

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ana Matijašević

Polifenolni profil i bioaktivnost spojeva u crnoj bazgi, *Sambucus nigra* L.

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredni voditelj: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2019.

Sažetak

Antioksidansi su spojevi koji svojim djelovanjem povoljno utječu na obranu organizma od bolesti. Iz tog razloga konzumacija antioksidansa dovodi do poboljšanja općeg stanja organizma. Crna bazga (*Sambucus nigra* L.) je biljka bogata antioksidansima koji primarno štite biljku od destruktivnog djelovanja mikroorganizama, ali i od ostalih štetnih djelovanja. Crna bazga je u svijetu široko rasprostranjena biljka. Za njezina antioksidacijska svojstva odgovorna je prisutnost polifenolnih spojeva, točnije flavonoida. Flavonoidi su heterociklički spojevi s više aromatskih jezgara, organizirani su u sedam podskupina, od kojih se uz crnu bazgu vežu antocijanini i flavonoli. Cilj ovog završnog rada je analizirati polifenolni sastav crne bazge, te proučiti njihovu biološku aktivnost. Ovakvom analizom dobiti će se stvarna slika crne bazge kao ljekovite biljke.

Ključne riječi: crna bazga, antioksidacijsko djelovanje, kvercetin, polifenoli

Abstract

Antioxidants are compounds that have a beneficial effect on the body's defence against diseases. Therefore, in order to improve general health, it is necessary to implement food rich with antioxidants in everyday diet. Black elderberry (*Sambucus nigra* L.) is a plant rich in antioxidants whose primary role is to protect the plant from destructive effects of microorganisms, and also against other harmful effects. Black elderberry is generally a largely widespread plant. The presence of polyphenolic compounds, specifically flavonoids, is the main contributing factor for its antioxidant properties. Flavonoids are heterocyclic compounds with multiple aromatic nuclei and are organized into seven subgroups, of which anthocyanins and flavonols can be found in black elderberry. The aim of this bachelor's thesis is to analyse the polyphenolic profile of black elderberry, and the biological activity of present compounds. Through such analysis we can obtain an actual image of black elderberry as a medicinal plant.

Keywords: black elderberry, antioxidant activity, quercetin, polyphenols

Sadržaj

1. UVOD	1
2. SISTEMATSKI POLOŽAJ I MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE CRNE BAZGE, <i>Sambucus nigra</i> L.....	2
2.1. Rasprostranjenost crne bazge.....	3
3. POLIFENOLI.....	4
3.1. Podjela polifenolnih spojeva.....	5
3.1.1. Polifenolne kiseline	5
3.1.2. Flavonoidi.....	5
3.1.3. Stilbeni	7
4. POLIFENOLNI PROFIL CRNE BAZGE, <i>Sambucus nigra</i> L.....	8
4.1. Antocijanini	9
4.2. Flavonoli	10
5. BIOSINTEZA FLAVONOIDA	11
6. BIOAKTIVNOST FLAVONOIDA	13
6.1. Nastajanje slobodnih radikala	13
6.2. Antioksidacijsko djelovanje flavonoida.....	14
6.2.1. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja prekidanjem lančanih reakcija slobodnih radikala	15
6.2.2. Antioksidacijsko djelovanje flavonoida posrednim putem	16
7. BIOAKTIVNOST SPOJEVA IZ BAZGE	18
7.1. Bioaktivnost kvercetina	18
7.2. Bioaktivnost antocijanina	20
8. ZAKLJUČAK.....	23
9. LITERATURA	24

1. UVOD

Crna bazga (*Sambucus nigra* L.) jedan je od najpoznatijih samoniklih listopadnih grmova Hrvatske. Vjekovima je poznata po svojim blagotvornim svojstvima, te se od nje prave raznovrsni pripravci diljem „lijepe naše“. Raste kako na poljima i oranicama, tako i u šumama, a može ju se pronaći i uz putove ruralnih područja. Najpoznatiji tradicionalni pripravak je sok kojem se dodaje šećer i limun. Na tom pripravku odrastale su brojne generacije Europljana, pa nije čudno što se u literaturi za crnu bazgu upotrebljava termin europska bazga [1].

