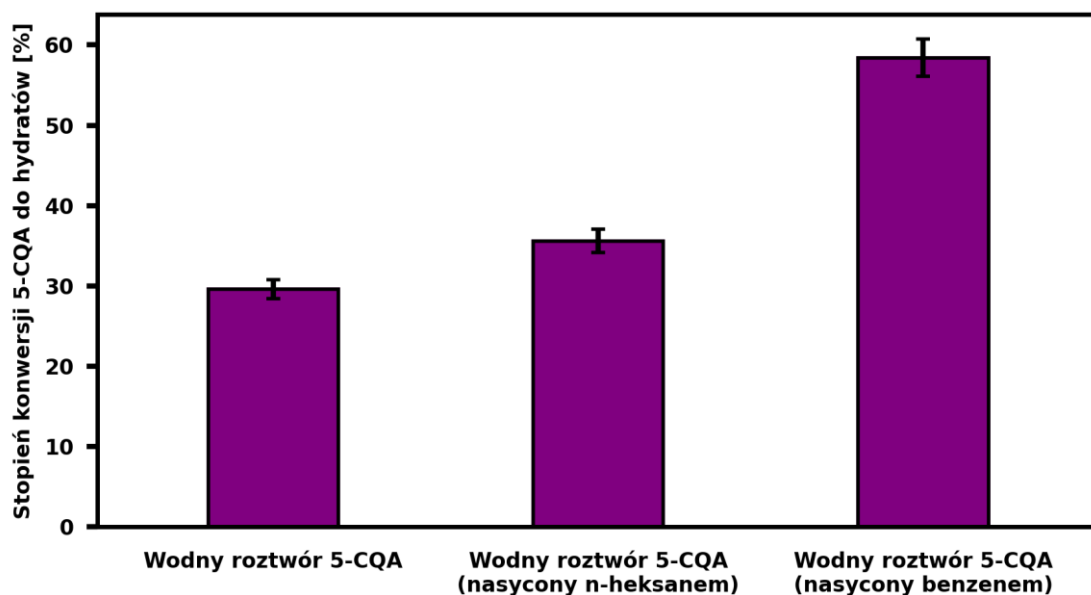
- wody z wodnego roztworu 5-CQA,
- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent kolumnienki SPE wypełnionej sorbentem C-18 na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA,
- wody z wodnego roztworu 5-CQA naniesionego na kolumnienkę SPE wypełnioną sorbentem C-18 po przekroczeniu jej objętości przebiecia, oraz
- wody z wodnego roztworu 5-CQA po jego wcześniejszym wytrząsaniu z heksadekanem.

eluentów i w suchej pozostałości wodnego wycieku z kolumnienki SPE po osiągnięciu punktu przebiecia (patrz rys. 52, 53 i 54) wynika, że największy wpływ na wzrost zawartości hydratów 5-CQA prawdopodobnie ma jego kontakt z hydrofobową powierzchnią sorbentu. Wyjątek stanowi ekstrakcja z zastosowaniem acetonu jako eluentu, co można wytłumaczyć występowaniem różnic w zdolności poszczególnych rozpuszczalników do niszczenia silnie zasocjowanych struktur hydratów 5-CQA (patrz poprzednie podrozdziały).

W świetle powyższych wyników oraz obserwowanego wzrostu stopnia konwersji 5-CQA do $2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}$ w przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz można byłoby spodziewać się podobnego przyrostu konwersji dla wodnego roztworu 5-CQA po jego kontakcie z długołańcuchowym n-alkanem. Jednak, jak wynika z danych na rys. 54, w takim układzie (układ woda/n-heksadekan) następuje znacznie mniejszy wzrost konwersji niż po ekstrakcji SPE czy też LLE. Tak więc, na podstawie obserwacji przedstawionych w niniejszym podrozdziale można stwierdzić, że w przypadku ekstrakcji do ciała stałego za wzrost konwersji odpowiada przede wszystkim „ukierunkowane” oddziaływanie grup hydrofobowych znajdujących się na powierzchni sorbentu C-18 ze składnikami roztworu,

t.j. cząsteczkami 5-CQA oraz wody. Natomiast w przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz znaczny wzrost konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ wskazuje na istnienie jeszcze innych czynników wpływających na ten proces. Należy w tym miejscu wziąć pod uwagę, że w układzie faz roztwór wodny/ciecz hydrofobowa dochodzi również do ograniczonego wzajemnego rozpuszczania się rozpuszczalników. Rys. 55 przedstawia wpływ nasycenia wodnego roztworu 5-CQA rozpuszczalnikami organicznymi na stopień konwersji tego kwasu do jego hydratów. Największy wzrost transformacji widoczny jest po nasyceniu wody benzenem, w przypadku którego rozpuszczalność w wodzie jest większa niż rozpuszczalność heksanu. Wysoka wartość stopnia transformacji w tym układzie, tj. około 60 %, sugeruje, że nasycenie roztworu wodnego 5-CQA rozpuszczalnikiem hydrofobowym jest główną przyczyną obserwowanego wzrostu stopnia konwersji dla ekstrakcji ciecz-ciecz. (Dla przypomnienia stopień konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ w suchym ekstrakcie LLE wodnego roztworu 5-CQA wynosi około 70 %).

Te eksperymenty potwierdzają przypuszczenie iż kontakt wodnego roztworu 5-CQA z mediami hydrofobowymi zwiększa stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$. Zgodnie z założeniami przedstawionymi na początku tego rozdziału, hydrofobowe rozpuszczalniki oraz powierzchnia sorbentu C-18 wywołują silne zaburzenia struktury



Rys. 55. Stopień konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych pozostałości otrzymanych po odparowaniu wody z roztworu 5-CQA w wodzie lub wodzie nasyconej rozpuszczalnikiem organicznym.

roztworów wodnych, czego skutkiem jest zwiększenie liczby monomerów/dimerów wody lub ułatwienie wyrwania cząsteczek wody z jej klasterów lub ze ścian budujących „pieczary” dla czynnika hydrofobowego [230-232] przez 5-CQA.

15.5. Powstawanie hydratów 5-CQA w trakcie ekstrakcji - ekstrakcja produktów spożywczych zawierających 5-CQA

Wyniki przedstawione w poprzednich podrozdziałach udowadniają, że kontakt wodnych roztworów 5-CQA z rozpuszczalnikiem hydrofobowym (octanem etylu) podczas ekstrakcji ciecz-ciecz oraz sorbentem hydrofobowym (sorbent C-18) wykorzystywanym w metodach SPE, QuEChERS i MSPD ułatwia powstawanie hydratów 5-CQA. W tym miejscu należy zadać pytanie czy podobne efekty zachodzą w wyniku ekstrakcji produktów spożywczych zawierających 5-CQA? Analiza tak złożonych mieszanin zazwyczaj wymaga zastosowania metod przygotowania próbek, w których wykorzystuje się hydrofobowe rozpuszczalniki i sorbenty. Tymi technikami są najczęściej LLE i SPE. Tabela 9 przedstawia wartości stopnia transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ po procesie LLE i SPE wodnych ekstraktów różnych typów kawy oraz herbaty. Zostały one określone na podstawie widm ^1H suchych ekstraktów (rozpuszczonych w DMSO- d_6) otrzymanych po odparowaniu octanu etylu i acetonitrylu odpowiednio z ekstraktów LLE i eluatów SPE. W przypadku ekstrakcji do fazy stałej wybrano rozpuszczalnik, dla którego obserwuje się pośrednią wartość stopnia

Tabela 9 Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów LLE i SPE z różnych typów kawy oraz herbaty. Wg. [P4].

Produkt Spożywczy	Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ po odparowaniu rozpuszczalnika z ekstraktu [%]	
	LLE*	SPE**
Zielona Kawa	60.7±2.3	8.0±0.4
Kawa Prażona	32.0±1.2	0
Zielona Herbata	45.9±1.7	24.3±0.9
Czerwona Herbata	49.72±1.8	31.85±1.3
Czarna Herbata	46.5±1.8	26.8±1.1
Napój Lipton Ice Tea	0	30.3±1.2

*Octanu etylu w przypadku LLE

**Acetonitrylu w przypadku SPE

transformacji 5-CQA do jego hydratów. Jak wynika z rys. 52, pośredni stopień konwersji w technice SPE obserwuje się dla acetonitrylu i octanu etylu. Ponieważ badano próbki wodne dlatego do elucji 5-CQA zastosowano acetonitryl. Porównanie wartości zawartych w tabeli 9 oraz wyników przedstawionych na rys. 51 pokazuje, że stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów w suchych ekstraktach produktów spożywczych po LLE i SPE przyjmuje niższe wartości niż w przypadku suchych ekstraktów otrzymanych po zastosowaniu tych metod dla wodnych roztworów 5-CQA. Dane z tabeli 9 wskazują również, że stopień transformacji zależy od rodzaju matrycy. Należy podkreślić, że w przypadku większości badanych produktów spożywczych stopień transformacji jest wyższy od wartości obserwowanej w suchej pozostałości po odparowaniu wody z wodnych roztworów 5-CQA (t.j. większy od około 26 %). Powyższe wyniki nie tylko stanowią potwierdzenie wzrostu konwersji 5-CQA do jego hydratów, następującego w wyniku kontaktu jego wodnych roztworów i wodnych ekstraktów zawierających 5-CQA z mediami hydrofobowymi, ale sugerują również, że inne składniki badanych produktów mogą mieć wpływ na stopień transformacji. Potwierdzeniem tego są tabele 10 i 11, w których przedstawiono wartości stopnia transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ w suchych ekstraktach po odparowaniu:

- wody z wodnych roztworów 5-CQA zawierających przykładowe składniki matryc roślinnych lub związki modyfikujące pH (kolumna 2 tabeli 10), oraz
- octanu etylu, który był wykorzystany do ekstrakcji ciecz-ciecz wodnych roztworów 5-CQA zawierających przykładowe składniki matryc roślinnych lub związki modyfikujące pH (kolumna 3 tabeli 10 i tabela 11).

Analiza danych przedstawionych w tabelach 10 i 11 oraz ich porównanie z wynikami na rys. 51 i 52 pokazują, że poszczególne składniki matrycy w różnym stopniu wpływają na wzrost stopnia konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ jaki jest rezultatem kontaktu roztworu 5-CQA z czynnikami hydrofobowymi. To stwierdzenie jasno potwierdzają dane zaprezentowane na rys. 56. Pokazuje on stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów w suchych pozostałościach po odparowaniu octanu etylu z ekstraktów LLE otrzymanych z soku jabłkowego, wodnego ekstraktu korzenia arcydzięgla litworu (*Angelica Archangelica radix*) i wodnego ekstraktu ziela rozmarynu (*Salvia rosmarinus* Spenn.) wzbogaconych 5-CQA do takiego samego poziomu (1 mg/mL) przed ekstrakcją. Jak można zaobserwować, stopień konwersji znacząco zmienia się w przypadku poszczególnych matryc, których składniki w różnym stopniu wpływają na konwersję 5-CQA. Stopień transformacji 5-CQA do

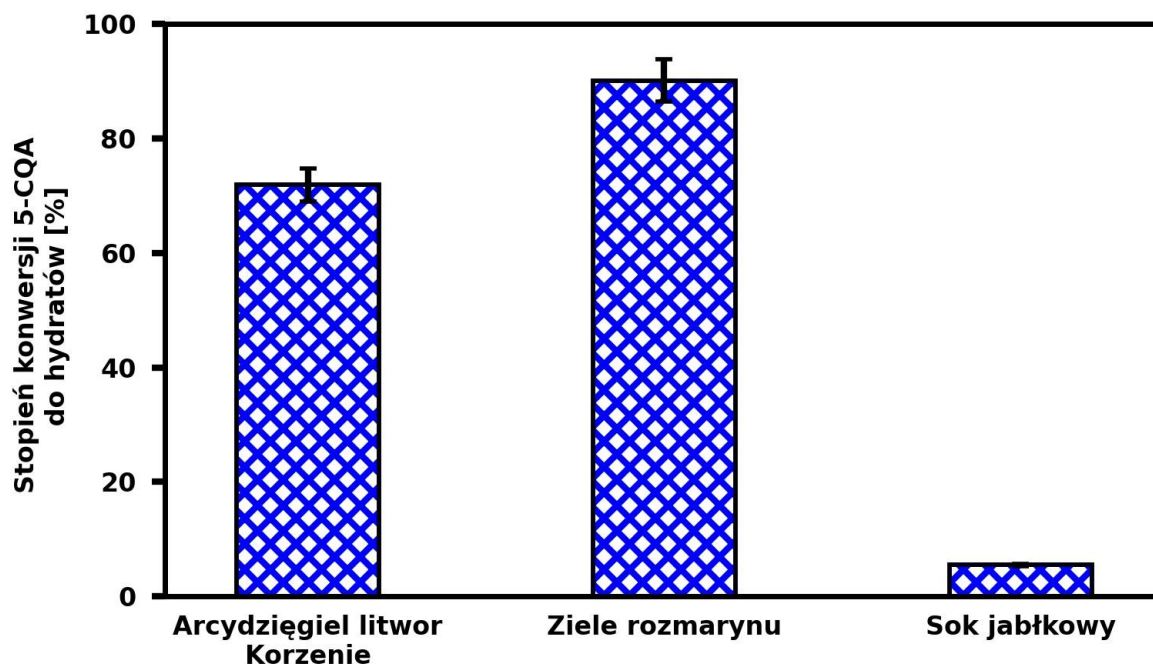
Tabela 10 Stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu wody z wodnych roztworów 5-CQA zawierających przykładowe składniki matryc roślinnych oraz octanu etylu z ekstraktów LLE wodnych roztworów 5-CQA zawierających te same przykładowe składniki matryc roślinnych. Wg. [P4].

Związek	Stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów [%] po odparowaniu	
	wody z	octanu etylu wykorzystanego w ekstrakcji LLE
	wodnego roztworu 5-CQA zawierającego dodatkowe związki	
Kwercetyna	20.1±0.8	72.0±2.9
Rutyna	13.1±0.5	69.3±2.9
Sacharoza	30.6±1.3	67.3±2.8
Kofeina	32.1±1.4	49.3±1.8

Tabela 11 Stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu octanu etylu z ekstraktów LLE wodnych roztworów 5-CQA z dodatkiem kwasów i zasad. Wg. [P4].

Związek	Stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów [%]
Kwas Cytrynowy	0
Kwas askorbinowy	65.4±2.8
Kwas solny	68.4±2.8
Kwas mrówkowy	79.1±3.1
Trietyloamina	0

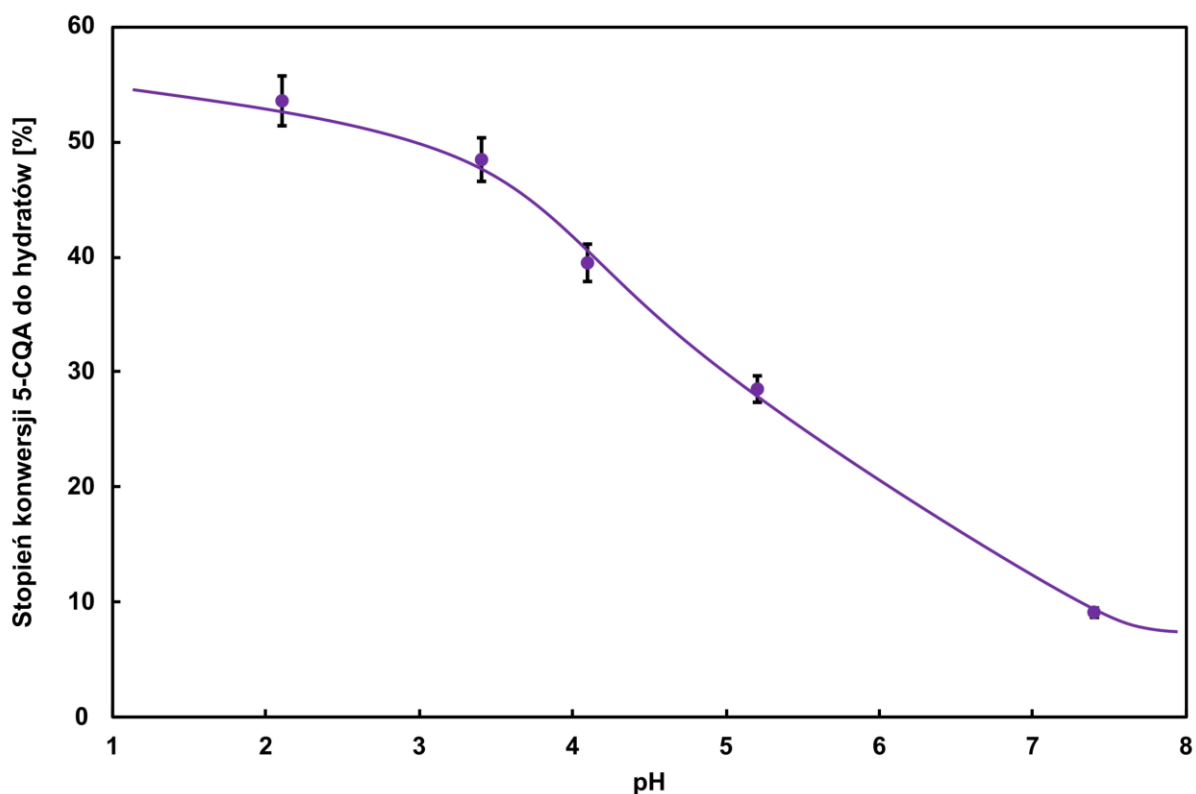
2x5-CQA*2xH₂O zależy także od pH roztworu, co pokazuje rys. 57 przedstawiający wpływ pH na zawartość hydratów 5-CQA w suchych ekstraktach otrzymanych po odparowaniu wodnych roztworów 5-CQA różniących się pH. Prezentowana zależność ma w przybliżeniu sigmoidalny kształt z punktem przegięcia w zakresie pH 4.0-5.0. Mając na uwadze, że pK_a 5-CQA wynosi około 4.1 (patrz podrozdział 14.2) taki przebieg zależności można powiązać z różnym stopniem dysocjacji (lub supresji dysocjacji) grup karboksylowych i fenolowych tego kwasu. Z omawianej zależności jasno wynika, że 5-CQA w postaci obojętnej łatwiej



Rys. 56. Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu octanu etylu z ekstraktów LLE soku jabłkowego, wodnego ekstraktu korzeni arcydziałki litworu (*Angelica Archangelica radix*) i wodnego ekstraktu ziela rozmarynu (*Salvia rosmarinus* Spenn.), które przed ekstrakcją wzbogacono w 5-CQA do poziomu 1 mg/mL. Wg. [P4].

tworzy hydraty niż w formie zdysocjowanej. Potwierdzeniem tego są dane zaprezentowane w tabeli 11 pokazującej stopień przekształcenia 5-CQA do jego hydratów w obecności kwasu askorbinowego, mrówkowego lub solnego oraz trietyloaminy.

