

Review

ANTIOKSIDACIJSKA I ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST FLAVONOIDA

Snježana P. KAZAZIĆ

Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Primljeno u veljači 2004.

Flavonoidi u posljednje vrijeme privlače puno pozornosti zbog svoje izvanredne antioksidacijske i antiradikalne aktivnosti. Istraživanja su pokazala da su flavonoidi dobri "hvatači" slobodnih radikala, a time imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao lijekovi i antioksidansi. Flavonoidi imaju i širok niz drugih biokemijskih funkcija. Oni su možda najkorisnije fitokemikalije pronađene u hrani. Poznati su i sinergijski efekti kod antioksidacijskog djelovanja flavonoida. Pokazalo se da flavonoidi imaju antibakterijsko, sedativno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i druga djelovanja.

KLJUČNE RIJEČI: *oksidativni stres, reakcije s DPPH kovinama, slobodni radikali, TEAC-urijednost*

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Naravno da i velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost (1, 2). Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno (3-5), a znatno utječu na boju i okus hrane. U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti, odbijanje od prehrane i za zaštitu od UV zračenja (3). Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida (6). Očito su to spojevi koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a došavši u njih putem hrane, imaju sličnu ulogu i za druga živa bića.

Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}) (7), aktiviranja antioksidacijskih enzima (8) i inhibiranja oksidaza (9). To mnogostruko djelovanje vjerojatno je odgovorno za ukupnu učinkovitost tih spojeva, no u

određenim eksperimentalnim uvjetima ono predstavlja teškoću u određivanju odnosa struktura-aktivnost (SAR). Istraživanja SAR-a posljednjih 15 godina su pokazala da postoji veza između pojedinih strukturnih komponenata i svojstva hvatanja radikala, stvaranja kelatnih kompleksa i antioksidacijske aktivnosti. Ti nalazi omogućuju bolje razumijevanje antioksidacijskog i prooksidacijskog djelovanja flavonoida i daju prihvatljiva predviđanja utjecaja strukturne promjene na događaje tijekom metabolizma. Daljnji napredak tih istraživanja vodi razvoju hranjivih produkata i polusintetskih analoga bitnog antioksidacijskog i minimalno štetnog djelovanja. Mehanizam djelovanja flavonoida na molekularnoj razini u biološkim sustavima nije potpuno razjašnjen, kako zbog velike razlike u kemijskim svojstvima, tako i zbog njihove velike strukturne heterogenosti.

U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidativnog stresa, tj. oštećenja koje radikali i oksidansi izazivaju na površinskim membranama i receptorima i antioksidativne reparacije. Ako izostane antioksidacijska zaštita protiv nastajućih slobodnih radikala, može doći do oksidativnog stresa na nekoliko načina zbog djelovanja određenih

toksina ili fiziološkim stresom (10). Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kisika koje uključuju peroksidni radikal-anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), hidropersidni radikal (HO_2^{\cdot}), vodikov peroksid (H_2O_2) i lipidne peroksidne radikale, a spominje se odnedavno i okolišni (11) i endogeni ozon (12,13) uključeni su u razvojne procese brojnih bolesti, kao što su: astma, tumori, kardiovaskularne bolesti, katarakta, dijabetes, gastrointestinalne upalne bolesti, bolesti jetre, makularna degeneracija, periodontalne bolesti i drugi upalni procesi. Oni pridonose starenju stanica, mutagenesi, karcinogenesi i koronarnim bolestima srca putem destabilizacije membrana, oštećenja DNA i oksidaciji lipoproteina niske gustoće (LDL). Te reaktivne vrste kisika nastaju kao normalna posljedica biokemijskih procesa u tijelu, ali i kao rezultat povećanoga izlaganja okolišnim i/ili prehrambenim ksenobiotičima. Općenito, slobodni radikali vrlo su reaktivni i mogu npr. oštetiti lipidnu membranu stvarajući ugljikov radikal koji reagira s kisikom i dajući peroksidni radikal dalje reagira s masnim kiselinama stvarajući nove ugljikove radikale. Te lančane reakcije daju peroksidacijske produkte lipida (10). To znači da pokretanjem lančanih reakcija peroksidacije lipida jedan radikal može oštetiti mnoge molekule. Upravo zbog potencijalno štetne prirode slobodnih radikala u tijelu postoje različiti antioksidacijski mehanizmi obrane uključujući enzime, proteine, antioksidanse topljive u vodi i u mastima te flavonoide u svojstvu hvatača slobodnih radikala. Treba spomenuti da reaktivne dušikove vrste ($HOONO$, NO , NO_3 radikali i dr.) također pridonose oksidativnom stresu. Značenje antioksidansa u prehrani i njihova vrijednost u intervenciji i prevenciji kardiovaskularnih bolesti u posljednje su vrijeme posebno interesantni.