U narodu je poznata činjenica da je europska bazga vrlo ljekovita biljka. Generacijama se konzumira sirup od bazge za koji se vjeruje da, između ostalog, potiče probavu. Za blagotvorna svojstva crne bazge odgovorni su flavonoidi, spojevi koji su u značajnim količinama prisutni u bobicama crne bazge. U ovom završnom radu uz pomoć internetske stranice Phenol-Explorer proučen je polifenolni profil ove biljke, čime je utvrđena prisutnost brojnih flavonoida, primjerice antocijanina i flavonola [2, 3].

Brojna istraživanja su pokazala kako antocijanini i flavonoli mogu stabilizirati slobodne radikale. Slobodni radikali su vrlo reaktivni spojevi koji sadrže slobodni nespareni elektron sklon stupanju u lančane reakcije s brojnim spojevima prisutnima i u ljudskom organizmu. Stoga slobodni radikali destruktivno djeluju na organizam te mogu izazvati pretjeranu apoptozu stanica (programirana smrt stanice), kao i druga patološka stanja, pa čak i pojavu karcinoma. Brojna istraživanja pokazala su da upravo flavonoidi reagiraju sa slobodnim radikalima, te ih onesposobljavaju za daljnje uništavanje organizma. Dakle, flavonidi su bioaktivne molekule koje učinkovito smanjuju koncentraciju slobodnih radikala u tijelu. Njihova bioaktivnost podrazumijeva između ostalih antineoplastično djelovanje i antioksidacijsko djelovanje [2].

2. SISTEMATSKI POLOŽAJ I MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE CRNE BAZGE, *Sambucus nigra* L.

Sambucus nigra L. poznatija kao crna bazga (u narodu je poznata i kao zova) je nisko stablo klasificirano u carstvu biljaka u red *Dipsacales* i u porodicu *Adoxaceae* (moškovičevke ili kozokrvinke) [1, 4].

U literaturi se opisuje kao listopadni grm koji može narasti i do 10 metara visine tvoreći rijetku i zaobljenu krošnju. Kora ima ispucali izvanjski izgled s bijelom srži. Pupovi crne bazge su duguljasti, nasuprotni i imaju gole ljuske crveno-smeđe ili zeleno-smeđe boje. Listovi su također nasuprotni i sastoje se od dva do tri para eliptičnih liski s ušiljenim vrhom i pilastim rubom. Lice listova je tamnozeleno, dok je naličje svjetlije i ima dlačice na površini (slika 1.). Glavna karakteristika ove biljke su sitni, pravilno raspoređeni cvjetovi ugodnog mirisa koji imaju peterozrakasti cvat. Sami cvjetovi su dvospolni, posebni po svojem dvostrukom ocvijeću, a svaki vjenčić sadrži po pet bijelih ili svijetlo žutih latica. Plodovi ove ljekovite biljke su male koštunjicave bobice koje svojim zrenjem mijenjaju boju u tamnoljubičastu, dok stabljika poprima crvenu boju. Unutar koštunice ploda mogu se uočiti tri zasebna pretinca, a svaki pretinac sadrži sivo-žutu, jajoliku, plosnatu sjemenku [1, 4].



Slika 1. Crna bazga, *Sambucus nigra* L. [4].

Sirovi plodovi crne bazge nisu jestivi, ali termičkom obradom se mogu konzumirati u obliku džema, pekmeza ili soka. Također široko je raširena upotreba bobica crne bazge kao i cvjetova za pripremu domaćeg soka uz dodatak šećera i limuna. U alternativnoj medicini takav sok može se koristiti kao sredstvo za poticanje probave, a poznat je i blagotvoran