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że zbadano również wpływ kwasu cytrynowego (będącego jednym z głównych kwasów karboksylowych występujących w świecie roślin) na stopień konwersji 5-CQA do jego hydratów. Okazało się jednak, że kwas ten prawdopodobnie tworzy z 5-CQA kompleksy. Widmo NMR uzyskane w tym przypadku jest niejednoznaczne dla ilościowej oceny hydratu 5-CQA. Ta kwestia będzie przedmiotem odrębnych badań nieujętych w niniejszej pracy.



Rys. 57. Stopień konwersji 5-CQA do $2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu wody z wodnych roztworów 5-CQA różniących się pH. Wg. [P4].

15.6. Wykorzystanie NMR do oceny rzeczywistej ilości 5-CQA w suchych ekstraktach LLE i SPE

Wprawdzie przedstawione w niniejszym rozdziale badania prowadzono z wykorzystaniem roztworów 5-CQA oraz wodnych ekstraktów produktów spożywczych i ziół, to należy jednak zauważyć, że ich wyniki mają także znaczenie w przypadku zastosowania technik NMR do oznaczania 5-CQA w materiałach stałych, np. roślinnych. Jak wiadomo, do wyodrębnienia 5-CQA z próbek roślinnych metodą ekstrakcji zaleca się stosować alkohole (MeOH lub EtOH) i ich wodne mieszaniny [63, 167]. Otrzymane przy ich użyciu ekstrakty oprócz 5-CQA zawierają również inne, zarówno hydrofilowe, jak i hydrofobowe, składniki matrycy roślinnych. Poza tym, sam 5-CQA podczas jego wyczerpującej ekstrakcji za pomocą alkoholi ulega licznym przemianom i degradacji. Tak więc, dokładne oznaczenie 5-CQA w alkoholowych ekstraktach roślin i stałych produktów spożywczych może być trudne, szczególnie w przypadku użycia techniki NMR. Dlatego 5-CQA z próbek roślinnych/spożywczych jest często ekstrahowany wodą, a następnie uzyskany ekstrakt wodny jest reekstrahowany rozpuszczalnikiem hydrofobowym (SLE

z procedurą LLE) lub za pomocą sorbentu C-18 (SLE z SPE). W ten sposób pierwszy ekstrakt zawiera zredukowaną ilość substancji hydrofobowych, a jego reekstrakcja pozwala na pozbycie się silnie hydrofilowych interferentów. W suchych pozostałościach tak otrzymanych ekstraktów zawierających 5-CQA należy się spodziewać obecności jego hydratów, których ilość zależy będzie od rodzaju medium hydrofobowego użytego w procedurze ekstrakcyjnej. Wobec powyższego powstaje pytanie, czy za pomocą metod NMR możliwe jest dokładne oznaczenie 5-CQA w suchych pozostałościach ekstraktów roślinnych/spożywczych jak i próbek modelowych? Z danych zawartych w tabeli 12 wynika, że podstawą wiarygodnej analizy ilościowej 5-CQA w tych ekstraktach nie może być wielkość sygnału NMR pochodząca od samego 5-CQA, ale suma sygnałów NMR odpowiadających zarówno 5-CQA, jak i jego hydratowi. Jak widać z tabeli 12, stężenia 5-CQA wyznaczone w badanych ekstraktach za pomocą LC-MS są równe sumie stężeń 5-CQA i jego hydratów wyznaczonych w tych próbkach za pomocą NMR ($F_{crit} > F_{exp}$).

Tabela 12 Stężenia 5-CQA i jego hydratów wyznaczone metodą NMR oraz stężenia 5-CQA wyznaczone metodą LC-MS w suchych ekstraktach. Wg [P4].

Próbka	Stężenie [mg/mL]				ANOVA wyniki*
	Dane NMR			Dane LC-MS	
	Hydraty 5-CQA	5-CQA	Hydraty 5- CQA oraz 5- CQA	5-CQA	
Wodny ekstrakt korzeni arcydzięgla litworu wzbogacony 5-CQA (ekstrakt LLE)	0.719±0.036	0.283±0.014	1.002±0.047	1.003±0.034	$F_{crit}>F_{exp}$ $p>0.05$
Wodny ekstrakt ziela rozmarynu wzbogacony 5-CQA (ekstrakt LLE)	0.901±0.043	0.098±0.043	0.999±0.045	1.000±0.030	$F_{crit}>F_{exp}$ $p>0.05$
Sok jabłkowy wzbogacony 5-CQA (ekstrakt LLE)	0.055±0.003	0.951±0.046	1.006±0.052	1.005±0.033	$F_{crit}>F_{exp}$ $p>0.05$
Wodny roztwór 5-CQA	0.261±0.014	0.742±0.037	1.003±0.049	1.001±0.031	$F_{crit}>F_{exp}$ $p>0.05$

* Suma stężeń 5-CQA i jego hydratów wyznaczonych na podstawie danych NMR była porównywana ze stężeniem 5-CQA z danych LC-MS.

16. Wzajemne relacje pomiędzy adduktami i hydratami 5-CQA

W rozdziałach 11 i 12 wykazano, że podczas symulowanej ekstrakcji wodnych roztworów 5-CQA powstają zarówno jego wodne addukty (5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2) jak i hydraty ($[2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}]$ -1 i $[2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}]$ -2). Choć każda z tych pochodnych 5-CQA jest przedmiotem odrębnych rozważań to dokładna analiza wyników przedstawionych w rozdziałach 11-14 może sugerować występowanie korelacji pomiędzy procesami ich powstawania.

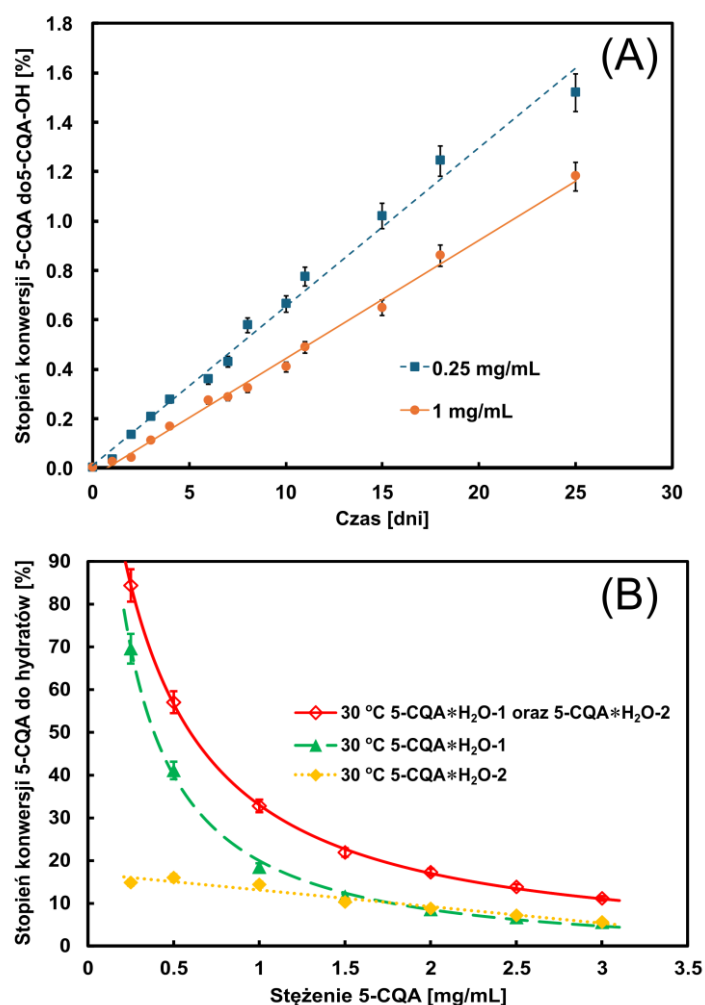
Przypuszczenie dotyczące powiązania procesów tworzenia adduktów oraz hydratów 5-CQA wydaje się uzasadnione, jeśli weźmie się pod uwagę następujące rozważania. Wyniki i obserwacje przedstawione w poprzednich rozdziałach pokazują, że cząsteczki wolnego 5-CQA i 5-CQA związanego w postaci hydratów różnią się niektórymi ze swoich właściwości. Na przykład, w wodnych roztworach 5-CQA poddanych wcześniej procesowi inkubacji (prowadzącej do utworzenia znacznych ilości hydratów) obserwuje się wyższą podatność hydrolityczną tego kwasu niż w przypadku roztworów nieinkubowanych. Jest to efektem powstawania wiązań wodorowych pomiędzy wodą i grupą estrową w hydratách 5-CQA, które prawdopodobnie prowadzi do zmiany jej charakteru. Należy pamiętać, że wymieniona grupa estrowa jest sprzężona z wiązaniem alkenowym, co może w pośredni sposób wpływać na reaktywność tego wiązania podwójnego, chociażby podczas addycji Michaela. Tak więc można postawić pytanie – czy zmiana stopnia konwersji 5-CQA do $[2 \times 5\text{-CQA} \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}]$ ma wpływ na wydajność powstawania wodnych adduktów 5-CQA?

Porównanie struktury hydratów 5-CQA (bądź też niezwiązanego 5-CQA) oraz struktury wodnych adduktów 5-CQA pokazuje, że w każdej z tych pochodnych obecny jest motyw strukturalny odpowiedzialny za wiązanie cząsteczek wody w hydratách, t.j. układ dwóch grup hydroksylowych znajdujących się w pobliżu grupy estrowej. Obecność takiego układu grup funkcyjnych w 5-CQA-OH sugeruje, że związek ten również może tworzyć hydraty w podobny sposób jak sam 5-CQA.

Niniejszy rozdział przedstawia i omawia wyniki badań przeprowadzonych w celu potwierdzenia przypuszczeń zawartych w dwóch ostatnich akapitach.

16.1. Wpływ obecności hydratów 5-CQA w wodnych roztworach tego kwasu na kinetykę tworzenia jego wodnych adduktów

Rys. 58A przedstawia kinetykę tworzenia wodnych adduktów 5-CQA w roztworach wodnych o zróżnicowanych stężeniach 5-CQA, t.j. 0.25 mg/mL oraz 1 mg/mL. Jak wykazano w rozdziałach 13 i 14, wraz ze spadkiem początkowego stężenia 5-CQA w roztworze wodnym wzrasta stopień przekształcenia tego kwasu do hydratów. W celu lepszego zobrazowania wymienionych zmian na rys. 58B powtórzono odpowiedni wykres z rozdziału 13.2. W przypadku wymienionych roztworów konwersja 5-CQA do hydratów po 24 godzinach inkubacji (po takim czasie osiągnięte jest plateau) wynosi około 85 % i 35 %



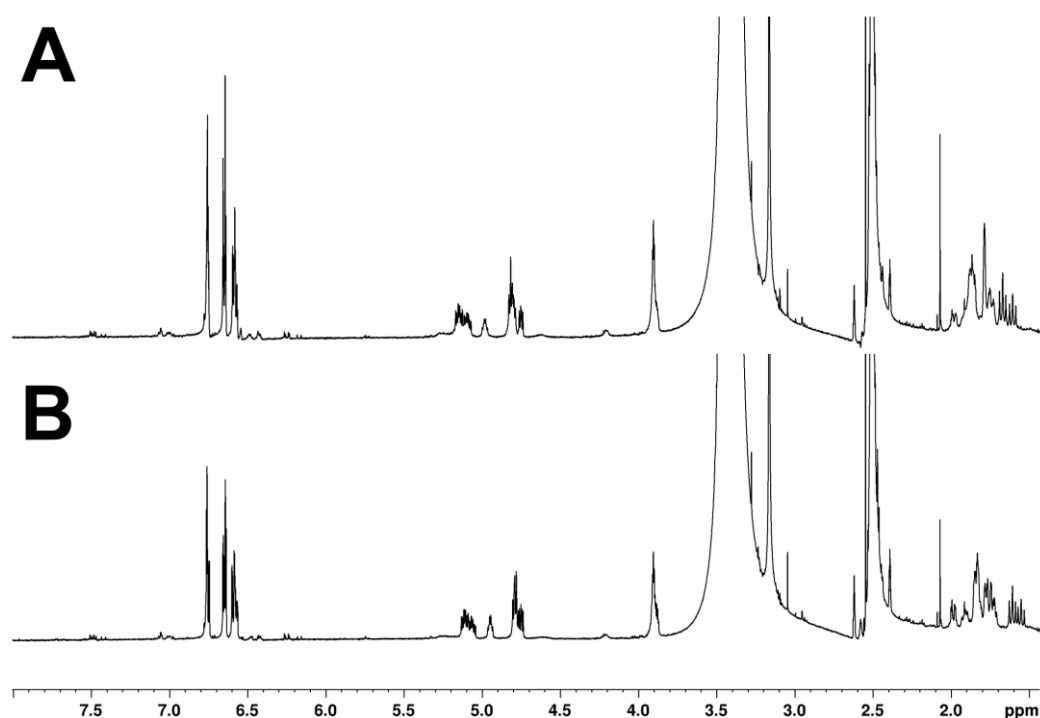
Rys. 58. (A) Wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA o jego różnych stężeniach na stopień transformacji 5-CQA do 5-CQA-OH.
(B) Wpływ stężenia 5-CQA w jego wodnym roztworze na stopień konwersji 5-CQA do [2x5-CQA*2xH₂O]-1 lub [2x5-CQA*2xH₂O]-2 lub ich sumy po inkubacji w temperaturze 30°C.
(Rys 58 B to powtórzenie Rys. 38 z rozdz. 14).

odpowiednio dla stężeń 0.25 i 1 mg/mL. Jak wynika z rys. 58A, w przypadku roztworu o mniejszym stężeniu 5-CQA obserwuje się większą szybkość powstawania wodnych adduktów 5-CQA. Tak więc, wiązania wodorowe powstające pomiędzy cząsteczkami wody i grupami estrowymi w hydratách 5-CQA prawdopodobnie wpływają także na grupy alkenowe sprzężone z wiązaniem C=O i tym samym wodne addukty prawdopodobnie łatwiej tworzą się z hydratów 5-CQA niż z samego 5-CQA.

16.2. Wodne kompleksy 5-CQA-OH

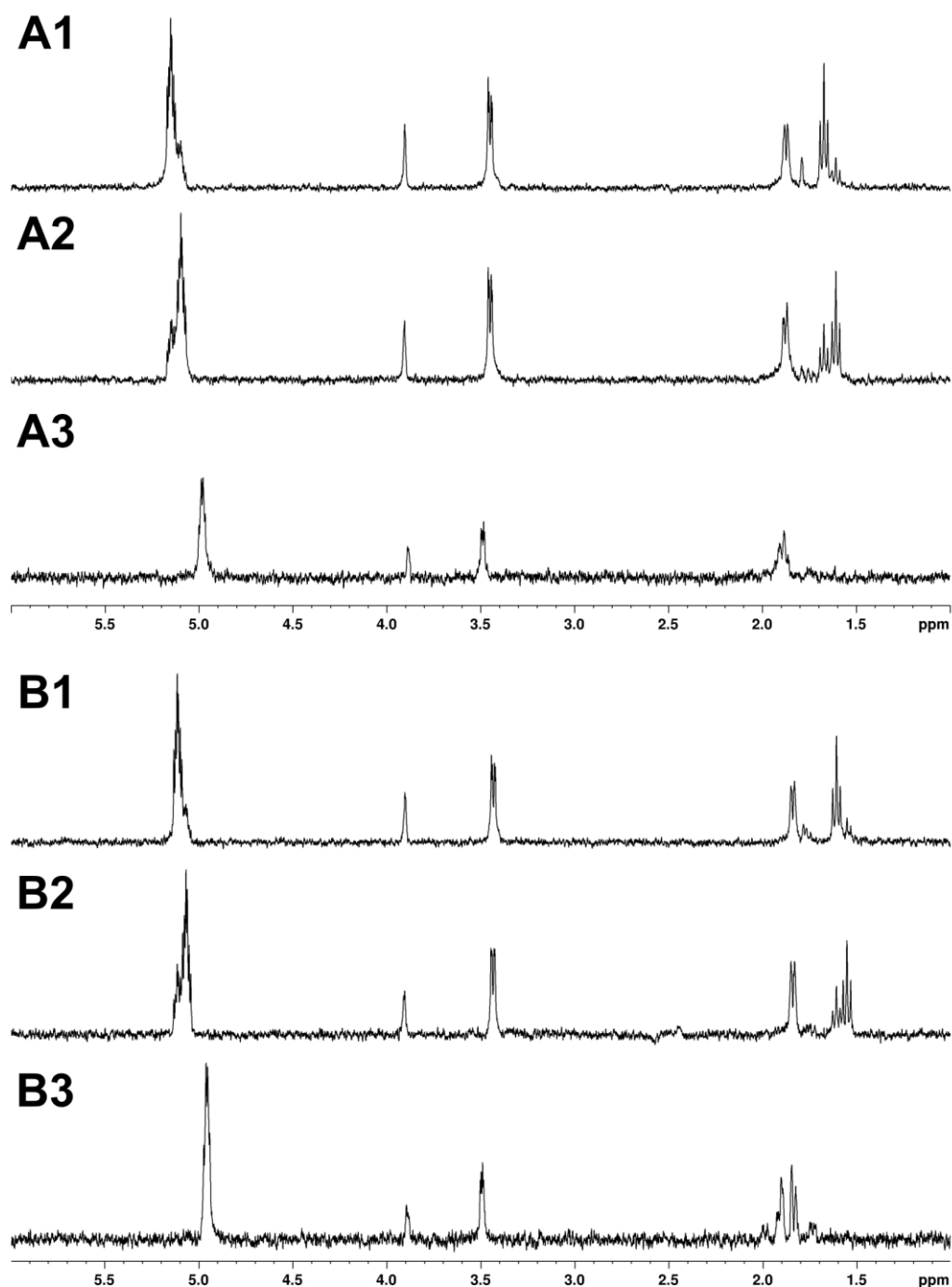
Jak zauważono we wstępie do powyższego rozdziału, w strukturze wodnych adduktów 5-CQA obecny jest motyw strukturalny odpowiedzialny za wiązanie cząsteczek wody w hydratách 5-CQA, tzn. układ dwóch grup hydroksylowych znajdujących się w pobliżu grupy estrowej. Sugeruje to, że wodne addukty 5-CQA również mogą tworzyć hydraty. Dlatego postanowiono przebadać suchą pozostałość wodnych frakcji adduktów 5-CQA zebranych za pomocą chromatografii preparatywnej wykorzystując spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego. Otrzymane suche ekstrakty zostały rozpuszczone w DMSO- d_6 z dodatkiem D_3PO_4 (0.5 mM), który został wprowadzony w celu poprawy rozpuszczalności 5-CQA-OH w DMSO- d_6 . Rys. 59A i 59B przedstawiają widma 1H otrzymane odpowiednio dla frakcji 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2.