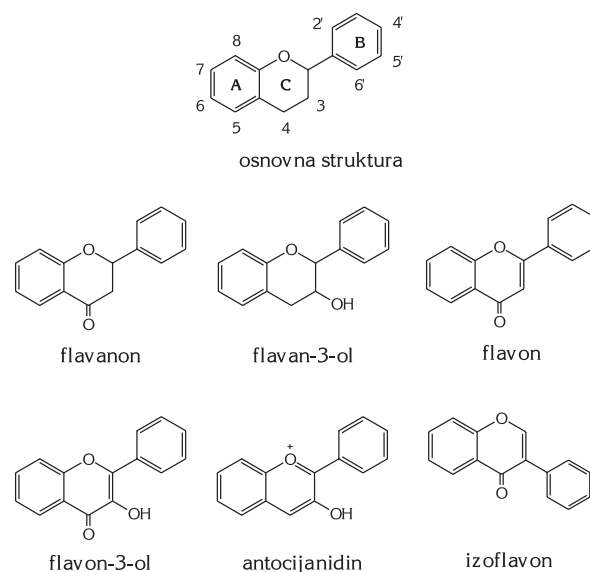
Francuski paradoks

Pojam "francuski paradoks" odnosi se na pojavu da u stanovništvu južne Francuske nalazimo manje kardiovaskularnih bolesti premda prehrana, u prosjeku, sadržava veću količinu zasićenih masti negoli prosječna prehrana stanovništva ostalih razvijenih zemalja. Početna istraživanja toga fenomena pokazuju da konzumiranje umjerene količine alkohola, posebice vina, može smanjiti rizik od bolesti srca i do 40 % (14). Smatralo se da je sastojak alkohola ili neka druga komponenta crnog vina odgovorna za tu zaštitu. Kasnija istraživanja antioksidacijskih djelovanja crnog vina pokazala su da crno vino i izolirani polifenoli crnog

vina inhibiraju oksidaciju LDL-kolesterola, prekidajući prvi korak stvaranja aterogeneze (15,16). Fuhrman et al. (15) zabilježili su da i bijelo vino, koje sadržava samo mali dio polifenola karakterističnih za crno vino, zapravo povećava mogućnost izlaganja LDL-oksidaciji, najvjerojatnije zbog mogućnosti da mala količina polifenola prevlada prooksidacijska svojstva alkohola. Pretpostavlja se da polifenolni antioksidansi, kao što su flavonoidi u crnom vinu, zajedno s antioksidansima iz maslinova ulja i svježega voća i povrća, kojim je bogata mediteranska kuhinja, mogu osigurati zaštitu protiv koronarnih bolesti srca. Određivanja sadržaja flavonoida objavljena su za vina mnogih zemalja (17-19) pa tako i hrvatskih (20, 21).

Podjela i kemijska struktura flavonoida

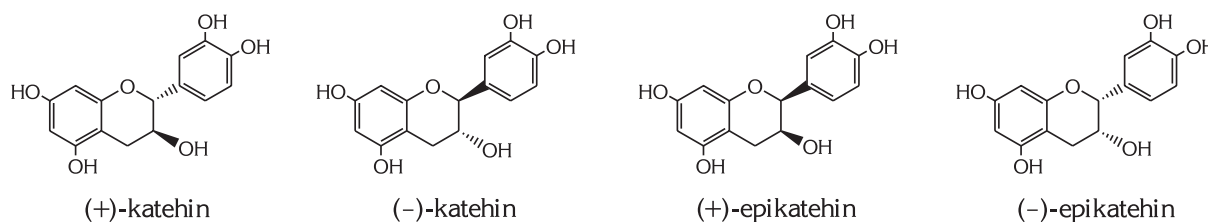
Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojeg se odvodi određeni broj osnovnih struktura, flavanoni, flavan-3-oli (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni (slika 1). Neki se od njih mogu smatrati derivatima benzo- γ -pirona ili benzo- γ -pirana. Svi oni mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela (6). Konačno, kod flavonoida postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini). Na slici 2. prikazana je biosinteza flavonoida (22).



Slika 1 Osnovna struktura i skupine flavonoida

U gotovo svakoj biljci (6) pronađeni su flavonoli i u manjoj mjeri flavoni. Flavonoli i flavoni često se nalaze zajedno, npr. u agrumima i povezani su sa specifičnim enzimima za razliku od flavona i flavonola koji se međusobno isključuju u mnogim biljkama. Antocijanini su pak gotovo odsutni u biljkama bogatim flavanonima. Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije. Najčešće se javljaju flavonoli i flavonoli s hidroksilnim skupinama u položajima 3' i 4' u prstenu B, a rjeđe oni s hidroksilnom grupom samo u položaju 4'. Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza. Glikozidirani cijanidini zovu se cijanini.

Flavonoidi koji su zastupljeni u hrani razlikuju se po položaju hidroksilnih, metoksi i glikozidnih skupina i u konjugaciji između prstena A i B. Flavonoidi u biljkama uglavnom su u obliku 3-O-glikozida ili polimera. Do polimerizacije flavanola u tanin i ostale složene spojeve dolazi npr. prilikom fermentacije enzimskom oksidacijom lišća zelenog u crni čaj. Tanini ili galotanini su esteri 3,4,5-trihidroksibenzojeve kiseline. Galoilna skupina tih tanina i monomernih katehina u zelenom čaju djelomično je odgovorna za svojstva kelatiranja i hvatanja slobodnih radikala. Kondenzirani tanini ili proantocijanidini sastoje se od flavanolskih jedinica kojih može biti i do 17 u jednoj molekuli. Za ljudsku prehranu najvažniji od tih spojeva su procijanidini koji se sastoje od monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina. (-)-katehini i (+)-epikatehini su fitotoksični i neke ih biljke sintetiziraju u korijenu da bi spriječile naseljavanje drugih biljaka na tom teritoriju (23) (slika 3). $\beta_{4\rightarrow6}$ (veza između atoma C6 krajnje molekule i atoma C4 početne molekule) i $\beta_{4\rightarrow8}$ (veza između atoma C8 krajnje molekule i atoma C4 početne molekule) vezani procijanidni dimeri, trimeri i oligomeri nalaze se u crnim vinima, sjemenkama grožđa, jabukama i sjemenkama kakaovca.