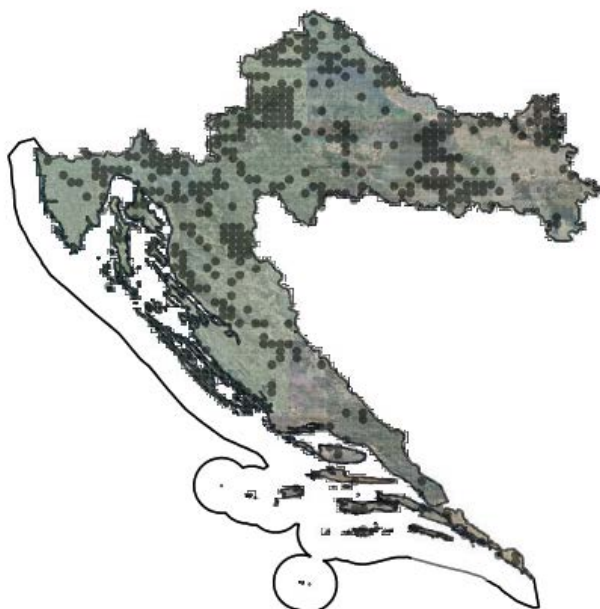
učinak kod bolnog grla (u obliku sirupa). Vrlo zanimljiva primjena soka od bobica crne bazge je i intenziviranje boje vina [1].

Listovi crne bazge su otrovni. U listovima ovog samoniklog grma nalazi se glikozid sambunigrin, čijim metabolizmom u organizmu nastaje cijanidna kiselina. Sambunigrin može biti prisutan i u nezrelim plodovima bazge, a još jedan produkt razgradnje ovog spoja je cijanovodik. Ukoliko se konzumiraju nezreli ili neadekvatno obrađeni plodovi crne bazge, može doći do pojave simptoma kao što su mučnina, povraćanje i proljev, a svi su posljedica metabolizma sambunigrina [1].

2.1. Rasprostranjenost crne bazge

Crna bazga kao samonikla biljka karakteristična je za područje sjeverne zemljine hemisfere, te se može pronaći u cijeloj Europi (u literaturi je vrlo čest termin *europska bazga*), istočnoj Americi i zapadnoj Aziji [4].

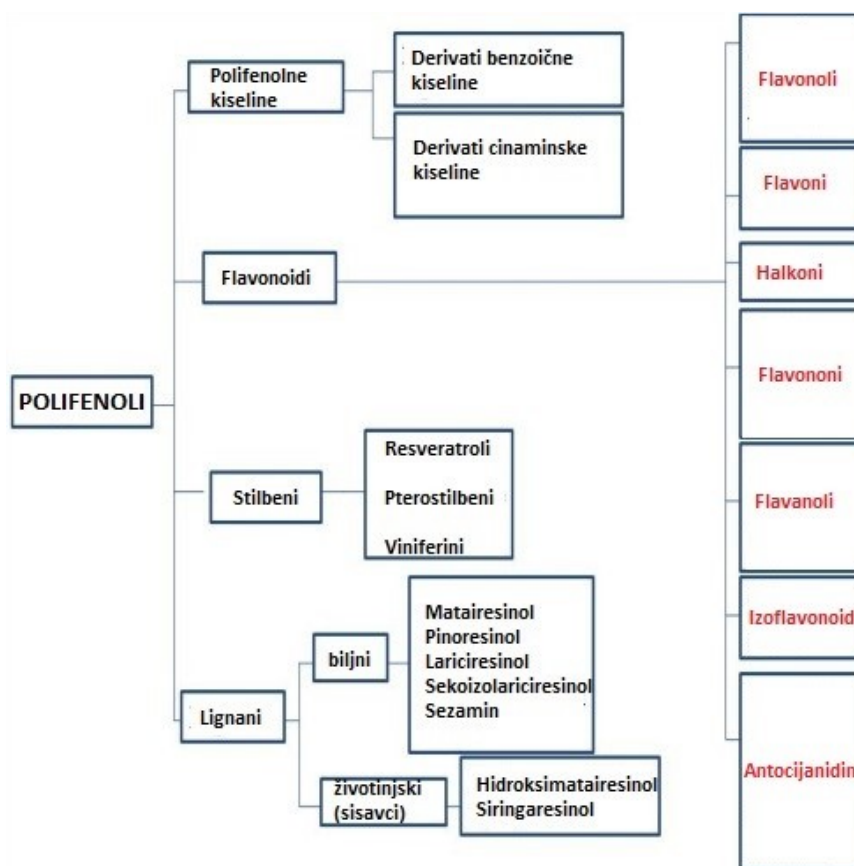
Ova samonikla biljka široko je rasprostranjena i na području Republike Hrvatske. Njezino stanište je izrazito širokopojasno i proteže se do 1200 m nadmorske visine (slika 2.) [1]. Odgovara joj humusno tlo bogato dušikom, pa iz tog razloga svoje stanište pronalazi na obalama rijeka i potoka, u svijetlim šumama, po poljima, ali jednako tako i uz kuće i u obraslim prostranstvima [1, 4].