W zakresie przesunięć chemicznych od 4.6 do 5.2 ppm (zakres charakterystyczny dla grup metinowych z atomem węgla przyłączonym do atomu tlenu - w przypadku 5-CQA-OH jest to grupa estrowa lub hydroksylowa przyłączona w skutek addycji Michaela) na każdym z widm widocznych jest 6 sygnałów. Dublety dubletów występujące w pozycjach 4.75 ppm (rys. 59A) i 4.74 ppm (rys. 59B) oraz częściowo nakładające się dwa układy dubletów dubletów w zakresach 4.78-4.83 ppm (rys. 59A) i 4.77-4.81 ppm (rys. 59B) mogą być przypisane do protonów grup metinowych z układu $-(OH)CH-CH_2-$ powstającego w wyniku addycji Michaela. Obecność trzech takich sygnałów na widmach suchych ekstraktów sugeruje, że każda z tych próbek zawiera po trzy hydroksylowe addukty. Potwierdzeniem tego jest ilość sygnałów jakie obserwuje się dla protonów metinowych oznaczanych jako protony H5 w strukturze kwasu chlorogenowego i jego adduktów. Tym samym na widmie 1H suchego ekstraktu 5-CQA-OH-1 widoczne są trzy układy sygnałów pochodzące od trzech odrębnych



Rys. 59. Widma ^1H ($\text{DMSO-d}_6 + 0.5 \text{ mM D}_3\text{PO}_4$, 600 MHz) suchych pozostałości z wyodrębnionych za pomocą chromatografii preparatywnej frakcji zawierających (A) 5-CQA-OH-1 oraz (B) 5-CQA-OH-2.

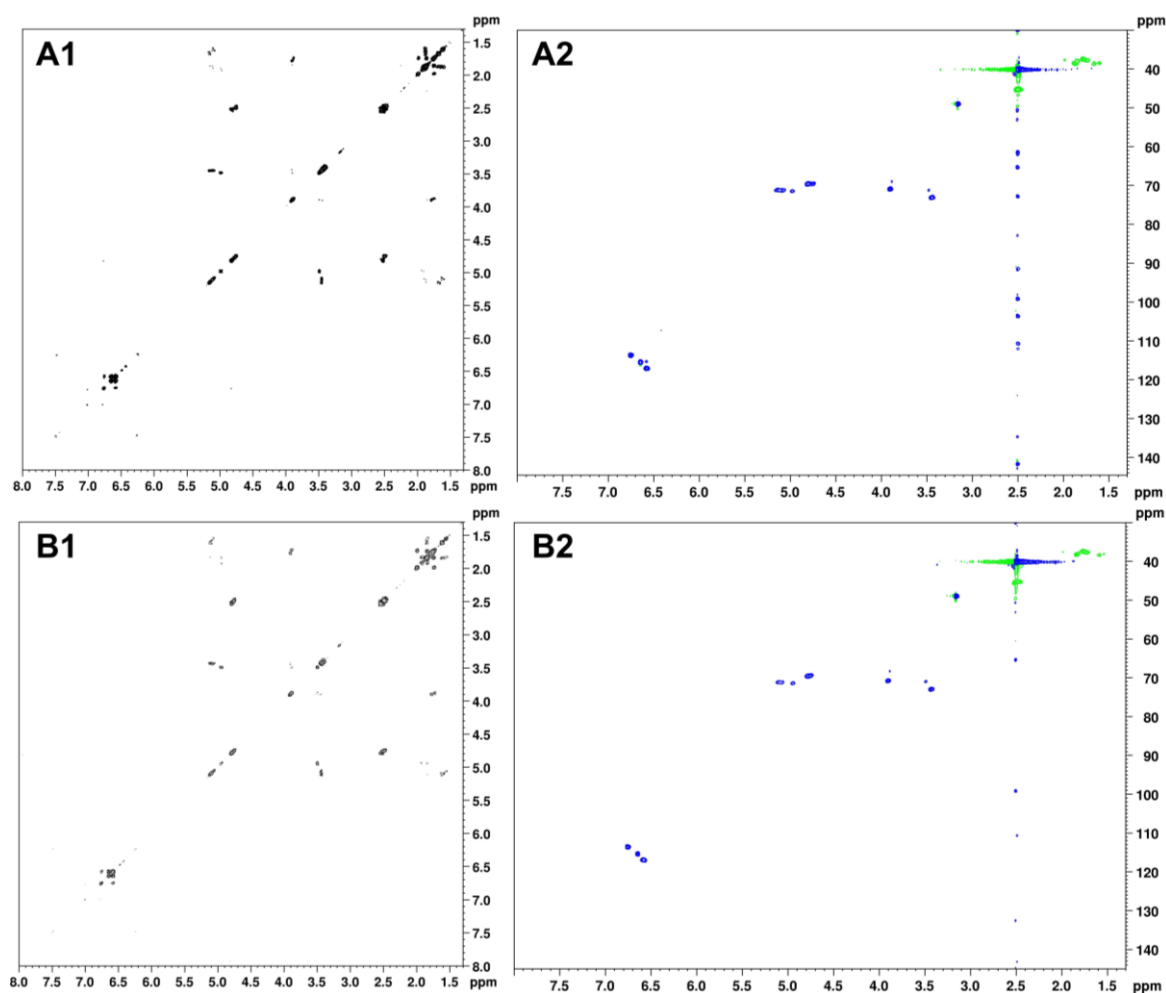
związków. To samo wynika z widma ^1H dla suchego ekstraktu 5-CQA-OH-2. Analiza widm 1D TOCSY, 2D (patrz rys. 60 i 61) oraz porównanie obserwowanych sygnałów z danymi NMR uzyskanymi dla wodnych adduktów 5-CQA w D_2O (patrz rozdział 11) i hydratów 5-CQA w DMSO-d_6 (patrz rozdział 12) pozwala na przypisanie sygnałów pochodzących od związków obecnych w suchych ekstraktach. Tabele 13 i 14 zawierają dane NMR dla badanych związków. Jak wynika z powyższych tabel, każda z tych substancji jest zbudowana z reszty kwasu 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-3-hydroksypropionowego (t.j. reszty kwasu kawowego zmodyfikowanej w wyniku przyłączenia cząsteczki wody na drodze addycji Michaela) oraz reszty kwasu chinowego połączonych ze sobą wiązaniem estrowym. Porównanie przesunięć chemicznych i wartości stałych sprzężeń sygnałów trzech związków widocznych na widmie suchego ekstraktu 5-CQA-OH-1 wskazuje, że są to odpowiednio wodny addukt 5-CQA-OH-1 oraz jego dwa hydraty. Do analogicznych wniosków można dojść w przypadku widma suchego ekstraktu 5-CQA-OH-2, t.j. w próbce obecne są niezwiązany wodny addukt 5-CQA-OH-2 oraz jego dwa hydraty. Za taką identyfikacją



Rys. 60. Widma 1D TOCSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) otrzymane dla suchej pozostałości frakcji 5-CQA-OH-1 w wyniku selektywnego echa spinowego protonów w pozycji 5.15 ppm (A1), 5.09 ppm (A2) i 4.98 ppm (A3) oraz widma 1D TOCSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) otrzymane dla suchej pozostałości frakcji 5-CQA-OH-2 w wyniku selektywnego echa spinowego protonów w pozycji 5.12 ppm (B1), 5.06 ppm (B2) i 4.95 ppm (B3).

przemawiają obserwowane różnice sygnałów mające analogiczny charakter jak w przypadku zmian obserwowanych dla hydratów 5-CQA (patrz rozdział 12.2 dotyczący struktury hydratów 5-CQA), t.j.:

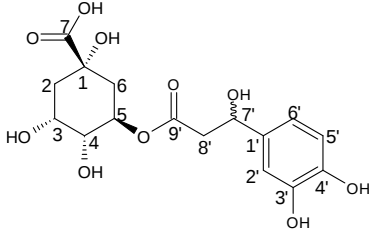
- protony H5 hydratów 5-CQA-OH mają wyższe wartości przesunięć chemicznych niż analogiczne jądra w niezwiązanych adduktach, co można wytłumaczyć odsłaniającym wpływem grup karbonylowych będących znacznie bliżej wymienionych protonów w hydratách;
- dla protonów H5 obserwuje się znacznie wyższe wartości stałych sprzężeń spinowo-spinowych ze względu na zmiany w konformacji reszt kwasu chinowego powstające na skutek związania cząsteczek wody.



Rys. 61. (A1) i (A2) - widma ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HSQC suchej pozostałości 5-CQA-OH-1 (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz);
(B1) i (B2) - widma ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HSQC suchej pozostałości 5-CQA-OH-2 (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz).

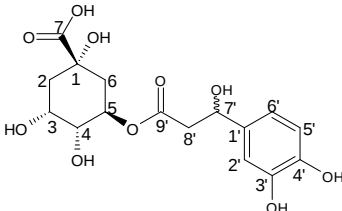
Sygnały dodatnie (kolor niebieski) widoczne na widmach HSQC pochodzą od grup CH oraz CH_3 , a sygnały ujemne (kolor zielony) pochodzą od grup CH_2 .

Tabela 13 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA-OH-1 oraz jego hydratów (DMSO-d₆ + 0.5 mM D₃PO₄, 600 MHz i 125 MHz).

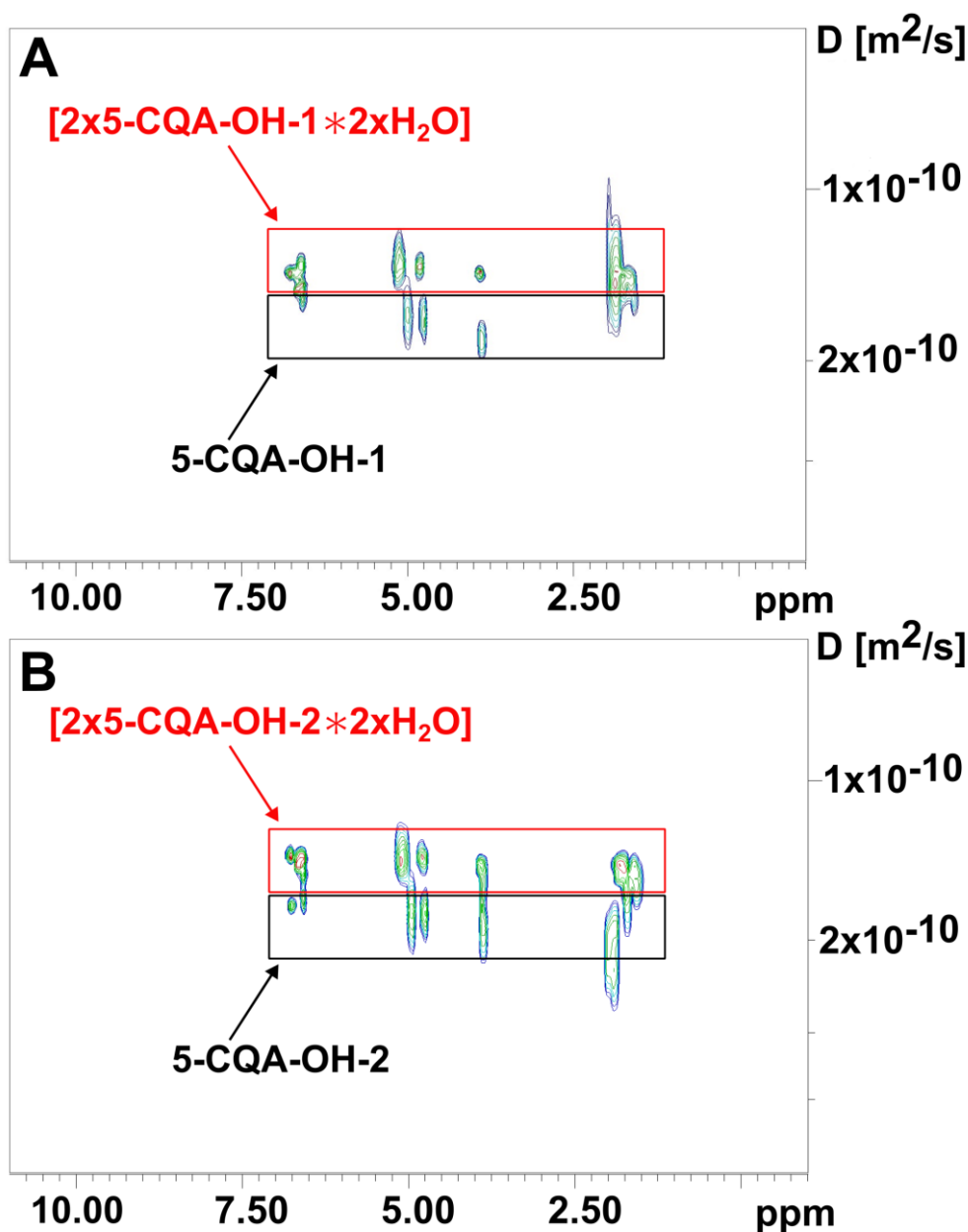
						
	5-CQA-OH-1		[2x5-CQA-OH-1*2xH ₂ O]-1		[2x5-CQA-OH-1*2xH ₂ O]-2	
	¹ H	¹³ C ^(a)	¹ H	¹³ C ^(a)	¹ H	¹³ C ^(a)
2 _{ax}	1.80-1.72 (m)	37.8	1.81-1.76 (m)	37.4	1.81-1.76 (m)	37.4
2 _{eq}	1.80-1.72 (m)		1.81-1.76 (m)		1.81-1.76 (m)	
3	3.88, (m)	69.0	3.90, (m)	70.9	3.90, (m)	70.9
4	3.49 (dd, <i>J</i> = 8.0, 3.3 Hz)	71.1	3.45 (dd, <i>J</i> = 9.9, 3.1 Hz)	73.1	3.45 (dd, <i>J</i> = 9.7, 3.1 Hz)	73.1
5	4.98 (td, <i>J</i> = 7.4, 4.5 Hz)	71.5	5.15 (ddd, <i>J</i> = 11.1, 9.9, 5.0 Hz)	71.1	5.09 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 9.8, 4.9 Hz)	71.2
6 _{ax}	1.94-1.85 (m)	38.5	1.67 (t, <i>J</i> = 11.9 Hz)	38.6	1.61 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz)	38.6
6 _{eq}	1.94-1.85 (m)		1.87 (dd, <i>J</i> = 12.1, 3.5 Hz)		1.88 (dd, <i>J</i> = 12.2, 3.1 Hz)	
2'	6.77-6.75 (m)	113.7	6.77-6.75 (m)	113.7	6.77-6.75 (m)	113.7
5'	6.64 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	115.5	6.65 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	115.5	6.64 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	115.5
6'	6.60-6.56 (m)	117.1	6.60-6.56 (m)	117.1	6.60-6.56 (m)	117.1
7'	4.75 (dd, <i>J</i> = 8.2, 5.5 Hz)	69.5	4.83-4.78 (m)	69.6	4.83-4.78 (m)	69.6
8'	2.51-2.46 (m)	45.2	2.53-2.50 (m)	45.2	2.53-2.50 (m)	45.2
	2.51-2.46 (m)		2.53-2.50 (m)		2.53-2.50 (m)	

^(a) Wartości przesunięć chemicznych jąder ¹³C wyznaczono na podstawie sygnałów z widm ¹H-¹³C HSQC.

Tabela 14 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA-OH-2 oraz jego hydratów (DMSO-d₆ + 0.5 mM D₃PO₄, 600 MHz i 125 MHz).

						
	5-CQA-OH-2		[2x5-CQA-OH-2*2xH ₂ O]-1		[2x5-CQA-OH-2*2xH ₂ O]-2	
	¹ H	¹³ C ^(a)	¹ H	¹³ C ^(a)	¹ H	¹³ C ^(a)
2 _{ax}	1.73.-1.70 (m)	37.4	1.78.-1.75 (m)	37.3	1.78.-1.75 (m)	37.3
2 _{eq}	1.73.-1.70 (m)		1.78.-1.75 (m)		1.78.-1.75 (m)	
3	3.89 (m)	68.3	3.90 (m)	70.0	3.91 (m)	70.1
4	3.49 (dd, <i>J</i> = 7.3, 3.0 Hz)	71.1	3.43 (dd, <i>J</i> = 9.5, 3.1 Hz)	73.0	3.44 (dd, <i>J</i> = 9.9, 2.8 Hz)	73.0
5	4.95 (td, <i>J</i> = 7.3, 4.5 Hz)	71.4	5.11 (ddd, <i>J</i> = 11.2, 9.8, 4.9 Hz)	71.1	5.07 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 9.8, 5.0 Hz)	71.2
6 _{ax}	1.84 (m)	36.8	1.61 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz)	38.3	1.55 (t, <i>J</i> = 11.9 Hz)	38.1
6 _{eq}	1.93(m)		1.84 (m)		1.84 (m)	
2'	6.77-6.75 (m)	113.6	6.77-6.75 (m)	113.6	6.77-6.75 (m)	113.6
5'	6.66-6.63 (m)	115.5	6.66-6.63 (m)	115.5	6.66-6.63 (m)	115.5
6'	6.60-6.56 (m)	117.1	6.60-6.56 (m)	117.1	6.60-6.56 (m)	117.1
7'	4.75 (dd, <i>J</i> = 8.3, 5.3 Hz)	69.4	4.81-4.77 (m)	69.6	4.81-4.77 (m)	69.4
8'	2.51-2.45 (m)	45.2	2.55-2.50 (m)	45.4	2.55-2.50 (m)	45.4
	2.51-2.45 (m)		2.55-2.50 (m)		2.55-2.50 (m)	

Ponadto, na widmach ^1H DOSY suchych ekstraktów 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2 rozpuszczonych w DMSO-d_6 (patrz rys. 62A i 62B) obserwuje się mniejsze wartości współczynników dyfuzji ich hydratów. Sugeruje to, że podobnie jak w przypadku kompleksów $[2\text{x}5\text{-CQA}\cdot 2\text{xH}_2\text{O}]$ hydraty 5-CQA-OH są zbudowane z dwóch podjednostek $5\text{-CQA-OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ połączonych za pomocą wiązań wodorowych powstających pomiędzy cząsteczkami wody, tzn. obserwowane sygnały pochodzą od $[2\text{x}5\text{-CQA-OH-1}\cdot 2\text{xH}_2\text{O}]$ -1,



Rys. 62. Widmo ^1H DOSY ($\text{DMSO-d}_6 + 0.5 \text{ mM D}_3\text{PO}_4$, 600 MHz) suchych pozostałości frakcji adduktów 5-CQA-OH-1 (A) oraz 5-CQA-OH-2 (B).