Slika 3 (\pm) katehin i (\pm) epikatehin

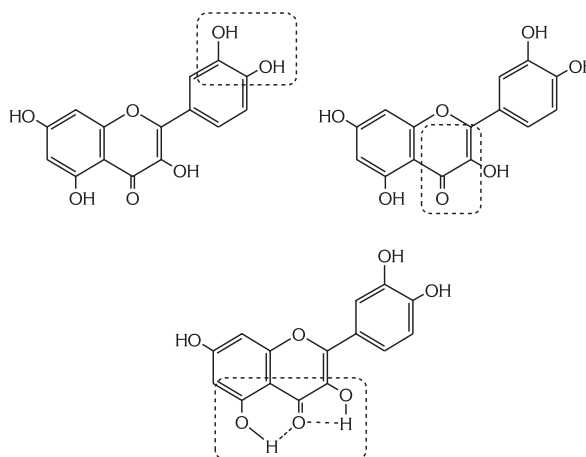
Strukturalna svojstva i antioksidacijska aktivnost

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina. Najvažniji je kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala. Flavonoid kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta:

1. kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, mora bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije,
2. iz njega nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju (24).

Radikali se obično stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom (25). Glavne strukturalne značajke flavonoida važne za sposobnost hvatanja radikala jesu:

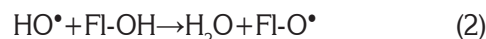
1. o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalima i omogućuje delokalizaciju elektrona;
2. 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-ketoskupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena;
3. hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (slika 4).



Slika 4 Strukturalne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala

Sljedeći mogući način antioksidacijskog djelovanja je interakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E. Sinergijski efekt međudjelovanjem tih antioksidansa vidi se iz primjera povećanja antiproliferativnog učinka kvercetina u interakciji s askorbinskom kiselinom. Taj povećani učinak povezan je s mogućnošću askorbinske kiseline da zaštiti polifenol od oksidativne degeneracije (26). Unatoč brojnim istraživanjima mehanizma zaštitnog djelovanja flavonoida on je i dalje predmetom mnogih rasprava. Flavonoidi (FI) djeluju kao antioksidansi mehanizmom hvatanja slobodnih

radikala (27-30) zbog čega nastaje manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikal (reakcije 1 i 2).



Općenito se vjeruje da se antioksidacijsko svojstvo (AO) flavonoida temelji na njihovoj sposobnosti doniranja vodikova atoma i na taj način hvatanja slobodnih radikala generiranih u reakciji peroksidacije lipida. AO se danas najčešće mjeri TEAC-vrijednošću (Trolox equivalent antioxidant activity) koja je definirana kao mmol/dm³ koncentracija otopine, u vodi topljivog analoga vitamina E, troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-

Tablica 1 Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida ovisno o strukturnim svojstvima

| Spoj | Grupa | Položaj grupa OH | | 2,3-dvo-struka veza | Antioksidacijska aktivnost TEAC (35) mmol dm ⁻³ | Antiradikalna aktivnost DPPH % | |
|----------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------|--|--------------------------------|--------------------|
| | | slobodnih | glikozidiranih ili metiliranih | | | iz literature | vlastiti rezultati |
| epikatehin galat | flavanol | 3,5,7,3',4',3'',4'',5'' | | | 4,9 | | |
| epigalokatehin galat | flavanol | 3,5,7,3',4',5',3'',4'',5'' | | | 4,8 | | |
| kvercetin | flavanol | 3,5,7,3',4' | | + | 4,7 | 89,8 (36) | 94,2 |
| delfinidin | antocijanidin | 3,5,7,3',4',5' | | | 4,44 | | |
| cijanidin | antocijanidin | 3,5,7,3',4' | | | 4,4 | | |
| epigalokatehin | flavanol | 3,5,7,3',4',5' | | | 3,8 | | |
| miricetin | flavanol | 3,5,7,3',4',5' | | + | 3,1 | 72,8 (36) | 68,5 |
| morin | flavanol | 3,5,7,3',4',5' | | + | 2,55 | 96,5 (36) | |
| epikatehin | flavanol | 3,5,7,3',4' | | | 2,5 | | 90,3 |
| katehin | flavanol | 3,5,7,3',4' | | | 2,4 | | 94,1 |
| rutin | flavanol | 5,7,3',4' | 3-rut | + | 2,4 | 90,9 (36) | |
| peonidin | antocijanidin | 3,5,7,4' | 3'-OMe | | 2,2 | | |
| luteolin | flavon | 5,7,3',4' | | + | 2,1 | | 88,1 |
| malvidin | antocijanidin | 3,5,7,4' | 3',5'-di-OMe | | 2,06 | | |
| taksifolin | flavanon | 3,5,7,3',4' | | | 1,9 | 94,8 (36) | 92,4 |
| luteolin-4'-glukozid | flavon | 5,7,3' | 4'-glu | | 1,74 | | |
| naringenin | flavanon | 5,7,4' | | | 1,53 | 6,3 (36) | 6,05 |
| apigenin | flavon | 5,7,4' | | + | 1,45 | 0,7 (36) | |
| krisin | flavon | 5,7 | | + | 1,43 | 1,1 (36) | |
| hesperetin | flavanon | 5,7,3' | 4'-OMe | | 1,37 | 30,0 (36) | |
| kempferol | flavanol | 3,5,7,4' | | + | 1,34 | 93,5 (36) | 93,7 |
| pelargonidin | antocijanidin | 3,5,7,4' | | | 1,3 | | |
| galangin | flavanol | 3,5,7 | | + | 1,22 | 91,8 (36) | |
| hesperidin | flavanon | 3,5,3' | 4'-OMe-7-rut | | 1,08 | | |
| luteolin-3',7'-diglukozid | flavon | 5,4' | 3',7'-di-glu | | 0,79 | | |
| narirutin | flavanon | 5,4' | 7-rut | | 0,76 | | |
| kvercetagetin | flavanol | 3,5,6,7,3',4' | | + | | | 92,48 |
| luteolin-7-O-glukozid | flavon | 5,3',4' | 7-glu | + | | 87,6 (36) | |
| laricitrin | flavanol | 3,5,7,3',4' | 5'-OMe | + | | 84,6 (36) | |
| laricitrin-3'-O-glukozid | flavanol | 3,5,7,4' | 3'-glu-5'-OMe | + | | 83,8 (36) | |
| robinetin | flavanol | 3,7,3',4',5' | | + | | 82,3 (36) | 82,0 |
| fisetin | flavanol | 3,7,3',4' | | + | | 79,0 (36) | |
| kempferol-3,7-O-diramnozid | flavanol | 5,4' | 3,7-di-ram | + | | 70,6 (36) | |
| apigenin 7-O-glukozid | flavon | 5,4' | 7-glu | + | | 34,8 (36) | |
| viteksin | flavon | 5,7,4' | 8-glu | + | | 21,0 (36) | |