Slika 2. Rasprostranjenost crne bazge u Republici Hrvatskoj [5]. Crne točkice predstavljaju staništa na kojima je nađena ova biljka.

3. POLIFENOLI

Termin polifenolno zajednički je naziv za spojeve koji u svojoj strukturi sadrže aromatske prstene. Radi se najčešće o oksigeniranim heterocikličkim spojevima (flavonoidi). Navedeni spojevi ubrajaju se u skupinu tzv. sekundarnih metabolita [6], a to su prema definiciji kemijski spojevi nastali sekundarnim metabolizmom koji nisu izravno uključeni u rast, razvoj i razmnožavanje živih organizama [7]. Sekundarni metaboliti imaju različite uloge od kojih je važno naglasiti da sudjeluju u zaštiti od ultraljubičastog zračenja (UV-zračenja) [6]. Osim toga, brojni sekundarni metaboliti nalaze se u sastavu antibiotika i pigmenata [7]. Polifenolni spojevi su najraširenija skupina antioksidansa. Neke od najčešćih namirnica bogatih polifenolima su primjerice voće i povrće, biljni i voćni sokovi, čaj, kava, pivo, čokolada, te crno vino. Tako širok spektar različitih izvora polifenola rezultira obilnim unosom ove vrste antioksidansa. Procjenjuje se da se prosječnom prehranom baziranom na voću i povrću u organizam unese oko jedan gram polifenolnih spojeva dnevno [6, 8].



Slika 3. Shematski prikaz podijele polifenolnih spojeva [6].

3.1. Podjela polifenolnih spojeva

Polifenoli su raspoređeni u četiri osnovne skupine spojeva: polifenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani, što je shematski prikazano na slici 3. U radu su detaljnije opisane polifenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni, budući da se spojevi iz ovih skupina polifenola mogu naći u crnoj bazgi. Struka navedenih skupina polifenolnih spojeva prikazana je na slici 5.