$[2x5\text{-CQA-OH-1}\cdot 2x\text{H}_2\text{O}]\text{-2}$, $[2x5\text{-CQA-OH-2}\cdot 2x\text{H}_2\text{O}]\text{-1}$ oraz $[2x5\text{-CQA-OH-2}\cdot 2x\text{H}_2\text{O}]\text{-2}$. Na podstawie zależności kalibracyjnej opracowanej dla polifenoli (patrz rozdział 13.7, rys. 43) wyznaczono masy molowe powyższych kompleksów oraz niezwiązanych adduktów. Otrzymane dane zamieszczono w tabeli 15. Masy molowe wyznaczone dla hydratów 5-CQA-OH są mniejsze od teoretycznych wartości, co mogłoby stanowić zaprzeczenie powyższych stwierdzeń na temat budowy hydratów. Należy jednak pamiętać, że współczynniki wyznaczone dla zależności kalibracyjnej w znacznym stopniu zależą od kształtu badanych cząsteczek. Do kalibracji wybrano związki zawierające w swojej strukturze fragment planarny (np. resztę kwasu kawowego lub aglikon flawonoidowy) i fragment cukrowy. Tak więc, cząsteczki substancji wykorzystanych podczas kalibracji miały kształt elipsoidalny podobnie jak 5-CQA. 5-CQA-OH i ich hydraty nie zawierają w swojej strukturze dużych fragmentów planarnych i tym samym ich konformacje prawdopodobnie są bardziej zbliżone do globularnego kształtu związanego z szybszą dyfuzją (patrz. rys. 18 w podrozdziale 11.1). Takie różnice w budowie 5-CQA-OH oraz 5-CQA mogą tłumaczyć występowanie rozbieżności mas molowych hydratów 5-CQA-OH.

Tabela 15 Wyniki pomiarów NMR DOSY oraz obliczone masy molowe dla 5-CQA-OH i kompleksów $[2x5\text{-CQA-OH}\cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$.

	5-CQA-OH-1	$[2x5\text{-CQA-OH-1}\cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ b	5-CQA-OH-2	$[2x5\text{-CQA-OH-2}\cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ b
Średnia wartość współczynników dyfuzji $[\text{m}^2/\text{s}]$ a	$1.70\cdot 10^{-10}$	$1.37\cdot 10^{-10}$	$1.76\cdot 10^{-10}$	$1.40\cdot 10^{-10}$
Logarytm znormalizowanego współczynnika dyfuzji	-9.7198386	-9.81357	-9.71133858	-9.810723215
Wyznaczona eksperymentalnie masa molowa $[\text{g/mol}]$	317.239028	552.9753	301.649087	543.7311046
Teoretyczna masa molowa $[\text{g/mol}]$	372.326	780.682	372.326	780.682

a Średnia została policzona na podstawie wartości odczytanych dla wszystkich sygnałów danego związku, dla których struktury multipletowe były wyraźnie rozdzielone.

b Do obliczeń masy molowej wykorzystano średnią współczynników dyfuzji obydwu hydratów 5-CQA-OH-1 lub 5-CQA-OH-2.

17. Wnioski

Jak wynika z Celu pracy badania dotyczyły identyfikacji wodnych pochodnych 5-CQA, t.j. tworów, których masa jest o ok. 18 Da większa od masy ich prekursora. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że są nimi produkty przyłączenia wody do cząsteczki 5-CQA na drodze addycji Michaela. Dogłębne badania suchych pozostałości wodnych roztworów 5-CQA wykazały, że 5-CQA poza tymi adduktami tworzy z wodą także hydraty, których ilość w suchej pozostałości jest znacznie większa niż ilość wodnych adduktów 5-CQA czy też innych produktów powstających w trakcie transformacji i hydrolizy tego kwasu w jego roztworach wodnych. Struktura i powstawanie tych hydratów nie zostały wcześniej opisane w literaturze.

Podsumowując badania dotyczące hydratów 5-CQA należy stwierdzić, że:

- powstają dwa trwałe kompleksy 5-CQA z wodą, które początkowo w badaniach określono jako 5-CQA*H₂O-1 oraz 5-CQA*H₂O-2. Kompleksy te generują odrębne sygnały na widmach NMR. W tych kompleksach woda tworzy trzy wiązania wodorowe z polarnymi grupami 5-CQA (t.j. z OH₃, OH₄ oraz grupą estrową). Analogiczne kompleksy z wodą tworzą także dwa inne kwasy monokawioilochinowe, 4-CQA i 3-CQA, które są izomerami 5-CQA;
- stopień konwersji 5-CQA do jego hydratów zależy od warunków inkubacji wodnego roztworu 5-CQA - rośnie ze wzrostem temperatury i czasu inkubacji roztworu. Zwiększa go także mechaniczna destabilizacja inkubowanego roztworu. Przeciwny trend (spadek stopnia konwersji) obserwuje się przy wzroście stężenia 5-CQA w jego roztworach wodnych. Badania kinetyki tworzenia kompleksów 5-CQA*H₂O wskazują, że hydraty 5-CQA prawdopodobnie powstają w wyniku aktywnych zderzeń odpowiednio zorientowanych molekuł 5-CQA z monomerami/dimerami wody, które są obecne w niewielkich ilościach w silnie zasocjowanej strukturze wody. Na szybkość tworzenia się hydratów 5-CQA ma wpływ stężenie monomerów/dimerów wody. To ostatnie w silnie zasocjowanym układzie jest niewielkie, choć zmienia się wraz z temperaturą oraz w trakcie mechanicznej destabilizacji układu;
- z widm ¹H DOSY wynika, iż współczynniki dyfuzji kompleksów 5-CQA*H₂O w DMSO są znacznie mniejsze niż dla samego 5-CQA. Masy molowe wyznaczone na podstawie pomiarów dyfuzyjnych wskazują, że kompleksy początkowo określane jako 5-CQA*H₂O-1 oraz 5-CQA*H₂O-2 są faktycznie kompleksami o wzorze

[2x5-CQA*2xH₂O] (odpowiednio [2x5-CQA*2xH₂O]-1 oraz [2x5-CQA*2xH₂O]-2). W każdym z tych kompleksów cząsteczka wody z ugrupowania 5-CQA*H₂O oprócz trzech wiązań wodorowych z grupami kwasu chlorogenowego tworzy czwarte wiązanie wodorowe z cząsteczką wody drugiego ugrupowania 5-CQA*H₂O. W ten sposób powstaje połączenie dwóch jednostek 5-CQA*H₂O;

- fizykochemiczne badania roztworów 5-CQA i modelowych napojów zawierających 5-CQA dostarczają pośrednich dowodów wskazujących, że hydraty 5-CQA powstają już w tych roztworach, a ich ilości zależą od czasu inkubacji roztworu;
- transformacji 5-CQA do jego hydratów sprzyja kontakt roztworów 5-CQA lub ekstraktów roślinnych bądź ciekłych produktów żywnościowych zawierających 5-CQA z hydrofobowymi mediami (np. hydrofobowymi ekstrahentami lub sorbentami), które są stosowane w trakcie przygotowania próbki do analizy. Efekt ten prawdopodobnie wynika z zaburzenia struktury wody na granicy faz medium hydrofobowe/roztwór wodny, w wyniku którego w układzie pojawia się zwiększona ilość monomerycznych/dimerycznych cząsteczek wody lub też cząsteczki wody mogą być łatwiej wychwytywane z zaburzonej struktury wody przez cząsteczki 5-CQA niż z typowej, niezaburzonej struktury wody. Na wzrost stopnia transformacji 5-CQA do jego hydratów, wynikający z kontaktu żywności z medium hydrofobowym, mają również wpływ składniki matrycy;
- podstawą wiarygodnej analizy ilościowej 5-CQA w suchych ekstraktach LLE i SPE z użyciem technik NMR nie powinna być wielkość sygnałów samego 5-CQA, ale suma sygnałów odpowiadających zarówno 5-CQA, jak i jego hydratowi.

Podsumowując badania dotyczące wodnych adduktów 5-CQA należy stwierdzić, że:

- podczas symulowanej ekstrakcji wodnych roztworów 5-CQA na drodze addycji Michaela powstają dwa diastereoizomery 5-CQA-OH. W badaniach określono je jako 5-CQA-OH-1 oraz 5-CQA-OH-2. Przyłączenie cząsteczki wody do grupy alkenowej 5-CQA zostało jednoznacznie potwierdzone za pomocą metod LC-MS, NMR i symulacji teoretycznych. Ilości tworzących się diastereoizomerów są niewielkie. Nieznaczne różnice przesunięć chemicznych i wartości stałych sprzężeń dla obydwu izomerów uniemożliwiły określenie konfiguracji centrum chiralnego powstającego w wyniku addycji wody do 5-CQA;

- wodne addukty 5-CQA charakteryzują się ograniczoną stabilnością w roztworach wodnych. W trakcie inkubacji tych roztworów każdy z diastereoizomerów 5-CQA-OH ulega konwersji do 5-CQA. Poza tym każdy z diastereoizomerów 5-CQA-OH w trakcie inkubacji izomeryzuje ze zmianą konfiguracji centrum chiralnego utworzonego w wyniku addycji H_2O do 5-CQA.

W toku większości badań przedstawionych w niniejszej rozprawie hydraty 5-CQA oraz jego wodne addukty były rozpatrywane osobno. Należy jednak zauważyć, że pomiędzy obydwoma wodnymi pochodnymi 5-CQA istnieją następujące powiązania:

- 5-CQA znajdujący się w postaci kompleksów $[2x5-CQA*2xH_2O]$ łatwiej ulega konwersji do 5-CQA-OH niż 5-CQA występujący w postaci nieskompleksowanej;
- fragment struktury 5-CQA zaangażowany w koordynację cząsteczki wody występuje również w wodnych adduktach 5-CQA, dzięki czemu te ostatnie tworzą analogiczne kompleksy z wodą. W tym wypadku powstają nie dwa, a cztery hydraty diastereoizomerów 5-CQA-OH, które oznaczono jako $[2x5-CQA-OH*2xH_2O]$, $[2x5-CQA-OH-1*2xH_2O]-1$, $[2x5-CQA-OH-1*2xH_2O]-2$, $[2x5-CQA-OH-2*2xH_2O]-1$ oraz $[2x5-CQA-OH-2*2xH_2O]-2$.

LITERATURA

1. B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Druga edycja, American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2015.
2. B.M. Twaij, M.N. Hasan, Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int. J. Plant Biol.* 13 (2022) 4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>.
3. A.N. Hayes, S.G. Gilbert, Historical milestones and discoveries that shaped the toxicology sciences. Rozdział w: A. Luch, (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum*, 99 (2009) 1–35 Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8336-7_1.
4. A. Dahan, L. Aarts, T.W. Smith, Incidence, Reversal, and Prevention of Opioid-induced Respiratory Depression. *Anesthesiology* 112 (2010) 226–238. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181c38c25>.
5. R.A. Halberstein, Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Ann. Epidemiol.* 15 (2005) 686–699. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.004>.
6. K.G. Ramawat, S. Dass, M. Mathur, The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. Rozdział w: K.G. Ramawat, (eds) *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*. Springer, Berlin, Germany, (2009) 7–32. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4_2.
7. M. Alongi, M. Anese, Re-Thinking Functional Food Development through a Holistic Approach. *J. Funct. Foods* 81 (2021) 104466. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104466>.
8. M. Yusuf, M. Shabbir, F. Mohammad, Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Nat. Prod. Bioprospect.* 7(1) (2017) 123–145. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>.
9. G. Budryn, E. Nebesny, B. Pałecz, D. Rachwał-Rosiak, P. Hodurek, K. Miśkiewicz, J. Oracz, D. Żyżelewicz, Inclusion complexes of β -cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.). *Food Res. Int.* 61 (2014) 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.013>.
10. L. Wang, X. Pan, L. Jiang, Y. Chu, S. Gao, X. Jiang, Y. Zhang, Y. Chen, S. Luo, C. Peng, The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. *Front. Nutr.* 9 (2022) 943911. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.943911>.

11. J. Santana-Galvez, L. Cisneros-Zevallos, D.A. Jacobo-Velazquez, Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules* 22(3) (2017) 358. <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>.
12. S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>.
13. E. Haslam, Vegetable tannins — Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68 (2007) 2713–2721. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.009>.
14. J. Bié, B. Sepodes, P.C. Fernandes, M.H. Ribeiro, Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. *Compounds* 3 (2023) 40–72. <https://doi.org/10.3390/compounds3010005>.
15. R. Tsao, Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2 (2010) 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.
16. A.N. Panche, A.D. Diwan, S.R. Chandra, Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* 5 (2016) 47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
17. S. Kumar, A.K. Pandey, Chemistry and biological activities of flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013 (2013) 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
18. Z. Rozmer, P. Perjési, Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem. Rev.* 15 (2014) 87–120. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8>.
19. L.C. Lin, Y.F. Pai, T.H. Tsai, Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 7700–7706. <https://doi.org/10.1021/jf505848z>.
20. E. Joubert, M. Viljoen, D. De Beer, M. Manley, Effect of heat on aspalathin, iso-orientin, and orientin contents and color of fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) iced tea. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4204–4211. <https://doi.org/10.1021/jf9005033>.
21. H.B. Niemeyer, D.M. Honig, S.E. Kulling, M. Metzler, Studies on the metabolism of the plant lignans secoisolariciresinol and matairesinol. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6317–6325. <https://doi.org/10.1021/jf030263n>.
22. Y.L. Ngo, C.H. Lau, L.S. Chua, Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem. Toxicol.* 121 (2018) 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>.
23. A. Watson, C. Wallis, A.H. Franz, NMR solution structures and MD-simulation of procyanidin B1, B2, and C1. *ARKIVOC* 2018(3) (2018) 279–301. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p010.340>.

24. T. Vogt, Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3 (2010) 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>.
25. J. Barros, R.A. Dixon, Plant Phenylalanine/Tyrosine Ammonia-lyases. *Trends Plant Sci.* 25 (2020) 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>.
26. S.-Y. Jun, S.A. Sattler, G.S. Cortez, W. Vermerris, S.E. Sattler, C. Kang, Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiol.* 176 (2018) 1452–1468. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01608>.
27. L. Perez de Souza, K. Garbowicz, Y. Brotman, T. Tohge, A.R. Fernie, The acetate pathway supports flavonoid and lipid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 182 (2020) 857–869. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00683>.
28. R. Marchiosi, W.D. dos Santos, R.P. Constantin, R.B. de Lima, A.R. Soares, A. Finger-Teixeira, T.R. Mota, D.M. de Oliveira, M.d.P. Foletto-Felipe, J. Abrahão, O. Ferrarese-Filho, Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochem. Rev.* 19 (2020) 865–906. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>.
29. U. Guzik, D. Wojcieszynska, P. Jaroszek, Biosynteza kwasu galusowego i jego zastosowanie. *Biotechnologia* 1 (2010) 119–131.
30. T. Bontpart, T. Marlin, S. Vialet, J.L. Guiraud, L. Pinasseau, E. Meudec, N. Sommerer, V. Cheynier, N. Terrier, Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *J. Exp. Bot.* 67 (2016) 3537–3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw184>.
31. R.M. Muir, A.M. Ibáñez, S.L. Uratsu, E.S. Ingham, C.A. Leslie, G.H. McGranahan, N. Batra, S. Goyal, J. Joseph, E.D. Jemmis, A.M. Dandekar, Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol. Biol.* 75 (2011) 555–565. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9739-3>.
32. J.R. Widhalm, N. Dudareva, A Familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic acids. *Mol. Plant* 8 (2015) 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.001>.
33. C.R. Martinez, B.L. Iverson, Rethinking the term “pi-stacking”. *Chem. Sci.* 3 (2012) 2191–2201. <https://doi.org/10.1039/C2SC20045G>.
34. N. D’Amelio, L. Fontanive, F. Uggeri, F. Suggi-Liverani, L. Navarini, NMR reinvestigation of the caffeine–chlorogenate complex in aqueous solution and in coffee brews. *Food Biophys.* 4 (2009) 321–330. <https://doi.org/10.1007/s11483-009-9130-y>.
35. A. Rescifina, U. Chiacchio, D. Iannazzo, A. Piperno, G. Romeo, β -cyclodextrin and caffeine complexes with natural polyphenols from olive and olive oils: NMR,

- thermodynamic, and molecular modeling studies. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11876–11882. <https://doi.org/10.1021/jf1028366>.
36. L.A. Chatham, J.E. Howard, J.A. Juvik, A natural colorant system from corn: Flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life. *Food Chem.* 310 (2020) 125734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125734>.
 37. L. Buryanovskyy, Y. Fu, M. Boyd, Y. Ma, T. Hsieh, J.M.; Wu, Z. Zhang, Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry* 43 (2004) 11417–11426. <https://doi.org/10.1021/bi049162o>.
 38. Y. Alguel, C. Meng, W. Terán, T. Krell, J.L. Ramos, M.T. Gallegos, X. Zhang, Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J. Mol. Biol.* 369 (2007) 829–840. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.062>.
 39. T. Yokoyama, Y. Kosaka, M. Mizuguchi, Structural Insight into the Interactions between Death-Associated Protein Kinase 1 and Natural Flavonoids. *J. Med. Chem.* 58 (2015) 7400–7408. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00893>.
 40. S.N. Save, S. Choudhary, Elucidation of energetics and mode of recognition of green tea polyphenols by human serum albumin. *J. Mol. Liq.* 265 (2018) 807–817. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.017>.
 41. D.M. Poloni, O. Dangles, J.A. Vinson, Binding of Plant Polyphenols to Serum Albumin and LDL: Healthy Implications for Heart Disease. *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 9139–9147. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06674>.
 42. Q. Guo, X. Xiao, L. Lu, L. Ai, M. Xu, Y. Liu, H.D. Goff, Polyphenol-Polysaccharide Complex: Preparation, Characterization, and Potential Utilization in Food and Health. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 13 (2022) 59–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-052720-010354>.
 43. V. Sindhi, V. Gupta, K. Sharma, S. Bhatnagar, R. Kumari, N. Dhaka, Potential applications of antioxidants – A review. *J. Pharm. Res.* 7 (2013) 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>.
 44. G. Martemucci, C. Costagliola, M. Mariano, L. D’andrea, P. Napolitano, A.G. D’Alessandro, Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* 2 (2022) 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>.
 45. V.J. Thannickal, B.L. Fanburg, Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 (2000) 1005–1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>.