Me – metilna grupa, glu – glukoza, ram – ramnoza, rut – rutinoza (glukoza + ramnoza)

tetrametilokroman-2-karboksilna kiselina), ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1 mmol dm⁻³ otopina ispitivanog flavonoida (31, 32). Antiradikalna aktivnost (AR) flavonoida određuje se njihovom sposobnošću reagiranja s određenim radikalima, npr. mjerenjem obezbojenja stabilnog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilnog radikala (DPPH) (33, 34).

Na tablici 1. prikazane su antioksidacijska (AO) i antiradikalna aktivnost (AR) flavonoida ovisno o strukturnim svojstvima.

Metode određivanja antioksidacijske i antiradikalne aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske i antiradikalne aktivnosti flavonoida do sada su razvijene mnoge metode kao što su određivanje sposobnosti hvatanja aktivnih vrsta kisika (28, 37-40), određivanje sposobnosti hvatanja neprirodnih radikala, npr. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilnih radikala (DPPH) i 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonatnih radikal-kationa (ABTS^{•+}) (35) te enzimsko i neenzimsko mjerenje inhibicije lipidne peroksidacije (41, 42). Te su metode uglavnom ograničene na relativnu usporedbu s referentnim spojem.

TEAC-vrijednost

Za neki antioksidans ona predstavlja sposobnost sparivanja slobodnog elektrona plavo-zelenog ABTS radikal-kationa, koji apsorbira u bliskom IR-području na 734, 645 i 815 nm u odnosu na tu sposobnost troloxa. Antioksidansi smanjuju apsorpciju na 734 nm i to se smanjenje iskorištava za određivanje antioksidacijske aktivnosti.

Reakcije s DPPH

Ova metoda daje informaciju o reaktivnosti ispitivanog spoja sa stabilnim slobodnim radikalom. Zbog svog nesparenog elektrona DPPH jako apsorbira u vidljivu dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm. U novije vrijeme umjesto dosta nesigurnog određivanja koncentracije flavonoida pri kojoj se početna koncentracija DPPH smanji na 50 % (EC₅₀/IC₅₀ vrijednost) određuju se konstante brzine i ostali kinetički parametri te reakcije.

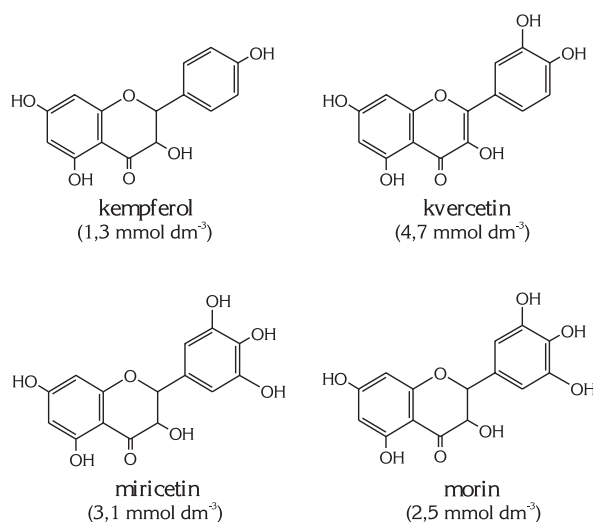
Hidroksilna skupina

Pretpostavlja se da antioksidacijsku aktivnost flavonoida uglavnom određuje raspored supstituenata. Antioksidacijska aktivnost većine polifenolnih

antioksidansa ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina (36, 43).

Na sposobnost hvatanja reaktivnih vrsta kisika i dušika flavonoida najviše utječu hidroksilne skupine prstena B. Doniranjem vodikova atoma i elektrona hidroksilnim i peroksidnim radikalima te ih hidroksilne skupine stabiliziraju, a ujedno nastaje i relativno stabilni flavonoidni radikal. Hvatanje peroksidnih i hidroksilnih radikala kod strukturno homolognih flavona i flavanona povećava se linearno za flavone, odnosno teži zasićenju za flavanone ovisno o ukupnom broju hidroksilnih skupina (43). Povećanju inhibicije peroksidacije lipida pridonosi postojanje hidroksilnih grupa u položajima 3'- i 4'- (kateholna struktura) u prstenu B (41,44). Takav je raspored je osobina najjačih hvatača radikala.

Na slici 5. prikazana je važnost susjedstva dviju hidroksilnih skupina na prstenu B za antioksidacijsku aktivnost. Kvercetin s o-dihidroksilnim rasporedom ima najvišu TEAC-vrijednost, 4,7 mmol dm⁻³, dok je za morin s m-dihidroksilnim rasporedom u prstenu B TEAC-vrijednost 2,5 mmol dm⁻³. Kempferol ima samo jednu hidroksilnu skupinu u B-prstenu i TEAC-vrijednost iznosi 1,3 mmol dm⁻³. To upućuje na to da prsten B sa samo jednom hidroksilnom skupinom nije efikasan donor vodika. Također prisutnost treće hidroksilne skupine na prstenu B, miricetin, ne povećava antioksidacijsku aktivnost. Kada je u strukturi flavonoida prisutan katehol, tada se on oksidira na prstenu B dajući delokalizacijom elektrona stabilizirani o-semikinonski radikal. Flavoni koji nemaju kateholnu ili vic-trihidroksilnu (pirogololnu) strukturu stvaraju relativno nestabilne radikale i slabi su hvatači.