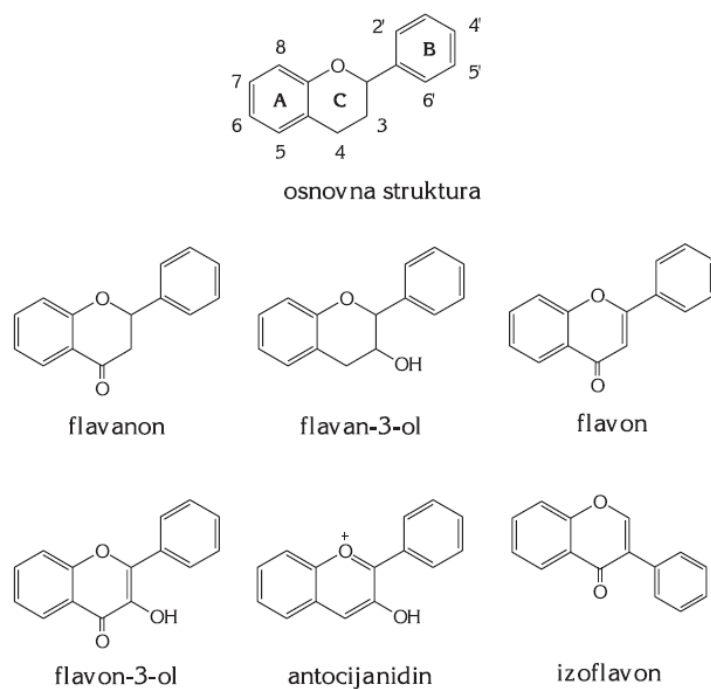
3.1.1. Polifenolne kiseline

Polifenolne kiseline se dijele na derivate benzojeve i cinaminske kiseline. Primjer derivata benzojeve kiseline je galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzoična kiselina) [6]. Galna kiselina je vrlo često aktivni sastojak adstringensa [9], odnosno sredstava koja mogu izazvati koagulaciju bjelančevina i vazokonstrikciju, a primjenjuje se primjerice za liječenje manjih rana i upala sluznice [8]. Adstringensi se mogu koristiti i za njegu masne kože lica jer na kožu djeluju tako da sužavaju pore, a samim time otklanjaju višak izlučenog sebuma čime se koža isušuje. Uz to, adstringensi imaju i antiseptičko djelovanje, zbog čega imaju veći postotak alkohola od klasičnih tonera i drugih „čistača za lice“ [8, 9].

Primjeri derivata cinaminske kiseline su kavena i kumarinska kiselina [6]. Kao i galna kiselina, kavena kiselina ima antioskidacijsko i antineoplastično djelovanje. Antineoplastično djelovanje odnosi se na sprječavanje proliferacije tumorskih stanica u tijelu, čime kavena kiselina može pomoći u borbi protiv raznih vrsta karcinoma. U konačnici, kavena kiselina može poslužiti kao odličan antiseptik, a djeluje i protuupalno [2, 8].

3.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su spojevima najbrojnija skupina polifenola. Osnovna struktura koja povezuje sve flavonoide je spoj 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol. To je spoj molekulske formule $C_6C_3C_6$, poznatiji je pod kraćim imenom difenilpropan. Kratkim nizom reakcija iz difenolpropana nastaje flavan iz kojeg nastaju daljnje skupine flavonoida prikazane na slici 4 [2].



Slika 4. Sažeta strukturalna podjela flavonoida [2].

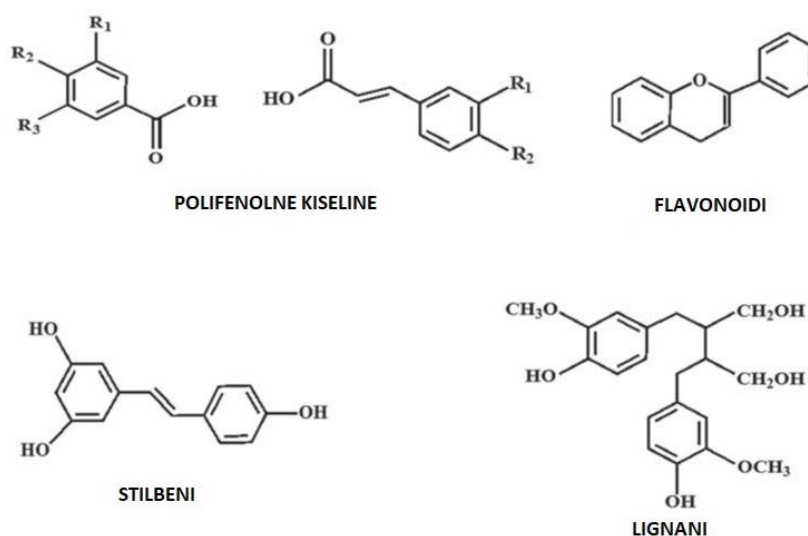
U literaturi se mogu naći različite podjele flavonoida, međutim jedna od najzastupljenijih je podjela na slijedeće podskupine: flavonoli (flavon-3-oli), flavanoni, čalkoni, flavononi, flavanoli (flavan-3-oli), izoflavonoidi, te antocijanini. U ovom radu bit će detaljnije opisane dvije podskupine flavonoida – flavonoli i antocijanini [2].