46. T. Finkel, Signal transduction by mitochondrial oxidants. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 4434–4440. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.271999>.
47. A. Ionescu-Tucker, C.W. Cotman, Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 107 (2021) 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>.
48. M. Batty, M.R. Bennett, E. Yu, The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells* 11 (2022) 3843. <https://doi.org/10.3390/cells11233843>.
49. Y.A. Hajam, R. Rani, S.Y. Ganie, T.A. Sheikh, D. Javaid, S.S. Qadri, S. Pramodh, A. Alsulimani, M.F. Alkhanani, S. Harakeh, A. Hussainet, S. Haque, M.S. Reshi, Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives. *Cells* 11 (2022) 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>.
50. T. Waraho, D.-J. McClements, E.-A. Decker, Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends Food Sci. Technol.* 22 (2011) 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>.
51. A. Barzegar, The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. *Food Chem.* 135 (2012) 1369–1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.070>.
52. M. Biela, J. Rimarcik, E. Senajova, A. Kleinova, E. Klein, Antioxidant action of deprotonated flavonoids: Thermodynamics of sequential proton-loss electron-transfer. *Phytochemistry* 180 (2020) 112528. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112528>.
53. R. Rohman, R. Nath, R. Kar, Revisiting the hydrogen atom transfer reactions through a simple and accurate theoretical model: Role of hydrogen bond energy in polyphenolic antioxidants. *Comput. Theor. Chem.* 1223 (2023) 114097. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2023.114097>.
54. S. Markovic, J.M. Dimitric, M. Mojovic, D. Milenkovic, J. Tošovic, Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid. *Food Chem.* 237 (2017) 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.080>.
55. J. Tošović, S. Marković, Antioxidative Activity of Chlorogenic Acid Relative to Trolox in Aqueous Solution—DFT Study. *Food Chem.* 278 (2019) 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.070>.
56. E.H. Anouar, J. Gierschner, J.-L. Duroux, P. Trouillas, UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chem.* 131 (2012) 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.034>.

57. Z. Diaconeasa, Time-Dependent Degradation of Polyphenols from Thermally-Processed Berries and Their In Vitro Antiproliferative Effects against Melanoma. *Molecules* 23 (10) (2018) 2534. <https://doi.org/10.3390/molecules23102534>.
58. R. Lucas-González, J.A. Pérez-Álvarez, M. Viuda-Martos, J. Fernández-López, Pork liver pâté enriched with persimmon coproducts: Effect of in vitro gastrointestinal digestion on its fatty acid and polyphenol profile stability. *Nutrients* 13 (2021) 1332. <https://doi.org/10.3390/nu13041332>.
59. S. Saha, J. Singh, A. Paul, R. Sarkar, Z. Khan, K. Banerjee, Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.* 103 (2020) 23–39. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0201>.
60. W. Dong, X. Yang, N. Zhang, P. Chen, J. Sun, J.M. Harnly, M. Zhang, Study of UV–Vis molar absorptivity variation and quantitation of anthocyanins using molar relative response factor. *Food Chem.* 444 (2024) 138653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138653>.
61. L. Abrankó, M.N. Clifford, An unambiguous nomenclature for the acyl-quinic acids commonly known as chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 3602–3608. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00729>.
62. M.N. Clifford, I.B. Jaganath, I.A. Ludwig, A. Crozier, Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat. Prod. Rep.* 34 (2017) 1391–1421. <https://doi.org/10.1039/C7NP00030H>.
63. D. Wianowska, M. Gil, Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochem. Rev.* 18 (2019) 273–302. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9592-y>.
64. IUPAC Nomenclature of cyclitols. *Biochem. J.* 153 (1976) 23–31. <https://doi.org/10.1042/bj1530023>.
65. A. Farah, C.M. Donangelo, Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1) (2006) 23–26. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>.
66. J.K. Moon, H.S. Yoo, T. Shibamoto, Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5365–5369. <https://doi.org/10.1021/jf900012b>.
67. S. Badmos, S.H. Lee, N. Kuhnert, Comparison and quantification of chlorogenic acids for differentiation of green Robusta and Arabica coffee beans. *Food Res. Int.* 126 (2019) 108544. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108544>.

68. V. Pimpley, S. Patil, K. Srinivasan, N. Desai, P.S. Murthy, The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 50 (2020) 969–978. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1786699>.
69. K. Wale, K. Tolessa, M. Atlabachew, B. Mehari, M. Alemayehu, D.A. Mengistu, B. Kerisew, Level of caffeine, trigonelline and chlorogenic acids in green coffee (*Coffea arabica* L.) beans from Amhara region, Ethiopia. *J. Agric. Food Res.* 16 (2024) 101082. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108544>.
70. L. Blinová, M. Sirotiak, A. Bartošová, M. Soldán, Utilization of waste from coffee production. *Res. Pap. Fac. Mater. Sci. Technol. Trnava* 25 (2017) 91–101. <https://doi.org/10.1515/rput-2017-0011>.
71. É.M. Dos Santos, L.M. de Macedo, L.L. Tundisi, J.A. Ataíde, G.A. Camargo, R.C. Alves, M.B. Oliveira, P.G. Mazzola, Coffee by-products in topical formulations: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 111 (2021) 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.064>.
72. D. Perrone, R. Donangelo, C.M. Donangelo, A. Farah, Modeling Weight Loss and Chlorogenic Acids Content in Coffee during Roasting. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12238–12243. <https://doi.org/10.1021/jf102110u>.
73. G. Budryn, E. Nebesny, A. Podsędek, D. Zyzelewicz, M. Materska, S. Jankowski, B. Janda, Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* 228 (2009) 913–922. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-1004-x>.
74. C.E. Mills, M.J. Oruna-Concha, D.S. Mottram, G.R. Gibson, J.P.E. Spencer, The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chem.* 141 (2013) 3335–3340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.014>.
75. J.S. Jeon, H.T. Kim, I.H. Jeong, S.R. Hong, M.S. Oh, K.H. Park, J.H. Shim, A.M. Abd El-Aty, Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *J. Chromatogr. B* 1064 (2017) 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.041>.
76. Y.B. Wang, X.Y. Wang, G.L. Hu, D.F. Hong, X.H. Bai, T.Y. Guo, H. Zhou, J.H. Li, M.H. Qiu, Chemical ingredients characterization basing on ¹H NMR and SHS-GC/MS in twelve cultivars of *Coffea arabica* roasted beans. *Food Res. Int.* 147 (2021) 110544. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110544>.

77. V. Lattanzio, A. Cardinali, D. di Venere, V. Linsalata, S. Palmieri, Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads: Enzymic or chemical reactions? Food Chem. 50 (1994) 1–7. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90083-3).
78. K. Schütz, D. Kammerer, R. Carle, A. Schieber, Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 4090–4096. <https://doi.org/10.1021/jf049625x>.
79. V. Lattanzio, P.A. Kroon, V. Linsalata, A. Cardinali, Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. J. Funct. Food 1 (2009) 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.002>.
80. M.N. Clifford Review: chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric. 79 (1999) 362–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D).
81. R. Upadhyay, L.J.M. Rao, An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. Crit Rev Food Sci. Nutr. 53 (2013) 968–984. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.576319>.
82. C.I. Heck, E.G. de Mejia, Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. J. Food Sci. 72 (2007) 138–151. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>.
83. K.P. Burris, F.M. Harte, P.M. Davidson, C.N. Stewart, S. Zivanovic, Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. Chilean J. Agric. Res. 72 (2012) 268–274. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000200016>.
84. A.P. Butiuk, M.A. Martos, O. Adachi, R.A. Hours, Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants 3 (2016) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.003>.
85. T.F.F. Da Silveira, A.D. Meinhart, T.C.L. De Souza, E.C.E. Cunha, M.R. De Moraes, J.T. Filho, H.T. Godoy, Optimization of the Preparation Conditions of Yerba Mate Tea Beverage to Maximize Chlorogenic Acids Extraction. Plant Foods Hum. Nutr. 72 (2017) 219–223. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0613-6>.
86. V. Marques, A. Farah, Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. Food Chem. 113 (2009) 1370–1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.086>.

87. A.D. Meinhart, L. Caldeirão, F.M. Damin, J. Teixeira Filho, H.T. Godoy, Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *J. Food Comp. Anal.* 73 (2018) 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.001>.
88. E. Rzas-Duran, A. Kryczyk-Poprawa, D. Drabicki, A. Podkowa, K. Sułkowska-Ziaja, A. Szewczyk, K. Kała, W. Opoka, P. Zięba, M. Fidurski, B. Muszyńska, Yerba Mate as a Source of Elements and Bioactive Compounds with Antioxidant Activity. *Antioxidants* 11 (2022) 371. <https://doi.org/10.3390/antiox11020371>.
89. A. Podsędek, J. Wilska-Jeszka, B. Anders, J. Markowski, Compositional characterisation of some apple varieties. *Eur. Food Res. Technol.* 210 (2000) 268–272. <https://doi.org/10.1007/s002179900101>.
90. R.M. Alonso-Salces, A. Barranco, B. Abad, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2938–2952. <https://doi.org/10.1021/jf035416l>.
91. A. Parzych, Akumulacja i rozmieszczenie składników odżywczych w pędach *Vaccinium vitis-idaea* L. i *Vaccinium myrtillus* L. *Sylwan* 160 (2016) 40–48.
92. A. Rodriguez-Mateos, T. Cifuentes-Gomez, S. Tabatabaee, C. Lecras, J.P.E. Spencer, Procyanidin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 5772–5778. <https://doi.org/10.1021/jf203812w>.
93. G. Skrede, R.E. Wrolstad, R.W. Durst, Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Food Sci.* 65 (2000) 357–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007.x>.
94. M.J. Cho, L.R. Howard, R.L. Prior, J.R. Clark, Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry, and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 1771–1782. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1885>.
95. T.G. Taruscio, D.L. Barney, J. Exon, Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3169–3176. <https://doi.org/10.1021/jf0307595>.
96. V. Gavrilova, M. Kajdzanoska, V. Gjamovski, M. Stefova, Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by

- HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 4009–4018. <https://doi.org/10.1021/jf104565y>.
97. L. Gao, G. Mazza, Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. J. Food Sci. 59 (1994) 1057–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08189.x>.
 98. D. Walkowiak-Tomczak, Characteristics of plums as a raw material with valuable nutritive and dietary properties—A review. Pol. J. Food Nutr. Sci. 58(4) (2008) 401–405.
 99. E. Rytel, A. Tajner-Czopek, A. Kita, M. Aniołowska, A.Z. Kucharska, A. Sokół-Łętowska, K. Hamouz, Content of polyphenols in coloured and yellow fleshed potatoes during dices processing. Food Chem. 161 (2014) 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.002>.
 100. M. Orsák, K. Hamouz, J. Lachman, P. Kasal, Chlorogenic acid content in potato tubers with colored flesh as affected by a genotype, location and long-term storage. Plant Soil Environ. 65 (2019) 355–360. <https://doi.org/10.17221/195/2019-PSE>.
 101. B. Klejdus, J. Kopecký, L. Benešová, J. Vacek, Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. J. Chromatogr. A 1216 (2009) 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.096>.
 102. I. Jerez-Martel, S. García-Poza, G. Rodríguez-Martel, M. Rico, C. Afonso-Olivares, J. Gómez-Pinchetti, Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains. J. Food Qual. 2017 (2017) 2924508. <https://doi.org/10.1155/2017/2924508>.
 103. A.-M. Boudet, Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry 68 (2007) 2722–2735. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012>.
 104. C. Clé, L.M. Hill, R. Niggeweg, C.R. Martin, Y. Guisez, E. Prinsel, M.A.K. Jansel, Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. Phytochemistry 69 (2008) 2149–2156. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.024>.
 105. C. Ancillotti, P. Bogani, S. Biricolti, E. Calistri, L. Checchini, L. Ciofi, C. Gonnelli, M. Del Bubba, Changes in polyphenol and sugar concentrations in wild type and genetically modified *Nicotiana langsdorffii* Weinmann in response to water and heat stress. Plant Physiol. Biochem. 97 (2015) 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.09.012>.
 106. P. Zhou, Q. Li, G. Liu, N. Xu, Y. Yang, W. Zeng, A. Chen, S. Wang, Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data reveals critical metabolic pathways involved in

- polyphenol biosynthesis in *Nicotiana tabacum* under chilling stress. *Funct. Plant Biol.* 46 (2018) 30–43. <https://doi.org/10.1071/FP18099>.
107. A. Sharma, B. Shahzad, A. Rehman, R. Bhardwaj, M. Landi, B. Zheng, Response of Phenylpropanoid pathway and the role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* 24 (2019) 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>.
 108. Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, , M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara, K. Iseki, In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 136–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>.
 109. N. Liang, D.D. Kitts, Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients* 8 (2016) 16. <https://doi.org/10.3390/nu8010016>.
 110. S. Feng, Y. Zhang, S. Fu, Z. Li, J. Zhang, Y. Xu, X. Han, J. Miao, Application of Chlorogenic acid as a substitute for antibiotics in Multidrug-resistant *Escherichia coli*-induced mastitis. *Int. Immunopharmacol.* 114 (2023) 109536. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109536>.
 111. H. Lu, Z. Tian, Y. Cui, Z. Liu, X. Ma, Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19 (2020) 3130–3158. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12620>.
 112. V. Nguyen, E.G. Taine, D. Meng, T. Cui, W. Tan, Chlorogenic Acid: A Systematic Review on the Biological Functions, Mechanistic Actions, and Therapeutic Potentials. *Nutrients* 16 (2024) 924. <https://doi.org/10.3390/nu16070924>.
 113. M. Saqib, S. Iqbal, A. Mahmood, R. Akram, Theoretical Investigation for Exploring the Antioxidant Potential of Chlorogenic Acid: A Density Functional Theory Study. *Int. J. Food Prop.* 19 (2016) 745–751. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1042588>.
 114. J.W. Cha, M.J. Piao, K.C. Kim, C.W. Yao, J. Zheng, S.M. Kim, C.L. Hyun, Y.S. Ahn, J.W. Hyun, The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomol. Ther.* 22 (2014) 136–142. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.006>.
 115. G. Oboh, O.M. Agunloye, A.J. Akinyemi, A.O. Ademiluyi, S.A. Adefegha, Comparative Study on the Inhibitory Effect of Caffeic and Chlorogenic Acids on Key Enzymes Linked to Alzheimer's Disease and Some Pro-oxidant Induced Oxidative Stress in Rats' Brain-in Vitro. *Neurochem. Res.* 38 (2013) 413–419. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0935-6>.

116. J.G. Xu, Q.P. Hu, Y. Liu, Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 11625–11630. <https://doi.org/10.1021/jf303771s>.
117. M.H. Gordon, K. Wishart, Effects of Chlorogenic Acid and Bovine Serum Albumin on the Oxidative Stability of Low Density Lipoproteins in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5828–5833. <https://doi.org/10.1021/jf100106e>.
118. K. Karthikesan, L. Pari, V.P. Menon, Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *J. Funct. Foods* 2 (2010) 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.001>.
119. L. Pari, K. Karthikesan, V.P. Menon, Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 341 (2010) 109–117. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0442-5>.
120. H. Zatorski, M. Sałaga, M. Zielińska, A. Piechota-Polańczyk, K. Owczarek, R. Kordek, U. Lewandowska, C. Chen, J. Fichna, Experimental colitis in mice is attenuated by topical administration of chlorogenic acid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388 (2015) 643–651. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1110-9>.
121. R.T. Feng, Y.J. Lu, L.L. Bowman, Y. Qian, V. Castranova, M. Ding, Inhibition of activator protein-1, NF-kappa B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27888–27895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503347200>.
122. N. Yun, J.W. Kang, S.M. Lee, Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: Molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.018>.
123. M.H. Park, J.T. Hong, Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells* 5 (2016) 15. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>.
124. E.K. Kim, E.J. Choi, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (2010) 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.
125. J. Sheng, H. Sun, F.-B. Yu, B. Li, Y. Zhang, Y.-T. Zhu, The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. *Int. J. Med. Sci.* 17 (2020) 1095–1101. <https://doi.org/10.7150/ijms.44439>.