Slika 5 Utjecaj broja i rasporeda hidroksilnih skupina na prstenu B na antioksidacijsku aktivnost

Utjecaj na aktivnost rasporeda hidroksilnih skupina na prstenu A manje je poznat. Ipak, u usporedbi s rasporedom hidroksilnih skupina na prstenu B utjecaj rasporeda pojedinih skupina na prstenu A na antioksidacijsku aktivnost dosta je upitan.

Prsten C pridonosi antioksidacijskoj aktivnosti u nekoliko slučajeva:

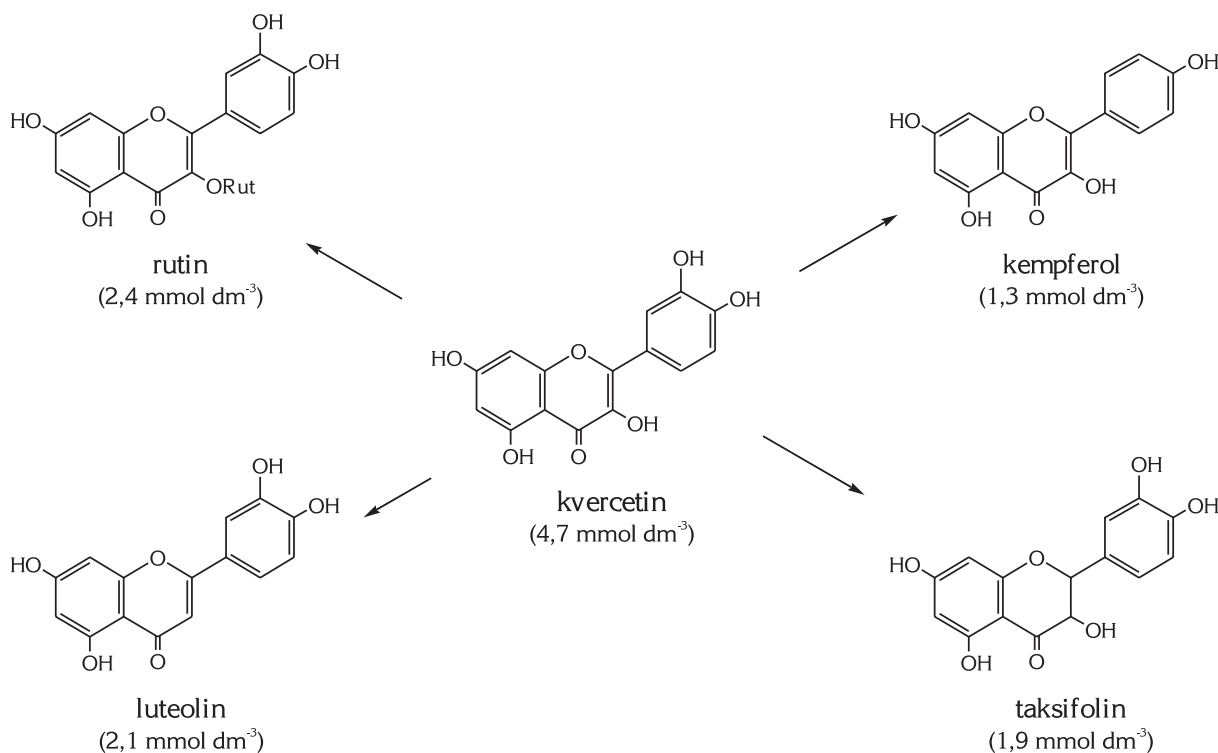
1. prisutnošću slobodne hidroksilne skupine u položaju 3- i
2. omogućivanjem konjugacije između aromatskih prstenova.

Sam prsten C nije presudan za aktivnost flavonoida, npr. čalkoni aktivni su antioksidansi.

Hvatanje slobodnih radikala jako je ovisno o prisutnosti slobodne hidroksilne skupine u položaju 3- (36). Pokazano je da su flavonoidi s hidroksilnom skupinom u položaju 3- i katehol strukturom višestruko jači hvatači peroksintrita nego ebselen, poznati hvatač reaktivnih vrsta dušika (45). Superiornost kvercetina u inhibiciji oksidativnih oštećenja djelomično se pripisuje njegovoj slobodnoj hidroksilnoj skupini u položaju 3- za koju se pretpostavlja da povećava stabilnost flavonoidnog radikala. Torzijski kut prstena B u odnosu na ostali dio molekule jako utječe na sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Flavonoli i flavanoli koji imaju hidroksilnu skupinu u položaju 3- su planarni, a flavoni i flavanoni koji je nemaju

nisu. Planarnost dopušta konjugaciju, delokalizaciju elektrona i povećava stabilnost flavonoidnih fenoksilnih radikala. Uklanjanje hidroksilne skupine s položaja 3- ukida koplanarnost i konjugativnost, a time i sposobnost stabilizacije radikala (46). Uloga hidroksilne skupine u položaju 3- može se vidjeti na slici 6 (35). Glikozidacija flavonoida u usporedbi s odgovarajućim aglikonom snižava njihovu aktivnost. Tako se u rutinu, glikozidiranjem skupine 3-OH i zadržavanjem kateholne strukture TEAC-vrijednost smanjuje na vrijednost $2,4 \text{ mmol dm}^{-3}$, a u luteolinu koji nema skupinu 3-OH čak na $2,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ (35). Maksimum učinka za hvatanje radikala očito zahtijeva hidroksilnu skupinu u položaju 3- na 2,3-dvostrukoj vezi zajedno s 4-keto-skupinom u susjedstvu. Taksifolin (dihidrokvercetin) za razliku od kvercetina nema 2,3-dvostruku vezu što sprječava delokalizaciju elektrona ariloksilnih radikala s prstena B na prsten A i rezultira sniženjem TEAC-vrijednosti na $1,9 \text{ mmol dm}^{-3}$. Ta usporedba kvercetina i luteolina i rutina pokazuje važnost interakcije skupine 3-OH s dvostrukom vezom u prstenu C bez koje dolazi do gubitka antioksidacijske aktivnosti.