Do danas je otkriveno oko 6400 flavonoidnih spojeva. Kao što je ranije navedeno, flavonoidi su po sastavu heterociklički spojevi koji najčešće imaju dvije aromatske jezgre povezane preko tri ugljikova atoma. Mnogobrojne biljke bogate su flavonoidima koji su prisutni u gotovo svim dijelovima biljke, poglavito u sjemenkama i kori voća. Ovi spojevi odgovorni su i za neka od ljekovitih djelovanja biljaka, koja se temelje na antioksidacijskom i antiradikalnom djelovanju flavonoida, odnosno na sposobnosti ovih spojeva da hvataju slobodne radikale [2].

S druge strane, prisutnost flavonoida također je od izrazite važnosti i za samu biljku. Spomenuto djelovanje flavonoida na slobodne radikale uz djelovanje protiv mikroorganizama pridonose dugovječnosti biljke. Flavonoidi također sprječavaju štetno djelovanje UV-zračenja, a u literaturi se spominje i fotoreceptorsko djelovanje. Flavonoidi reguliraju brojne životne funkcije biljke, a prehranom utemeljenom na biljkama u čovjekov organizam unose se brojni flavonoidi s blagotvornim djelovanjem na zdravlje [2].

3.1.3. Stilbeni

Stilbeni su derivati 1,2-difeniletena [10], a sastoje se od dvije fenilne jedinice povezane metilenskim mostom [11]. U biljkama se stilbeni stvaraju i oslobađaju u slučaju infekcije ili ozljede kao antifungalno sredstvo. Najpoznatiji stilben je 3,4',5-trihidroksistilben, poznat pod nazivom rezervatol. Navedeni spoj se u najvećem postotku nalazi u crvenom grožđu, te u krajnjem produktu obrade grožđa, tj. u crvenom vinu. Zbog vrlo malih količina stilbena prisutnih u ljudskom tijelu, koji se javljaju kao posljedica metabolizma hrane bogate stilbenima, blagotvoran učinak na ljudski organizam malo je vjerojatan [12, 13].



Slika 5. Strukture glavnih skupina polifenolnih spojeva [14].

Većina stilbena i njihovih derivata su anaboličke tvari. Najvažniji derivat stilbena je tzv. dietilstilbesterol (DES) koji se prema svojem anaboličkom djelovanju ubraja u skupinu tzv. sintetskih estrogenih tvari. Sintetiziran je 1938. godine, te je u periodu od četrdesetih do sedamdesetih godina prošlog stoljeća bio najpoznatiji i najčešće korišteni anabolik [15]. Estrogeni su hormoni koji djeluju na više vrsta tkiva, čime postižu regulaciju raznih funkcija. Imaju ujedno i pozitivan i negativan utjecaj na organizam. Direktna uloga estrogenih hormona koji sinergično rade s progesteronskim hormonima je regulacija spolnih funkcija kod žena [16]. Poznata je medicinska primjena DES-a u svrhu smanjenja komplikacija za vrijeme trudnoće. Kasnije je otkriveno da DES između ostalog potiče nastajanje i rast rijetkog vaginalnog tumora, pa je 1981. godine uvedena zabrana upotrebe prema Council Directive 81/602/EC [15].

4. POLIFENOLNI PROFIL CRNE BAZGE, *Sambucus nigra* L.

Sadržaj polifenolnih spojeva prisutnih u crnoj bazgi (tablica 1.) istražili smo uz pomoć internetske stranice *Phenol-Explorer 3.6*. Radi se o najtočnijoj i najobuhvatnijoj bazi podataka o sadržaju polifenolnih spojeva u hrani. Izvor podataka u bazi *Phenol-Explorer 3.6* je 236 znanstvenih publikacija i 221 znanstveno istraživanje. Baza sadrži podatke za oko 500 polifenolnih spojeva dobivenih analizom 400 različitih prehrambenih izvora. Baza podataka svojim jednostavnim sučeljem nudi brzo i lako analiziranje sadržaja polifenola prisutnih u određenim namirnicama, biljkama i ostalim prehrambenim izvorima. Stranica se može slobodno koristiti u svrhu promicanja znanosti u obliku seminarskih radova, završnih radova, znanstvenih istraživanja i slično [3].

Tablica 1. Polifenolni profil crne bazge, *Sambucus nigra* L. [3].