126. J.W. Yun, Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review. *Phytochemistry* 71 (2010) 1625–1641. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.07.011>.
127. Y. Narita, K. Iwai, T. Fukunaga, O. Nakagiri, Inhibitory Activity of Chlorogenic Acids in Decaffeinated Green Coffee Beans against Porcine Pancreas Lipase and Effect of a Decaffeinated Green Coffee Bean Extract on an Emulsion of Olive Oil. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 2329–2331. <https://doi.org/10.1271/bbb.120518>.
128. S. Almoosawi, G.J. McDougall, L. Fyfe, E.A.S. Al-Dujaili, Investigating the Inhibitory Activity of Green Coffee and Cacao Bean Extracts on Pancreatic Lipase. *Nutr. Bull.* 35 (2010) 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01841.x>.
129. Y. Bustanji, A. Issa, M. Mohammad, M. Hudaib, K. Tawah, H. Alkhatib, I. Almasri, B. Al-Khalidi, Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. *J. Med. Plants Res.* 4 (2010) 2235–2242. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.399>.
130. S. Raseetha, M.F. Zulkifli, M. Nurul-Nabilah, W. Ismail, Inhibition of Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes by Chlorogenic Acid Derived from Green Coffee (*Robusta* Sp.) Beans and Pulps. *Malays. Appl. Biol.* 46 (2017) 175–182.
131. A.S. Cho, S.M. Jeon, M.J. Kim, J. Yeo, K.I. Seo, M.S. Choi, M.K. Lee, Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>.
132. C.-W. Wan, C.N.-Y. Wong, W.-K. Pin, M.H.-Y. Wong, C.-Y. Kwok, R.Y.-K. Chan, P.H.-F. Yu, S.-W. Chan, Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytother. Res.* 27 (2013) 545–551. <https://doi.org/10.1002/ptr.4751>.
133. K. Huang, X.-C. Liang, Y.-L. Zhong, W.-Y. He, Z. Wang, 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LXRA transcription. *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 1903–1910. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6896>.
134. Z. Wang, K.-L. Lam, J. Hu, S. Ge, A. Zhou, B. Zheng, S. Zeng, S. Lin, Chlorogenic acid alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat-fed mice. *Food Sci. Nutr.* 7 (2019) 579–588. <https://doi.org/10.1002/fsn3.868>.
135. E. Thom, The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese

- people. J. Int. Med. Res. 35 (2007) 900–908.
<https://doi.org/10.1177/14732300070350062>.
136. S. Martinez-Lopez, B. Sarria, R. Mateos, L. Bravo-Clemente, Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: Results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. Eur. J. Nutr. 58 (2019) 865–878.
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1726-x>.
 137. E.A.S. Al-Dujaili, M.N. Abu Hajleh, W. Al-Turk, Effect of Green Coffee Bean Extract Consumption on Blood Pressure and Anthropometric Measures in Healthy Volunteers: A Pilot Crossover Placebo Controlled Study. Jordan J. Pharm. Sci. 9 (2016) 181–191.
<https://doi.org/10.12816/0033383>.
 138. S. Salamat, S.S. Sharif, A. Nazary-Vanani, H. Kord-Varkaneh, C.C.T. Clark, M. Mohammadshahi, The effect of green coffee extract supplementation on serum oxidized LDL cholesterol and total antioxidant capacity in patients with dyslipidemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Eur. J. Integr. Med. 28 (2019) 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.05.001>.
 139. S. Soga, N. Ota, A. Shimotoyodome, Stimulation of postprandial fat utilization in healthy humans by daily consumption of chlorogenic acids. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77 (2013) 1633–1636. <https://doi.org/10.1271/bbb.130147>.
 140. J.Y. Park, J.Y. Kim, S.P. Lee, J.H. Lee, The effect of green coffee bean extract supplementation on body fat reduction in overweight/obese women. Korean J. Nutr. 43 (2010) 374–381. <https://doi.org/10.4163/kjn.2010.43.4.374>.
 141. F. Zaccardi, D.R. Webb, T. Yates, M.J. Davies, Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: A 90-year perspective. Postgrad. Med. J. 92 (2016) 63–69.
<https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133281>.
 142. L.Y. Zuniga, M.C.A. Aceves-de la Mora, M. González-Ortiz, J.L. Ramos-Núñez, E. Martínez-Abundis, Effect of Chlorogenic Acid Administration on Glycemic Control, Insulin Secretion, and Insulin Sensitivity in Patients with Impaired Glucose Tolerance. J. Med. Food 2018, 21, 469–473. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0110>.
 143. Y. Ma, M. Gao, D. Liu, Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. Pharm. Res. 32 (2015) 1200–1209.
<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1526-9>.
 144. V.C. Pérez-Nájera, J.A. Gutiérrez-Urbe, M. Antunes-Ricardo, S. Hidalgo-Figueroa, C.L. Del-Toro-Sánchez, L.A. Salazar-Olivo, E. Lugo-Cervantes, *Smilax aristolochiifolia* root

- extract and its compounds chlorogenic acid and astilbin inhibit the activity of α -amylase and α -glucosidase enzymes. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2018 (2018) 6247306. <https://doi.org/10.1155/2018/6247306>.
145. C. Henry-Vitrac, A. Ibarra, M. Roller, J.M. Mérillon, X. Vitrac, Contribution of chlorogenic acids to the inhibition of human hepatic glucose-6-phosphatase activity in vitro by svetol, a standardized decaffeinated green coffee extract. J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 4141–4144. <https://doi.org/10.1021/jf9044827>.
 146. A. Gugliucci, D.H. Bastos, J. Schulze, M.F. Souza, Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. Fitoterapia. 80 (2009) 339–44. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.04.007>.
 147. L. Zhou, T. Zhang, B. Lu, Z. Yu, X. Mei, P. Abulizi, L. Ji, *Lonicerae Japonicae* Flos attenuates diabetic retinopathy by inhibiting retinal angiogenesis. J. Ethnopharmacol. 189 (2016) 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.039>.
 148. H.Y. Ye, Z.Y. Li, Y. Zheng, Y. Chen, Z.H. Zhou, J. Jin, The attenuation of chlorogenic acid on oxidative stress for renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. Arch. Pharm. Res. 39 (2016) 989–997. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0771-3>.
 149. D. Bagdas, H.Y. Ozboluk, N. Cinkilic, M.S. Gurun, Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy. J. Med. Food 17 (2014) 730–732. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2966>.
 150. D. Bagdas, B.C. Etoz, Z. Gul, S. Ziyank, S. Inan, O. Turacozen, N.Y. Gul, A. Topal, N. Cinkilic, S. Tas, M.O. Ozyigit, M.S. Gurun, In vivo systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions: Wound healing effects and cytotoxicity/genotoxicity profile. Food Chem. Toxicol. 81 (2015) 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.001>.
 151. C.M. Ajila, S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, S. Godbout, J.R. Valéro, Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. Crit. Rev. Biotechnol. 31 (2011) 227–249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>.
 152. A. Antony, M. Farid, Effect of temperatures on polyphenols during extraction. Appl. Sci. 12 (2022) 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>.
 153. J.K.U. Ling, J.H.S. Jeevanandam, J.Y.S. Chan, J. Nandong, Thermal degradation of antioxidant compounds: Effects of parameters, thermal degradation kinetics, and formulation strategies. Food Bioproc. Tech. 15 (2022) 1919–1935. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02797-1>.

154. A. Dawidowicz, K. Bernacik, R. Typek, M. Stankevic, Possibility of quinine transformation in food products: LC-MS and NMR techniques in analysis of quinine derivatives. *Eur. Food Res. Technol.* 244 (2018) 105–116. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2940-0>.
155. A.L Dawidowicz, K. Bernacik, R. Typek, Rutin Transformation During Its Analysis Involving Extraction Process for Sample Preparation. *Food Anal. Methods* 9 (2016) 213–224. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0170-2>.
156. M. Ravber, D. Pečar, A. Goršek, J. Iskra, Z. Knez, M. Škerget, Hydrothermal degradation of rutin: Identification of degradation products and kinetics study. *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 9196–9202. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03191>.
157. S.C.B. Kotte, P.K. Dubey, P.M. Murali, Identification and Characterization of Stress Degradation Products of Piperine and Profiling of a Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Extract Using LC/Q-TOF-Dual ESI-MS. *Anal. Methods* 6 (2014) 8022–8029. <https://doi.org/10.1039/C4AY01088D>.
158. L. Aztatzi-Rugiero, S.Y. Granados-Balbuena, Y. Zainos-Cuapio, E. Ocaranza-Sánchez, M. Rojas-López, Analysis of the Degradation of Betanin Obtained from Beetroot Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.* 56 (2019) 3677–3686. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03826-2>.
159. W. Wang, C. Sun, L. Mao, P. Ma, F. Liu, J. Yang, Y. Gao, The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 56 (2016) 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.004>.
160. L.C. Price, R.W. Buescher, Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. *J. Food Sci.* 62 (1997) 267–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03982.x>.
161. D. Suresh, K.N. Gurudutt, K. Srinivasan, Degradation of bioactive spice compound: Curcumin during domestic cooking. *Eur. Food Res. Technol.* 228 (2008) 807–812. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0993-9>.
162. T. Esatbeyoglu, K. Ulbrich, C. Rehberg, S. Rohn, G. Rimbach, Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Funct.* 6 (2015) 887–893. <https://doi.org/10.1039/C4FO00790E>.
163. R. Typek, A.L. Dawidowicz, D. Wianowska, K. Bernacik, M. Stankevic, M. Gil, Formation of Aqueous and Alcoholic Adducts of Curcumin during Its Extraction. *Food Chem.* 276 (2019) 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.006>.

164. A.L. Dawidowicz, R. Typek, Thermal stability of 5-O-caffeoylquinic acid in aqueous solutions at different heating conditions. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12578–12584. <https://doi.org/10.1021/jf103373t>.
165. A.L. Dawidowicz, R. Typek, The Influence of pH on the Thermal Stability of 5-O-Caffeoylquinic Acids in Aqueous Solutions. *Eur. Food Res. Technol.* 233 (2011) 223–232. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c09073>.
166. A.L. Dawidowicz, R. Typek, Formation of ester and amine derivatives of 5-O-caffeoylquinic acid in the process of its simulated extraction. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 12289–12295. <https://doi.org/10.1021/jf3029682>.
167. A.L. Dawidowicz, R. Typek, Thermal transformation of trans-5-O-caffeoylquinic acid (trans-5-CQA) in alcoholic solutions. *Food Chem.* 167 (2015) 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.086>.
168. D. Wianowska, R. Typek, A.L. Dawidowicz, Chlorogenic acid stability in pressurized liquid extraction conditions. *J. AOAC Int.* 98 (2015) 415–421. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-200>.
169. A.L. Dawidowicz, R. Typek, Transformation of 5-O-Caffeoylquinic acid in blueberries during high-temperature processing. *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 10889–10895. <https://doi.org/10.1021/jf503993q>.
170. M.F. Matei, R. Jaiswal, N. Kuhnert, Investigating the Chemical Changes of Chlorogenic Acids during Coffee Brewing: Conjugate Addition of Water to the Olefinic Moiety of Chlorogenic Acids and Their Quinides. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 12105–12115. <https://doi.org/10.1021/jf3028599>.
171. S. Deshpande, R. Jaiswal, M.F. Matei, N. Kuhnert, Investigation of acyl migration in mono- and dicaffeoylquinic acids under aqueous basic, aqueous acidic, and dry roasting conditions. *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 9160–9170. <https://doi.org/10.1021/jf5017384>.
172. B. Schetter, R. Mahrwald, Modern aldol methods for the total synthesis of polyketides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 7506–7525. <https://doi.org/10.1002/anie.200602780>.
173. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*. Oxford University Press, Oxford (2012).
174. C. Miao, L. Jiang, L. Ren, Q. Xue, F. Yan, W. Shi, X. Li, J. Sheng, S. Kai, Iodine-catalyzed coupling of β -hydroxyketones with aromatic amines to form β -aminoketones and Benzo[h]quinolones. *Tetrahedron* 5 (2019) 72215–2228. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.02.041>.

175. H.H. San, J. Huang, S. Lei Aye, X.-Y. Tang, Boron-Catalyzed Dehydrative Friedel-Crafts Alkylation of Arenes Using β -Hydroxyl Ketone as MVK Precursor. *Adv. Synth. Catal.* 363 (2021) 2386–2391, <https://doi.org/10.1002/adsc.202001269>.
176. K. Hao, D. Li, D. Fu, P. Zou, S. Xie, Y. Lan, Y. Chen, Metal-Free 1,3-Boronate Rearrangement to Ketones Driven by Visible Light. *Angew. Chem. Int. Ed.* 63 (2024) e202316481. <https://doi.org/10.1002/anie.202316481>.
177. J.J. Yun, X.Y. Liu, W. Deng, X.Q. Chu, Z.L. Shen, T.P. Loh, Chromium (III)-catalyzed addition of water and alcohol to α , β -unsaturated ketones for the synthesis of β -hydroxyl and β -alkoxyl ketones in aqueous media. *J. Org. Chem.* 83(18) (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01584>.
178. V. Resch, U. Hanefeld, The Selective Addition of Water. *Catal. Sci. Technol.* 5 (2015) 1385–1399. <https://doi.org/10.1039/C4CY00692E>.
179. J. Jin, U. Hanefeld, The Selective Addition of Water to C=C Bonds; Enzymes Are the Best Chemists. *Chem. Commun.* 47 (2011) 2502–2510. <https://doi.org/10.1039/c0cc04153j>.
180. H. Lauble, M.C. Kennedy, H. Beinert, C.D. Stout, Crystal Structures of Aconitase with Trans-aconitate and Nitrocitrate Bound. *J. Mol. Biol.* 237(4) (1994) 437–451, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1246>.
181. S.J. Lloyd, H. Lauble, G.S. Prasad, C.D. Stout, The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642A:citrate complex. *Protein Sci.* 8 (1999) 2655–2662. <https://doi.org/10.1110/ps.8.12.2655>.
182. S.-Y. Yang, X.-Y. He, Molecular mechanisms of fatty acid β -oxidation enzyme catalysis. Current Views of Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis. Rodział w: P.A. Quant, S. Eaton, (Eds), Current Views of Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer: Boston, MA, USA, 466 (2002) 133–143. https://doi.org/10.1007/0-306-46818-2_15.
183. J. Bos, A. García-Herraiz, G. Roelfes, Enantioselective Michael Addition of Water. An enantioselective artificial metallo-hydratase. *Chem. Sci.* 4 (2013) 3578–3582. <https://doi.org/10.1039/C3SC51449H>.
184. B.-S. Chen, V. Resch, L.G. Otten, U. Hanefeld, Enantioselective Michael Addition of Water. *Chem. A Eur. J.* 21 (2015) 3020–3030. <https://doi.org/10.1002/chem.201405579>.
185. I. Stewart, C.R.G. Bergman, F.D. Toste, Phosphine-catalyzed hydration and hydroalkoxylation of activated olefins: Use of a strong nucleophile to generate a strong base. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8696–8697. <https://doi.org/10.1021/ja035232n>.

186. X. Wang, D. Sui, M. Huang, Y. Jiang, Highly effective hydration of olefins using a wool-palladium complex as a catalyst. *Polym. Adv. Technol.* 17 (2006) 163–167. <https://doi.org/10.1002/pat.709>.
187. S.Q. Wang, Z.W. Wang, L.C. Yang, J.L. Dong, C.Q. Chi, D.N. Sui, Y.Z. Wang, J.G. Ren, M.Y. Hung, Y.Y. Jiang, A novel efficient route for preparation of chiral β -hydroxycarboxylic acid: Asymmetric hydration of unsaturated carboxylic acids catalyzed by heterobimetallic complex wool-palladium-cobalt. *J. Mol. Catal. A Chem.* 264 (2007) 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.08.073>.
188. A.J. Boersma, D. Coquière, D. Geerdink, F. Rosati, B.L. Feringa, G. Roelfes, Catalytic enantioselective syn hydration of enones in water using a DNA-based catalyst. *Nat. Chem.* 2(11) (2010) 991–995. <https://doi.org/10.1038/nchem.819>.
189. J.H. Yum, S. Park, R. Hiraga, I. Okamura, S. Notsu, H. Sugiyama, Modular DNA-based hybrid catalysts as a toolbox for enantioselective hydration of α,β -unsaturated ketones. *Org. Biomol. Chem.* 17 (2019) 2548–2553. <https://doi.org/10.1039/C9OB00196D>.
190. V. Resch, C. Seidler, B.-S. Chen, I. Degeling, U. Hanefeld, On the Michael Addition of Water to α,β -Unsaturated Ketones Using Amino Acids. *Eur. J. Org. Chem.* 2013(34) (2013) 7697–7704. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301230>.
191. J.J. Yun, M.L. Zhi, W.X. Shi, X.Q. Chu, Z.L. Shen, T.P. Loh, Indium (III)-Catalyzed Hydration and Hydroalkoxylation of α, β -Unsaturated Ketones in Aqueous Media. *Adv. Synth. Catal.* 360(14) (2018) 2632–2637. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800301>.
192. Z. Wu, X.-X. Feng, Q.-D. Wang, J.-J. Yun, W. Rao, J.-M. Yang, Z.-L. Shen, Bismuth Trichloride-Catalyzed Oxy-Michael Addition of Water and Alcohol to α,β -Unsaturated Ketones. *Chin. Chem. Lett.* 31 (2020) 1297–1300. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.09.017>.
193. D.H. Wu, A. Chen, C.S. Johnson, An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *J. Magn. Reson. Ser. A* 115 (1995) 260–264. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1176>.
194. A. Jerschow, N. Müller, Suppression of convection artifacts in stimulated-echo diffusion experiments. Double-stimulated-echo experiments. *J. Magn. Reson.* 125(2) (1997) 372–375. <https://doi.org/10.1006/jmre.1997.1123>.
195. D. Sinnaeve, The Stejskal–Tanner equation generalized for any gradient shape—an overview of most pulse sequences measuring free diffusion. *Concepts Magn. Reson. A* 40(2) (2012) 39–65, <https://doi.org/10.1002/cmr.a.21223>.

196. R. Neufeld, D. Stalke, Accurate molecular weight determination of small molecules via DOSY-NMR by using external calibration curves with normalized diffusion coefficients. *Chem. Sci.* 6 (2015) 3354–3364. <https://doi.org/10.1039/C5SC00670H>.
197. S. Bachmann, R. Neufeld, M. Dzemiński, D. Stalke, New External Calibration Curves (ECCs) for the Estimation of Molecular Weights in Various Common NMR Solvents. *Chem. Eur. J.* 22(25) (2016) 8462–8465. <https://doi.org/10.1002/chem.201601145>.
198. A.L. Dawidowicz, D. Wianowska, M. Olszowy-Tomczyk, On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (problems in estimation of antioxidant activity). *Food. Chem.* 131(3) (2012) 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>.
199. A.L. Dawidowicz, M. Olszowy-Tomczyk, Depletion/protection of β -carotene in estimating antioxidant activity by β -carotene bleaching assay. *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 7321–7328. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1820-5>.
200. A.L. Dawidowicz, M. Olszowy-Tomczyk, R. Typek, Synergistic and antagonistic antioxidant effects in the binary cannabinoids mixtures. *Fitoterapia* 153 (2021) 104992. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104992>.
201. A.L. Dawidowicz, R. Typek, M. Olszowy-Tomczyk, Natural vs. Artificial Cannabinoid Oils: The Comparison of Their Antioxidant Activities. *Eur. Food Res. Technol.* 249 (2023) 359–366. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04121-9>.
202. T.L. Hwang, A.J. Shaka, Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A* 112 (1995) 275–279. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1047>.
203. R.W. Adams, C.M. Holroyd, J.A. Aguilar, M. Nilsson, G.A. Morris, “Perfecting” WATERGATE: Clean proton NMR spectra from aqueous solution. *Chem. Commun.* 49 (2013) 358–360. <https://doi.org/10.1039/C2CC37579F>.
204. F. Neese, F. Wennmohs, U. Becker, C. Riplinger, The ORCA quantum chemistry program package. *J. Chem. Phys.* 152 (2020) 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
205. F. Neese, The SHARK Integral Generation and Digestion System. *J. Comp. Chem.* 44(3) (2022) 381–396. <https://doi.org/10.1002/jcc.26942>.
206. F. Neese, Software update: the ORCA program system, version 5.0. *WIREs Comput. Molec. Sci.* 12(1) (2022) 1606. <https://doi.org/10.1002/wcms.1606>.
207. M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform.* 4 (2012) 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

208. T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17 (1996) 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).
209. A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
210. E. Caldeweyher, S. Ehlert, A. Hansen, H. Neugebauer, S. Spicher, C. Bannwarth, S. Grimme, A generally applicable atomic-charge dependent London dispersion correction. *J. Chem. Phys.* 150(15) (2019) 154122. <https://doi.org/10.1063/1.5090222>.
211. F. Weigend, R. Ahlrichs, Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7(18) (2005) 3297–3305. <https://doi.org/10.1039/B508541A>.
212. V. Barone, M. Cossi, Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J. Phys. Chem. A* 102(11) (1998) 1995–2001. <https://doi.org/10.1021/jp9716997>.
213. K. Wolinski, J.F. Hilton, P. Pulay, Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8251–8260. <https://doi.org/10.1021/ja00179a005>.
214. F.L. Costa, A.C. de Albuquerque, R.G. Fiorot, L.M. Lião, L.H. Martorano, G.V. Mota, A.L. Valverde, J.W. Carneiro, F.M. dos Santos Junior, Structural Characterisation of Natural Products by Means of Quantum Chemical Calculations of NMR Parameters: New Insights. *Org. Chem. Front.* 8 (2021) 2019–2058. <https://doi.org/10.1039/D1QO00034A>.
215. L.B. Krivdin, Computational ^1H and ^{13}C NMR in structural and stereochemical studies. *Magn. Reson. Chem.* 60 (2022) 733–828. <https://doi.org/10.1002/mrc.5260>.
216. T.D.W. Claridge, High-resolution NMR techniques in organic chemistry. Trzecia edycja, Elsevier, Oxford, 2016.
217. S. Marković, J. Tošović, J.M. Dimitrić Marković, Synergic application of spectroscopic and theoretical methods to the chlorogenic acid structure elucidation. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 164 (2016) 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.03.044>.
218. M.S. Cubberley, B.L. Iverson, ^1H NMR investigation of solvent effects in aromatic stacking interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 123(31) (2001) 7560–7563. <https://doi.org/10.1021/ja015817m>.