U usporedbi s flavonolima kvercetinom, miricetinom i kempferolom flavon luteolin je slab hvatač DPPH-radikala. Pokazano je da metiliranje ili glikozidiranje grupe 3-OH kod kempferola i kvercetina



Slika 6 Utjecaj hidroksilne skupine u položaju 3- na antioksidacijsku aktivnost (35)

uklanja aktivnost protiv oksidacije β -karotenom u linoleinskoj kiselini (36). Eksperimenti peroksidacije lipida daju ograničene informacije o odnosu između strukture i antioksidacijskog mehanizma. Zaštita lipida od oksidativnog oštećenja može biti pripisana:

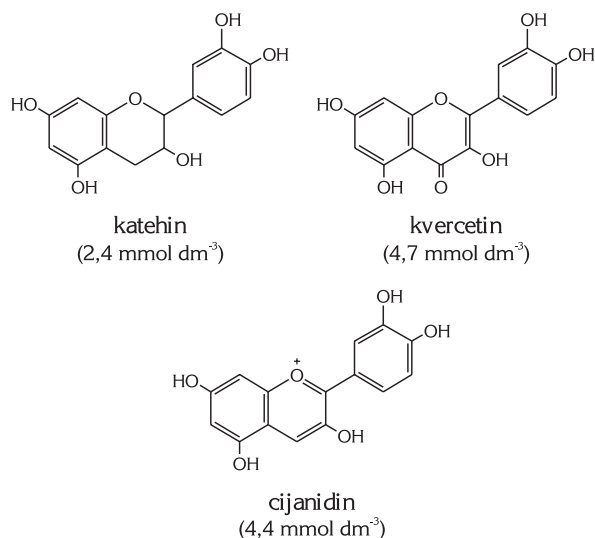
1. hvatanju hidroksilnih, peroksidnih ili sintetiziranih radikala,
2. zaustavljanju lančane reakcije u lipidnoj fazi, uključujući peroksidne radikale i hidroperokside,
3. kelatnom vezanju divalentnih kationa koji iniciraju oksidativne procese *in vitro* i/ili
4. interakciji s drugim inicijatorima, npr. askorbatom.

Usprkos različitosti metoda određivanja aktivnosti, postoji slaganje da hidroksilne skupine daju flavonoidima značajnu sposobnost hvatanja radikala.

2,3-dvostruka veza i 4-keto-skupina

Potvrđeno je da postojanje 2,3-dvostruke veze zajedno s 4-keto-skupinom povećava sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Konjugacija dvostrukih veza između prstena A i B omogućuje rezonancijsku stabilizaciju preko većeg broja aromatskih jezgara, što povećava stabilnost flavonoidnih radikala. Pretpostavka da su flavanoli jači hvatači slobodnih radikala nego flavoni (35, 42) može se pripisati većem broju hidroksilnih skupina i hidroksilnoj skupini u položaju 3-. Premda se u obzir moraju uzeti i drugi strukturni elementi, sposobnost hvatanja slobodnih radikala flavonoidima je povećana kada su prisutna oba elementa.

Slika 7 pokazuje tri flavonoida s jednakim brojem hidroksilnih skupina i njihovim rasporedom, ali razlikom u prstenu C. Kvercetin u prstenu C ima 2,3-



Slika 7 Usporedba strukture i antioksidacijske aktivnosti

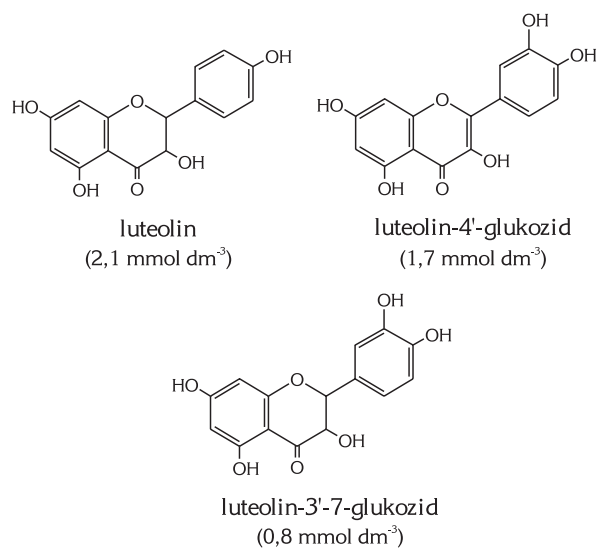
dvostruku vezu i 4-keto-skupinu i pokazuje najvišu TEAC-vrijednost (4,7 mmol dm⁻³), dok katehin sa zasićenim prstenom C ima upola nižu TEAC-vrijednost (2,4 mmol dm⁻³) (1). Cijanidin sa svojim antocijanidinskim prstenom C koji omogućava konjugaciju pokazuje gotovo jednaku TEAC-vrijednost kao i kvercetin. Ovo dokazuje da su postojanje nezasićenosti prstena C i mogućnost delokalizacije elektrona važni za stabilnost radikala.

O-metiliranje

Razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između polihidroksiliranih i polimetoksiliranih flavonoida uglavnom je zbog razlike u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti. Kvercetin je snažni hvatač peroksidnih radikala, a zatim slijede njegovi O-metilirani i O-glikozidirani derivati (44). Smanjenje antioksidacijske aktivnosti O-metiliranjem (36, 39, 44) može se objasniti efektom narušavanja planarnosti. Iako se odnosom metoksilnih i hidroksilnih supstituenata ne može predvidjeti flavonoidna sposobnost hvatanja radikala, prsten B je djelomično osjetljiv na položaje metoksilnih skupina. Steričke smetnje kateholne strukture s 4'-O-metiliranjem značajno smanjuju antioksidacijsku sposobnost (44). Općenito, utjecaj O-metiliranja ovisi o metodi određivanja antioksidacijske aktivnosti, tipu radikala koji se rabi i slučaju kada tvar koja se oksidira ima strukturu lipida jer tada lipofilnost pridonosi ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti.

Glikozidacija

Aglukoni su snažniji antioksidansi od odgovarajućih glikozida (48, 49). Usporedba luteolina (TEAC-

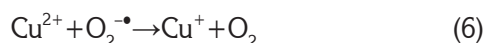
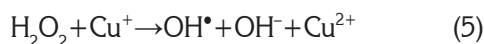


Slika 8 Utjecaj glikozidacije na antioksidacijsku aktivnost

vrijednost 2,1 mmol dm⁻³) s njegovim 4'-mono (TEAC-vrijednost 1,7 mmol dm⁻³ i 3',7-diglukozidom (TEAC-vrijednost 0,8 mmol dm⁻³) pokazuje da se antioksidacijska svojstva flavonskih glikozida smanjuju s porastom broja glikozidnih skupina (slika 8). Osim same prisutnosti i ukupnog broja glikozidnih skupina važnu ulogu ima i položaj u kojem se nalazi pojedina skupina, kao i struktura šećera.

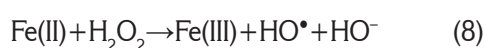
Strukturna svojstva flavonoida vezanih na kovinu

Još jedan način antioksidacijskog djelovanja flavonoida je stvaranje kelatnih kompleksa s ionima kovine, npr. Cu ili Fe. Kelatno vezanje katalitičkog iona kovine može spriječiti njihovo uključivanje u Fentonove reakcije koje mogu generirati visokoreaktivne hidroksilne radikale (reakcije 1 i 2) (24).



Sposobnost polifenola da reagiraju u oksidoredukcijskim reakcijama s ionima kovine čini ih prooksidansima. Npr. *Cao et al.* (43) koristeći se trima različitim oksidacijskim sistemima pokazali su da flavonoidi pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost u odnosu na peroksidni radikal nastao iz 2,2'-azobis(2-amidino-propan)dihidroklorida (AAPH) i u odnosu na hidroksilni radikal, ali su u isto vrijeme bili prooksidansi s Cu²⁺. Flavonoidi mogu reducirati Cu²⁺ u Cu⁺ i time dopuštaju formiranje inicijalnih radikala. Mogući prooksidanski efekt flavonoida može biti važan *in vivo* u slučaju kada su u oksidacijske procese uključeni slobodni ioni prijelaznih kovina. U zdravome ljudskom tijelu ioni kovine se uglavnom javljaju u oblicima nesposobnim da kataliziraju reakcije slobodnih radikala (50). Ako dođe do ozljede, može se osloboditi željezo ili bakar (51) i katalitički ion kovine može biti opazan u aterosklerotskim lezijama (52). Tada se ne može ignorirati djelovanje flavonoida kao prooksidansa.

Preko svojstva kelatnog vezanja prijelaznih kovina (42,53-56) flavonoidi mogu inaktivirati željezov ion kompleksiranjem i na taj način potisnuti superoksidom vođene Fentonove reakcije (reakcije 7 i 8) za koje se vjeruje da su najvažniji put do aktivnih vrsta kisika (53).



Određivanje odnosa struktura-aktivnost pokazuje da su za kelatno vezanje iona kovina važne 4-ketoskupina i skupina 3-OH prstena C (39). Općenito, pretpostavlja se da je kelatiranje Fe²⁺ flavonoidima značajno za njihovu antioksidacijsku aktivnost jer omogućuje hvatanje na određenom položaju ("site-specific scavenging") (57). To znači da će radikali koji se stvaraju u blizini flavonoida koji je okružen s Fe²⁺ biti trenutno uhvaćeni, ako je Fe²⁺ još uvijek katalitički aktivan. U tom slučaju flavonoidi će imati dvostruko, sinergijsko djelovanje, što ih čini vrlo snažnim antioksidansima.

Prooksidacijska aktivnost

Flavonoidi osim vrlo korisne antioksidacijske aktivnosti pokazuju i negativnu prooksidacijsku aktivnost u prisutnosti Cu²⁺. Prooksidacijska aktivnost izazvana ionom Cu²⁺ proporcionalna je ukupnom broju hidroksilnih skupina. Glikozidacija i metiliranje hidroksilnih skupina smanjuju prooksidacijsko svojstvo flavonoida (43). Istraživanja (43,58) pokazuju da strukturna svojstva koja optimiraju antioksidacijsku aktivnost također mogu pogoršati oksidativni stres i oštećenja važnih staničnih molekula. Bors i suradnici (59) pokazali su da važnu ulogu u stabiliziranju flavonoidnih radikala kod prooksidacijskog djelovanja imaju strukturne komponente koje pojačavaju antioksidacijsku aktivnost. Tako u ovom slučaju kateholna struktura u prstenu B, hidroksilna skupina u položaju 3- te konjugacija između prstena A i B smanjuju oksidacijsko djelovanje flavonoida.