219. H.M. Colquhoun, D.J. Williams, Z. Zhu, Macrocyclic aromatic ether-imide-sulfones: versatile supramolecular receptors with extreme thermochemical and oxidative stability. *J. Am. Chem. Soc.* 124(45) (2002) 13346–13347. <https://doi.org/10.1021/ja027851m>.
220. H.M. Colquhoun, Z. Zhu, D.J. Williams, M.G.B. Drew, C.J. Cardin, Y. Gan, A.G. Crawford, T.B. Marder, Induced-Fit Binding of π -Electron-Donor Substrates to Macrocyclic Aromatic Ether Imide Sulfones: A Versatile Approach to Molecular Assembly. *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 907–918. <https://doi.org/10.1002/chem.200901484>.
221. B.W. Greenland, M.B. Bird, S. Burattini, R. Cramer, R.K. O'Reilly, J.P. Patterson, W. Hayes, C.J. Cardin, H.M. Colquhoun, Mutual binding of polymer end-groups by complementary π – π -stacking: a molecular “Roman handshake”. *Chem. Commun.* 49 (2013) 454–456. <https://doi.org/10.1039/C2CC35965K>.
222. A.D. Bain, Chemical exchange in NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 43 (2003) 63–103. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2003.08.001>.
223. S. Klod, E. Kleinpeter, Ab initio calculation of the anisotropy effect of multiple bonds and the ring current effect of arenes—application in conformational and configurational analysis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2(10) (2001) 1893–1898. <https://doi.org/10.1039/B009809O>.
224. R.I. Slavchov, J.K. Novev, S. Mosbach, M. Kraft, Vapor Pressure and Heat of Vaporization of Molecules That Associate in the Gas Phase, *Ind. Eng. Chem. Res.* 57 (2018) 5722–5731. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b04241>.
225. R. Ludwig, Water: From clusters to the bulk. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40(10) (2001) 1808–1827. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010518\)40:10<1808::AID-ANIE1808>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010518)40:10<1808::AID-ANIE1808>3.0.CO;2-1).
226. U. Buck, C.C. Pradzynski, T. Zeuch, J.M. Dieterich, B. Hartke, A size resolved investigation of large water clusters. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16(15) (2014) 6859–6871. <https://doi.org/10.1039/C3CP55185G>.
227. A.K. Savage, J.P. van Duynhoven, G. Tucker, C.A. Daykin, Enhanced NMR-based profiling of polyphenols in commercially available grape juices using solid-phase extraction. *Magn. Reason. Chem.* 49 (2011) 27–36. <https://doi.org/10.1002/mrc.2846>.
228. D.M. Jacobs, L. Spiesser, M. Garnier, N. de Roo, F. van Dorsten, B. Hollebrands, E. van Velzen, R. Draijer, J. van Duynhoven, SPE–NMR Metabolite Sub-Profiling of Urine. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2349–2361. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6339-2>.

229. E.V. Barros, H.P. Dias, F.E. Pinto, A.O. Gomes, R.R. Moura, A.C. Neto, J.C.C. Freitas, G.M.F.V. Aquije, B.G. Vaz, W. Romão Characterization of Naphthenic Acids in Thermally Degraded Petroleum by ESI(-)-FT-ICR MS and ^1H NMR after Solid-Phase Extraction and Liquid/Liquid Extraction. *Energy Fuels* 32 (2018) 2878–2888. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b03099>.
230. N.F.A. Vegt, D. Nayar, The Hydrophobic Effect and the Role of Cosolvents. *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 9986–9998. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b06453>.
231. F. Würthner, Solvent Effects in Supramolecular Chemistry: Linear Free Energy Relationships for Common Intermolecular Interactions. *J. Org. Chem.* 87 (2021) 1602–1615. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00625>.
232. Q. Sun, The Hydrophobic Effects: Our Current Understanding. *Molecules* 27 (2022) 7009. <https://doi.org/10.3390/molecules27207009>.

SPIS RYSUNKÓW

- Rys. 1.** Podstawowy szkielet flawonoidów z oznaczeniem poszczególnych pierścieni jakie powszechnie stosuje się w literaturze.
- Rys. 2.** Najważniejsze grupy flawonoidów.
(Elementy strukturalne charakterystyczne dla poszczególnych grup flawonoidów zaznaczono kolorem czerwonym. Centrum chiralne oznaczone w strukturze flawanoli gwiazdką może przyjmować zarówno konfigurację R, jak i S).
- Rys. 3.** Luteolina i jej -O- i -C-glikozydy (cynarozyd i orientyna) jako przykład aglikonowej oraz glikozydowej formy flawonoidów.
- Rys. 4.** Przykładowe związki należące do poszczególnych grup polifenoli nieflawonoidowych.
- Rys. 5.** Uproszczony schemat biosyntezy poszczególnych grup polifenoli.
- Rys. 6.** Struktura krystalograficzna kompleksu złożonego z trans-resweratrolu, dinukleotydu flawinoadeninowego oraz reduktazy chinonowej typu drugiego (enzymu uczestniczącego w redukcji szkodliwego wpływu chinonów na ludzki organizm). Liniami przerywanymi zaznaczono najważniejsze oddziaływania trans-resweratrolu. Struktura z bazy PDB: 1SG0 [37].
- Rys. 7.** Struktura kwasu 1-L-(-)-chininowego.
Numery atomów węgla zgodne z zaleceniami IUPAC z 1976 roku.
- Rys. 8.** Struktury najważniejszych kwasów chlorogenowych będących estrami kwasu chininowego i kwasu kawowego.
- Rys. 9.** Przykładowa konformacja 5-CQA.
- Rys. 10.** Najważniejsze źródła kwasów chlorogenowych:
(A) ziarna zielonej kawy, (B) kwiatostany karczocha, (C) zmielone liście i łodygi ostrokrzewu paragwajskiego (Yerba Mate), (D) owoce borówki wysokiej.
- Rys. 11.** Struktury pochodnych 5-CQA powstających podczas ekstrakcji tego kwasu wodą. Wg. [164, 165, 170].
- Rys. 12.** Struktury pochodnych 5-CQA powstających podczas ekstrakcji tego kwasu buforem cytrynianowym (struktury 1-3), buforem octanowym (struktury 4-5), buforem amonowym (struktury 6-11) oraz metanolem (struktury 12-13). Wg. [166, 167].
- Rys. 13.** Struktura centrum aktywnego akonitazy zawierającej kofaktor będący klasterem atomów żelaza i siarki. Atom żelaza niezwiązany z resztą cysteiny koordynuje cząsteczkę wody oraz anion kwasu trans-akonitowego. PDB: 1ACO [182].
- Rys. 14.** Schemat reakcji addycji wody z wykorzystaniem kompleksu jonów Cu^{2+} i DNA z jąder łosia jako katalizatora. Wg. [190].
- Rys. 15.** Chromatogramy LC-MS (tryb SIM): (A) roztworu wzorcowego 5-CQA, (B) symulowanego ekstraktu 5-CQA oraz (C i D) frakcji wyizolowanych preparatywnie zawierających wodne addukty 5-CQA.

Chromatogram (B') zawiera zapis sygnałów pochodzących wyłącznie od jonów [M-H]⁺ o m/z 353 (t.j. jonów 3-, 4- i 5-CQA) oraz o m/z 515 (t.j. jonów 4,5-diCQA) (powiększenie 30-krotne).

Poszczególne piki odpowiadają następującym związkom: 1 – 5-CQA, 2 – kwas chininowy, 3 i 4 – wodne addukty 5-CQA, 5 – kwas kawowy, 6 – 3-CQA, 7 – 4-CQA, 8 – 4,5-diCQA.

- Rys. 16.** Widma ¹H (600 MHz, D₂O)
(A) wodnego adduktu 5-CQA nr 1 (pik nr 3 na rysunkach 15B-D),
(B) wodnego adduktu 5-CQA nr 2 (pik nr 4 na rysunkach 15B-D) oraz
(C) 5-CQA.
- Rys. 17.** Selektywne widma 1D ¹H-¹H NOESY (D₂O, 600 MHz) uzyskane dla protonów H7' 5-CQA-OH-1 przy czasie mieszania 0.3 sekundy (A) i 0.5 sekundy (C) oraz dla protonów H7' 5-CQA-OH-2 przy czasie mieszania 0.3 sekundy (B) i 0.5 sekundy (D).
- Rys. 18.** Najbardziej stabilne konformery R- oraz S-5-CQA-OH (numeracja zgodna z rosnącą energią poszczególnych konformerów) otrzymane w wyniku optymalizacji geometrii na poziomie B3LYP-D4/def2-TZVP.
- Rys. 19.** Dopasowanie eksperymentalnych wartości przesunięć chemicznych jąder ¹H oraz ich teoretycznych magnetycznych stałych ekranowania wyznaczonych na poziomie B3LYP-D4/def2-TZVP.
- Rys. 20.** Fragmenty widm ¹H (D₂O, 600 MHz) zawierające obszary z sygnałami protonów H3 5-CQA-OH-1 i 5-CQA zarejestrowane od razu po rozpuszczeniu suchej frakcji 5-CQA-OH-1 (A) oraz po 5-cio dniowej inkubacji roztworu w temperaturze 25 C (B). Wartości intensywności integralnych pochodzące od 5-CQA-OH zostały na każdym z widm przyjęte jako wartość równa 1.00.
- Rys. 21.** Chromatogramy LC-MS (tryb SIM):
(A) wyjściowej frakcji 5-CQA-OH-1,
(A1) frakcji 5-CQA-OH-1 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
(A2) frakcji 5-CQA-OH-1 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
(A1') frakcji 5-CQA-OH-1 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 5°C,
(A2') frakcji 5-CQA-OH-1 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 5°C,
(B) wyjściowej frakcji 5-CQA-OH-2,
(B1) frakcji 5-CQA-OH-2 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
(B2) frakcji 5-CQA-OH-2 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 25°C,
(B1') frakcji 5-CQA-OH-2 po 30 dniach inkubacji w temperaturze 5°C,
(B2') frakcji 5-CQA-OH-2 po 72 dniach inkubacji w temperaturze 5°C.
Pik 1 – 5-CQA-OH-1, pik 2 – 5-CQA-OH-2, pik 3 – 5-CQA.
- Rys. 22.** Degradacja 5-CQA-OH do 5-CQA w trakcie inkubacji wyizolowanych za pomocą chromatografii preparatywnej frakcji 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2 w temperaturze 25 (A) i 5°C (B).
- Rys. 23.** Przebieg izomeryzacji 5-CQA-OH w trakcie inkubacji frakcji:
5-CQA-OH-1 w temperaturze 25°C (A) i 5°C (C) oraz
5-CQA-OH-2 w temperaturze 25°C (B) i 5°C (D).

- Rys. 24.** Widma ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchej pozostałości wodnego ekstraktu 5-CQA (A) oraz 5-CQA (B).
- Rys. 25.** Chromatogramy LC/MS (tryb SCAN):
 (A) suchego ekstraktu 5-CQA rozpuszczonego w wodzie,
 (B) suchego ekstraktu 5-CQA rozpuszczonego w DMSO-d_6 i
 (C) wyjściowego ekstraktu 5-CQA.
 Chromatogramy prezentują sygnały z zakresu m/z 300-1000.
- Rys. 26.** Widma 1D TOCSY (DMSO-d_6 , 600 MHz) otrzymane w wyniku selektywnego echa spinowego protonów H5 w pozycjach 5.23 ppm (A) i 5.19 ppm (B). Sygnały w zakresie 3.2-3.4 ppm pochodzą od wody.
- Rys. 27.** Widma (DMSO-d_6 , 600 MHz i 125 MHz) ^1H - ^1H COSY (A) oraz ^1H - ^{13}C HSQC (B) suchej pozostałości wodnego ekstraktu 5-CQA.
 Na widmie HSQC sygnały dodatnie (kolor niebieski) pochodzą od grup CH oraz CH_3 , a sygnały ujemne (kolor zielony) pochodzą od grup CH_2 .
- Rys. 28.** Widmo ^1H - ^{13}C HMBC (DMSO-d_6 , 600 MHz i 125 MHz) suchej pozostałości wodnego ekstraktu 5-CQA.
- Rys. 29.** Widmo ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchej pozostałości z wodnego ekstraktu 5-CQA o stężeniu 2.5 mg/mL.
- Rys. 30.** Widma ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchych pozostałości otrzymanych z ekstraktów 5-CQA, które przed odparowaniem wody inkubowano 1 godz. w temperaturach 30°C (A) oraz 140°C (B).
 Wyjściowe stężenie 5-CQA - 1 mg/mL.
- Rys. 31.** Widma ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) suchych pozostałości otrzymanych po odparowaniu wody z symulowanego ekstraktu kwasu kawowego (A) oraz kwasu chinowego (B). Wg. [P1].
- Rys. 32.** Widmo 2D ^1H - ^1H NOESY (DMSO-d_6 , 600 MHz) kwasu chinowego. Wg. [P1].
- Rys. 33.** Struktury kompleksów 5-CQA* H_2O -1 oraz 5-CQA* H_2O -2. Wg. [P1].
- Rys. 34.** Widma ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz)
 (A) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 4-CQA,
 (B) 4-CQA,
 (C) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 3-CQA oraz
 (D) 3-CQA.
 Wg. [P1].
- Rys. 35.** Widma (DMSO-d_6 , 600 MHz i 125 MHz) ^1H - ^1H COSY (A) i ^1H - ^{13}C HSQC (B) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 4-CQA oraz widma ^1H - ^1H COSY (C) i ^1H - ^{13}C HSQC (D) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 3-CQA.
 Sygnały dodatnie (kolor niebieski) widoczne na widmach HSQC pochodzą od grup CH oraz CH_3 , a sygnały ujemne (kolor zielony) pochodzą od grup CH_2 . Wg. [P1].
- Rys. 36.** Widmo ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) otrzymane po rozpuszczeniu suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA.

Powiększone zakresy widma zawierają sygnały rezonansowe pochodzące od 5-CQA oraz od jego hydratów - 5-CQA*H₂O-1 i 5-CQA*H₂O-2, które wykorzystywano przy prowadzeniu analiz ilościowych. Wg. [P2].

Rys. 37. Wpływ czasu inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na:

- stężenie 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz całkowite stężenie hydratów w suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA (lewa oś rzędnych), oraz
- stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1 lub 5-CQA*H₂O-2 lub sumy obu hydratów (prawa oś rzędnych).

Warunki: stężenie 5-CQA w inkubowanym wodnym roztworze – 1 mg/mL; temperatura inkubacji – 30°C; inkubacja statyczna; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

Rys. 38. Wpływ początkowego stężenia 5-CQA w jego wodnym roztworze na:

- stężenie 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz na stężenie obu hydratów w suchych ekstraktach wodnych roztworów 5-CQA inkubowanych w temperaturach 5 (A), 30 (B) i 60°C (C); oraz
- stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1 lub do 5-CQA*H₂O-2 lub do sumy obu hydratów po procesie usunięcia wody z wodnych roztworów 5-CQA inkubowanych w temperaturach 5 (A'), 30 (B') i 60°C (C').

Dane z wykresów (A-C) oraz (A'-C') podsumowano odpowiednio na wykresach D oraz D'.

Warunki: czas inkubacji – 24 godziny; inkubacja statyczna; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

Rys. 39. Wpływ temperatury inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz całości 5-CQA*H₂O.

Zależności dla 1 (A), 5 (B) oraz 24 godzinnej (C) inkubacji.

Warunki: stężenie 5-CQA w wodnym roztworze – 1 mg/mL; inkubacja statyczna; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

Rys. 40. Wpływ metody usuwania wody z roztworu 5-CQA na stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz do sumy obu hydratów.

Warunki: stężenie 5-CQA w wodnym roztworze – 1 mg/mL; temperatura inkubacji – 30°C; czas inkubacji – 24 godziny; inkubacja statyczna. Wg. [P2].

Rys. 41. Stopień konwersji 5-CQA do 5-CQA*H₂O-1, 5-CQA*H₂O-2 oraz do sumy obu hydratów w suchych ekstraktach otrzymanych po liofilizacji wodnych roztworów 5-CQA inkubowanych statycznie, wytrząsanych oraz poddawanych działaniu ultradźwięków.

Warunki: stężenie 5-CQA w wodnym roztworze – 1 mg/mL; temperatura inkubacji – 30°C; czas inkubacji – 15 minut; metoda usunięcia wody z roztworu – liofilizacja. Wg. [P2].

Rys. 42 Przykładowe widmo ¹H DOSY (DMSO-d₆, 600 MHz) suchej pozostałości inkubowanego wodnego roztworu 5-CQA.

Sucha pozostałość zawierała 35 % hydratów i 65 % 5-CQA. Na widmie zaznaczono sygnały pochodzące od 5-CQA oraz 5-CQA*H₂O. Wg. [P2].