Zahvala

Rad je dio istraživanja na projektu 0098032 "Reaktivnost i reakcijski mehanizmi" (voditelj prof. dr. sc. Leo Klasinc) Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. Prof. dr. sc. Leu Klasincu i dr. sc. Vjeri Butković zahvaljujem na savjetima i pomoći u radu.

LITERATURA

1. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995;22:375-83.
2. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging

- efficiencies. *Methods Enzymol* 1990;186:343-55.
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55:481-504.
 - Havsteen B. Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983;32:1141-8.
 - Pathak D, Pathak K, Singla AK. Flavonoids as medicinal agents – Recent advances. *Fitoterapia* 1991;62:371-89.
 - Harborne JB, Baxter H, urednici. *Handbook of natural flavonoids*. Vol 2. Chichester (UK): Wiley & Sons; 1999.
 - Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 1997;416:123-9.
 - Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1603-8.
 - Cos P, Ying L, Calomme M, Hu Jp, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vander-Berghe V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 1998;61:71-6.
 - Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
 - Friedman M, Kazazić S, Kezele N, Klasinc L, McGlynn SP, Pečur S, Pryor WA. Role of nitrogen oxides in ozone toxicity. *Croat Chem Acta* 2000;73:1141-51.
 - Wentworth P Jr., Jones LH, Wentworth AD, Larsen NA, Wilson IA, Xu X, Goddard WA, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science* 2001;293:1806-11.
 - Wentworth P Jr., Wentworth AD, Zhu X, Wilson IA, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Evidence for the production of trioxigen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1490-3.
 - Ranaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
 - Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995;61:549-54.
 - Frankel EN, German JB, Kinsella JE, Parks E, Kanner J. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341:454-7.
 - Tsanova-Savova S, Ribarova F. Free and conjugated myricetin, quercetin, and kaempferol in Bulgarian red wines. *J Food Comp Anal* 2002;15:639-45.
 - Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine. *J Agric Food Chem* 1998;46:361-7.
 - Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 1995;43:890-4.
 - Katalinić V, Maleš P, Konja G. Low molecular weight flavans in wine. *J Wine Res* 1997;8:19-20.
 - Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem* 2004;86:593-600.
 - Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 2001;126:485-93.
 - Bais HP, Walker TS, Kennan AJ, Stermitz FR, Vivanco JM. Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: Flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots. *J Agric Food Chem* 2003;51:897-901.
 - Halliwell B, Aeschbach R, Lölliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995;33:601-17.
 - Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;32:67-103.
 - Kandaswami G, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E. Ascorbic acid enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Drugs* 1993;4:91-6.
 - Cotelle N, Bernier JL, Hénichart JP, Cateau JP, Gaydou E, Wallet JC. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radic Biol Med* 1992;13:211-9.
 - Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994;16:845-50.
 - Heilmann J, Merfort I, Weiss M. Radical scavenger activity of different 3',4'-dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence. *Planta Med* 1995;61:435-8.
 - Montensinos MC, Ubeda A, Terencio MC, Payá M, Alcaraz MJ. Antioxidant profile of mono- and dihydroxylated flavone derivatives in free radical generating systems. *Z Naturforsch* 1995;50c:552-60.
 - Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-12.

32. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 1994;234: 279-83.
33. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002;27:183-98.
34. Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 2002;8:121-37.
35. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-56.
36. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 2001;49: 2774-9.
37. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc* 1994;116:4846-51.
38. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988;37: 837-41.
39. Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1355-63.
40. Bors W, Michel C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1413-26.
41. Mora A, Payá M, Ríos JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990;40:793-7.
42. van Acker SABE, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:331-42.
43. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997;22:749-60.
44. Dugas AJ Jr., Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 2000;63:327-31.
45. Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:591-3.
46. van Acker SABE, de Groot MJ, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Donné-Op den Kelder G, van der Vijgh, Bast A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1305-12.
47. Lien EJ, Ren S, Bui H-H, Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:285-94.
48. Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 1988;39:69-79.
49. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:643-50.
50. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990;280: 1-8.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
52. Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* 1992;286:901-5.
53. Afanas'ev IB, Dcrozko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989;38: 1763-9.
54. Morel I, Lescoat G, Cognel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 1993;45:13-9.
55. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives : Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-81.
56. Thompson M, Williams CR. Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal Chim Acta* 1976;85:375-81.
57. Haenen GRMM, Jansen FP, Bast A. The antioxidant properties of five O-(β -Hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture Venoruton. *Phlebology* 1993;8 supl 1:10-7.
58. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitrosyl anion. *Free Radic Biol Med* 1998;25: 1057-65.
59. Bors W, Michel C, Schikora S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 1995;19:45-52.

Summary

ANTIOXIDATIVE AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF FLAVONOIDS

Flavonoids are a major group of phenolic compounds which are important in flavouring and colouring of many fruits and vegetables and derived products such as wine, tea preparations and chocolate. Recently, flavonoids are given much attention due to their excellent antioxidative and antiradical activity. Studies have revealed that flavonoids are good scavengers of free radicals, and consequently, they are much used in pharmaceutical and food industries. Flavonoids also have a gamut of other biochemical activities; some have been found to possess significant anti-cardiovascular disease, anti-inflammatory, anti-allergic, anti-mutagenic, antiviral, anti-tumour and activities.

KEY WORDS: *free radicals, metal ions, oxidative stress, reactions with DPPH, TEAC value*

REQUESTS FOR REPRINTS:

Snježana P. Kazazić
Institut "Ruđer Bošković"
Bijenička cesta 54, HR-10002 Zagreb
E-mail: snjezana@joker.irb.hr