- Rys. 43.** Krzywa kalibracyjna wykorzystana przy wyznaczaniu masy molowej 5-CQA*H₂O metodą wzorca zewnętrznego. Współczynniki dyfuzji wyznaczono metodą NMR. Wg. [P2].
- Rys. 44.** Struktury kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O]-1 i [2x5-CQA*2xH₂O]-2. Dane wg. [P2].
- Rys. 45.** Widma ¹H (90 % H₂O/10 %D₂O, 600 MHz) świeżo przygotowanego (A) i inkubowanego przez 24 godziny (C) wodnego roztworu 5-CQA oraz widma ¹H (DMSO-d₆, 600 MHz) suchych ekstraktów ze świeżo przygotowanego wodnego roztworu 5-CQA (B) i roztworu inkubowanego przez 24 godziny (D). Wg. [P3].
- Rys. 46.** (A) - Wpływ czasu inkubacji wodnego roztworu 5-CQA na przewodnictwo elektrolityczne oraz
(B) - przykładowy chromatogram LC-MS (tryb SCAN) wodnego roztworu 5-CQA po jego 24 godzinnej inkubacji. Wg. [P3].
- Rys. 47.** (A) - Przykładowy chromatogram LC-MS (tryb SIM) hydrolizatu wodnego roztworu 5-CQA inkubowanego przez 24 godziny oraz
(B) - stężenia 5-CQA, kwasu kawowego i kwasu chininowego w hydrolizatach ze świeżo przygotowanych i inkubowanych przez 1 i 24 godziny wodnych roztworów 5-CQA. Wg. [P3].
- Rys. 48.** Krzywe przedstawiające kinetykę reakcji zachodzących pomiędzy kationorodnikami ABTS (A) lub rodnikami DPPH (B) lub kompleksami Cu(II)-neokupreina (C) lub kompleksami Fe(III)-2,4,6-Tri(2-pirydylo)-s-triazyna (D) lub rodnikami peroksyłowymi (E) a wodnymi roztworami 5-CQA, które były nieinkubowane (zielona kropkowana krzywa z okręgami) i inkubowane przez 1 i 24 godziny (odpowiednio przerywana czerwona krzywa z trójkątami i niebieska linia z kwadratami). Wg. [P3].
- Rys. 49.** Procent nieprzereagowanego kationorodnika ABTS (A) i rodnika DPPH (B) po 60 minutach reakcji ze świeżo przygotowanymi i inkubowanymi przez 1 i 24 godziny modelowymi napojami izotonicznymi, modelowymi napojami energetycznymi i ich bazami. Wg. [P3].
- Rys. 50.** Wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA o różnym stężeniu na:
(A) - stopień transformacji 5-CQA do jego hydratów,
(B) - procentową zawartość nieprzekształconego 5-CQA i
(C) - zawartość nieprzekształconego 5-CQA wyrażoną w [mg/mL]. Wg. [P3].
- Rys. 51.** Stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu:
- wody z wodnego roztworu 5-CQA;
 - octanu etylu z ekstraktu otrzymanego w wyniku ekstrakcji ciecz-ciecz wodnego roztworu 5-CQA
 - acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent dla kolumnienki na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA w technice SPE;
 - acetonitrylu z końcowego ekstraktu uzyskanego w wyniku ekstrakcji wodnego roztworu 5-CQA z wykorzystaniem techniki QuEChERS;

- acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent dla kolumnienki upakowanej zawiesziną sorbentu i wodnego roztworu 5-CQA w technice MSPD. Wg. [P4].
- Rys. 52.** Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu eluentu wykorzystanego do elucji 5-CQA z kolumny C-18 na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA. Wg. [P4].
- Rys. 53.** Wpływ stężenia wody w mieszaninach metanol/woda wykorzystanych do elucji 5-CQA z kolumny SPE na stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu rozpuszczalnika. Wg. [P4].
- Rys. 54.** Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu:
- wody z wodnego roztworu 5-CQA,
 - acetonitrylu zastosowanego jako końcowy eluent kolumnienki SPE wypełnionej sorbentem C-18 na którą naniesiono wodny roztwór 5-CQA,
 - wody z wodnego roztworu 5-CQA naniesionego na kolumnienkę SPE wypełnioną sorbentem C-18 po przekroczeniu jej objętości przebicia, oraz
 - wody z wodnego roztworu 5-CQA po jego wcześniejszym wytrząsaniu z heksadekanem.
- Rys. 55.** Stopień konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych pozostałości otrzymanych po odparowaniu wody z roztworu 5-CQA w wodzie lub wodzie nasyconej rozpuszczalnikiem organicznym.
- Rys. 56.** Stopień transformacji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu octanu etylu z ekstraktów LLE soku jabłkowego, wodnego ekstraktu korzeni arcydzięgla litworu (*Angelica Archangelica radix*) i wodnego ekstraktu ziela rozmarynu (*Salvia rosmarinus* Spenn.), które przed ekstrakcją wzbogacono w 5-CQA do poziomu 1 mg/mL. Wg. [P4].
- Rys. 57.** Stopień konwersji 5-CQA do $2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}$ określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu wody z wodnych roztworów 5-CQA różniących się pH. Wg. [P4].
- Rys. 58.** (A) Wpływ czasu inkubacji wodnych roztworów 5-CQA o jego różnych stężeniach na stopień transformacji 5-CQA do 5-CQA-OH.
 (B) Wpływ stężenia 5-CQA w jego wodnym roztworze na stopień konwersji 5-CQA do $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ -1 lub $[2x5\text{-CQA} \cdot 2x\text{H}_2\text{O}]$ -2 lub ich sumy po inkubacji w temperaturze 30°C.
 (Rys 58 B to powtórzenie Rys. 38 z rozdz. 14).
- Rys. 59.** Widma ^1H (DMSO- d_6 + 0.5 mM D_3PO_4 , 600 MHz) suchych pozostałości z wyodrębnionych za pomocą chromatografii preparatywnej frakcji zawierających (A) 5-CQA-OH-1 oraz (B) 5-CQA-OH-2.
- Rys. 60.** Widma 1D TOCSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) otrzymane dla suchej pozostałości frakcji 5-CQA-OH-1 w wyniku selektywnego echa spinowego protonów

w pozycji 5.15 ppm (A1), 5.09 ppm (A2) i 4.98 ppm (A3) oraz widma 1D TOCSY (DMSO-d₆, 600 MHz) otrzymane dla suchej pozostałości frakcji 5-CQA-OH-2 w wyniku selektywnego echa spinowego protonów w pozycji 5.12 ppm (B1), 5.06 ppm (B2) i 4.95 ppm (B3).

- Rys. 61.** (A1) i (A2) - widma ¹H-¹H COSY i ¹H-¹³C HSQC suchej pozostałości 5-CQA-OH-1 (DMSO-d₆, 600 MHz i 125 MHz);
(B1) i (B2) - widma ¹H-¹H COSY i ¹H-¹³C HSQC suchej pozostałości 5-CQA-OH-2 (DMSO-d₆, 600 MHz i 125 MHz).
Sygnały dodatnie (kolor niebieski) widoczne na widmach HSQC pochodzą od grup CH oraz CH₃, a sygnały ujemne (kolor zielony) pochodzą od grup CH₂.
- Rys. 62.** Widmo ¹H DOSY (DMSO-d₆ + 0.5 mM D₃PO₄, 600 MHz) suchych pozostałości frakcji adduktów 5-CQA-OH-1 (A) oraz 5-CQA-OH-2 (B).

SPIS TABEL

- Tabela 1** Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA oraz wodnych adduktów 5-CQA (5-CQA-OH) (D_2O , 600 MHz i 125 MHz).
- Tabela 2** Wartości przesunięć chemicznych wyznaczonych eksperymentalnie ($\delta^1H_{exp.}$) oraz wartości przesunięć określonych teoretycznie ($\delta^1H_{teor.}$) dla 5-CQA-OH-1 i 5-CQA-OH-2. Dopasowania dokonano dla obliczonych teoretycznie magnetycznych stałych ekranowania (poziom B3LYP-D4/def2-TZVP).
- Tabela 3** Wartości parametrów opisujących dopasowanie przesunięć chemicznych wyznaczonych eksperymentalnie i obliczonych teoretycznie magnetycznych stałych ekranowania (R^2 i a) oraz wartości parametrów opisujących różnice pomiędzy eksperymentalnymi wartościami przesunięć i wartościami przesunięć wyznaczonymi na podstawie dopasowania (σ i Δ_{max}).
- Tabela 4** Stężenia 5-CQA i jego wodnych adduktów określone technikami LC-MS oraz NMR we frakcjach wyizolowanych za pomocą chromatografii preparatywnej.
- Tabela 5** Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA oraz kompleksów 5-CQA*H₂O (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz).
- Tabela 6** Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 4-CQA oraz kompleksów 4-CQA*H₂O (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz). Wg. [P1].
- Tabela 7** Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 3-CQA oraz kompleksów 3-CQA*H₂O (DMSO- d_6 , 600 MHz i 125 MHz). Wg. [P1].
- Tabela 8** Dane NMR DOSY oraz obliczone masy molowe dla kompleksów [2x5-CQA*2xH₂O]. Dane wg. [P2].
- Tabela 9** Stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów LLE i SPE z różnych typów kawy oraz herbaty. Wg. [P4].
- Tabela 10** Stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu wody z wodnych roztworów 5-CQA zawierających przykładowe składniki matryc roślinnych oraz octanu etylu z ekstraktów LLE wodnych roztworów 5-CQA zawierających te same przykładowe składniki matryc roślinnych. Wg. [P4].
- Tabela 11** Stopień transformacji 5-CQA do 2x5-CQA*2xH₂O określony w oparciu o analizę NMR suchych ekstraktów otrzymanych po odparowaniu octanu etylu z ekstraktów LLE wodnych roztworów 5-CQA z dodatkiem kwasów i zasad. Wg. [P4].
- Tabela 12** Stężenia 5-CQA i jego hydratów wyznaczone metodą NMR oraz stężenia 5-CQA wyznaczone metodą LC-MS w suchych ekstraktach. Wg [P4].
- Tabela 13** Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA-OH-1 oraz jego hydratów (DMSO- d_6 + 0.5 mM D_3PO_4 , 600 MHz i 125 MHz).

Tabela 14 Wartości przesunięć chemicznych oraz opisy struktur multipletowych sygnałów 5-CQA-OH-2 oraz jego hydratów (DMSO-d₆ + 0.5 mM D₃PO₄, 600 MHz i 125 MHz).

Tabela 15 Wyniki pomiarów NMR DOSY oraz obliczone masy molowe dla 5-CQA-OH i kompleksów [2x5-CQA-OH*2xH₂O].

STRESZCZENIE

Kwasy chlorogenowe to związki przynależne do grupy polifenoli, które od dawna są przedmiotem zainteresowania badaczy z uwagi na ich wysoką i różnorodną aktywność biologiczną oraz zastosowanie. Ich głównym i najbardziej rozpowszechnionym przedstawicielem jest kwas 5-O-kawoilochinowy (5-CQA) będący estrem kwasu kawowego i chinowego, w którym kwas kawowy tworzy wiązanie estrowe z grupą hydroksylową kwasu chinowego przy atomie węgla C5.

Jak wynika z literatury, 5-CQA (jak i inne kwasy chlorogenowe) podczas jego izolacji z matryc roślinnych metodą ekstrakcji wodą lub mieszaninami wodno-alkoholowymi ulega hydrolizie, trans-estryfikacji i izomeryzacji trans-cis. Istnieją pośrednie dowody wskazujące, że ulega on również addycji wody na drodze reakcji Michaela. Ostatni z wymienionych procesów, czyli bezpośrednie przyłączenie wody do sprzężonego wiązania alkenowego 5-CQA budzi wiele wątpliwości z punktu widzenia chemii organicznej, ponieważ jego przeprowadzenie stanowi wyzwanie nawet w przypadku prostych związków. Wskazane wątpliwości wydają się tym bardziej zasadne ze względu na obecność kilku grup polarnych w strukturze kwasów chlorogenowych, które mogą oddziaływać z wodą „blokując” addycję lub prowadzić do powstania innych ich pochodnych.

Szeroko zakrojone badania modelowych wodnych roztworów i symulowanych ekstraktów 5-CQA, jak również produktów roślinnych i spożywczych zawierających ten kwas, przeprowadzone w ramach prezentowanej pracy głównie przy użyciu spektroskopii NMR i chromatografii cieczonej, wykazały, że na skutek bezpośredniego oddziaływania 5-CQA z wodą powstają dwa typy jego pochodnych, których masy są o 18 Da większe od masy macierzystego związku. Pierwszym z nich są wodne addukty 5-CQA powstające w wyniku przyłączenia wody do tego kwasu właśnie na drodze addycji Michaela. Ich ilość w roztworach wodnych jest niewielka. Warto zauważyć, że ulegają one powolnej degradacji i izomeryzacji. Drugi typ wodnych pochodnych 5-CQA, który tworzy się w znacznie większych ilościach, to dwa jego hydraty t.j. kompleksy 5-CQA z wodą. Każdy z tych kompleksów składa się z dwóch cząsteczek 5-CQA i dwóch cząsteczek wody połączonych ze sobą za pomocą wiązań wodorowych. Prawdopodobnie powstają one na drodze „wychwytu” monomerycznych lub dimerycznych cząsteczek wody (które są obecne w niewielkich ilościach w roztworach

wodnych) przez 5-CQA. Na podstawie szczegółowych badań strukturalnych hydratów 5-CQA wykazano, że za wiązanie wody przez ten kwas odpowiedzialny jest układ składający się z położonych blisko siebie dwóch grup hydroksylowych i grupy estrowej. Izomery 5-CQA i jego wodne addukty, w których obecne są podobne motywy strukturalne, także tworzą kompleksy z wodą.

Przebadane i opisane w ramach dysertacji wodne pochodne 5-CQA nie były wcześniej znane z literatury.

ABSTRACT

Chlorogenic acids are polyphenolic compounds that have long attracted scientific interest due to their significant and diverse biological activities. Their most abundant and well-studied representative is 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA), an ester formed between caffeic acid and quinic acid. In this compound, caffeic acid forms an ester bond with the hydroxyl group attached to C5 carbon atom of quinic acid.

According to the literature, 5-CQA (as well as other chlorogenic acids) undergoes hydrolysis, transesterification and trans-cis isomerization during its isolation from plant matrices by extraction with water or water-alcohol mixtures. There is indirect evidence suggesting that it also undergoes water addition via the Michael reaction. The last of the mentioned processes, i.e. addition of water to the conjugated alkene bond of 5-CQA, raises many doubts from an organic chemistry perspective, as carrying out such a reaction is challenging even with simple compounds. These doubts seem all the more justified due to the presence of a few polar groups in the structure of chlorogenic acids that can also interact with water, which may result in the "blockade" of the addition or lead to the formation of other derivatives.

Extensive studies on model aqueous solutions and simulated extracts of 5-CQA, as well as plant and food products containing this acid, conducted in the present dissertation - primarily using NMR spectroscopy and liquid chromatography - revealed that the direct interaction of 5-CQA with water leads to the formation of two types of its derivatives, each with a mass 18 Da greater than that of the parent compound. The first of them are 5-CQA water adducts, which are formed by the addition of water to the 5-CQA molecule precisely via Michael addition. Their quantity in aqueous solutions is small. It is worth noting that they undergo slow degradation and isomerization. The second type of aqueous derivatives of 5-CQA, which are formed in much larger amounts, are its two hydrates, i.e. complexes of 5-CQA with water. Each of the considered complexes consists of two 5-CQA molecules and two water molecules connected to each other by hydrogen bonds. Formation of hydrates is probably the result of "capturing" of monomeric or dimeric water molecules (which are present in small quantities in water solutions) by 5-CQA. Detailed structural investigation of 5-CQA hydrates showed that the system of two hydroxyl groups and an ester group located close to

each other is responsible for water binding by 5-CQA. Isomers of 5-CQA and 5-CQA water adducts, in which similar structural motifs are present, also form complexes with water.

The aqueous derivatives of 5-CQA examined and described in the dissertation were not previously known from the literature.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje dotyczące wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie:

- [P1]. **P. Holowinski**, A.L. Dawidowicz, R. Typek, Chlorogenic acid-water complexes in chlorogenic acid containing food products, *Journal of Food Composition and Analysis* 109 (2022) 104509.
- [P2]. **P. Hołowiński**, A.L. Dawidowicz, R. Typek, Kinetics and possible mechanism of chlorogenic acid–water complex formation, *New J. Chem.* 47 (2023) 16686–16694.
- [P3]. A.L. Dawidowicz, R. Typek, **P. Hołowiński**, M. Olszowy-Tomczyk, The hydrates of chlorogenic acid in its aqueous solution and in stored food products, *European Food Research and Technology* 250 (2024) 2669–2680.
- [P4]. **P. Hołowiński**, R. Typek, A.L. Dawidowicz, Formation of chlorogenic acid hydrates during food stuffs preparation procedures for NMR analysis, *European Food Research and Technology* (2025). <https://doi.org/10.1007/s00217-025-04691-4>.

Pozostale publikacje:

- [1]. M.P. Dybowski, R. Typek, A.L. Dawidowicz, **P. Holowinski**, On practical problems in precise estimation of 5F-ADB in urine samples, *Forensic Toxicol.* 39 (2021) 213–221.
- [2]. M.P. Dybowski, **P. Holowinski**, R. Typek, A.L. Dawidowicz, Comprehensive analytical characteristics of N-(adamantan-1-yl)-1- (cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide (ACHMINACA), *Forensic Toxicol.* 39 (2021) 230–239.
- [3]. M.P. Dybowski, **P. Holowinski**, R. Typek, A.L. Dawidowicz, Comprehensive analytical and structural characteristics of methyl 3,3-dimethyl-2-(1-(pent-4-en-1-yl)-1H-indazole-3-carboxamido)butanoate (MDMB-4en-PINACA), *Forensic Toxicol.* 39 (2021) 481–492.
- [4]. **P. Holowinski**, R. Typek, A.L. Dawidowicz, M. Rombel, M.P. Dybowski, Formation of trifluoroacetic artefacts in gas chromatograph injector during Cannabidiol analysis, *J. Chromatogr. A* 1671 (2022) 463020.

- [5]. R. Typek, **P. Holowinski**, A.L. Dawidowicz, M.P. Dybowski, M. Rombel, Chromatographic analysis of CBD and THC after their acylation with blockade of compound transformation, *Talanta* 251 (2023) 123777.
- [6]. A.L. Dawidowicz, M.P. Dybowski, R. Typek, M. Rombel, **P. Holowinski**, Unexpected formation of dichloroacetic and trichloroacetic artefacts in gas chromatograph injector during Cannabidiol analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 230 (2023) 115388.
- [7]. A.L. Dawidowicz, R. Typek, M.P. Dybowski, **P. Holowinski**, M. Rombel, Cannabigerol (CBG) signal enhancement in its analysis by gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Forensic Toxicol.* 42 (2024) 31–44.
- [8]. **P. Holowinski**, M.P. Dybowski, Determination of 3- and 4-chloromethcathinone interactions with plasma proteins: study involving analytical and theoretical methods, *Forensic Toxicol.* 42 (2024) 111–124.
- [9]. R. Typek, M.P. Dybowski, M. Rombel, **P. Holowinski**, A.L. Dawidowicz, Xenobiotics recovery from plasma using solid phase extraction with C-18 sorbent – The reasons of literature discrepancies, *J. Chromatogr. B* 1251 (2025) 124433.