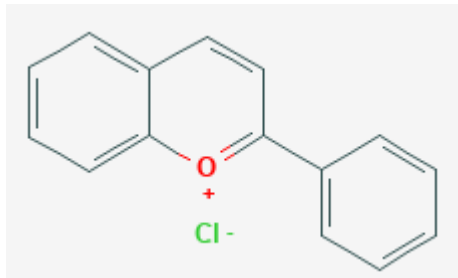
Crna bazga, <i>Sambucus nigra</i> L.		
<u>FLAVONOIDI</u>		masa u 100 grama uzorka
antocijanini	cijanidin 3,5-O-diglukozid	17,46 mg
	cijanidin 3-O-glukozid	794,13 mg
	cijanidin 3-O-rutinozid	5,83 mg
	cijanidin 3-O-sambubiozid	462,96 mg
	cijanidin 3-O-sambubiozid-5-O-glikozid	34,48 mg
	pelargonidin 3-O-glukozid	1,80 mg
favonoli	kvercetin	42,00 mg

Za analizu uzorka crne bazge korištene su tri metode: klasična kromatografska analiza, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC), te indirektna analiza primjenom Folin-Ciocalteu (folinov reagens) [3].

U tablici 1. prikazani su rezultati analize sadržaja pojedinih vrsta polifenolnih spojeva u 100 g uzorka crne bazge. Rezultati klasične kromatografije pokazuju da je u 100 g uzorka prisutno 1,315 g (0,013%) antocijanina i 0,042 g flavonola. Točniji ukupni sadržaj polifenola u uzorku dobiven je uz pomoć folinova reagensa. Ta metoda pokazuje da u 100 g uzorka na polifenolne spojeve odnosi se 1,950 g što je 0,0195%. Rezultati HPLC-a dokazali su prisutnost još nekih flavonola u gotovo neznatnim količinama, uglavnom antocijanina i proantocijanina [3].

4.1. Antocijanini

Antocijanini su biljni pigmenti osjetljivi na promjenu pH vrijednosti, zbog čega se vrlo često koriste kao pH-indikatori, a sadrže aglikonsku ili antocijanidinsku podjedinicu za koju je vezan šećer [17]. Antocijanini su derivati 2-fenilbenzopirila čija je struktura prikazana na slici 6. 2-fenilbenzopiril često je zastupljen u obliku kloridne soli [12], a strukturno se sastoji od dva benzenska prstena premoštena heterocikličkim C-atomom [17]. Dakle, antocijanini su derivati antocijanidina.



Slika 6. Struktura 2-fenilbenzopirila [18].

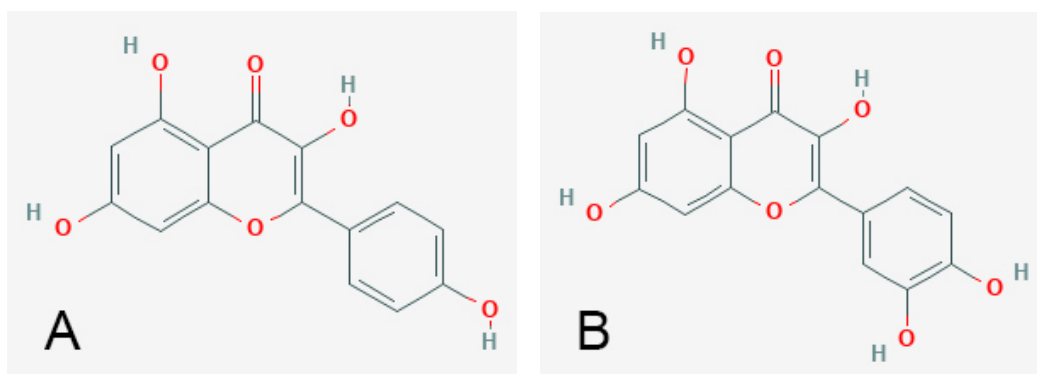
Do sada je potvrđeno oko 17 različitih antocijanidina. Neki od najpoznatijih antocijanidina su cijanidin, delphinidin i pelargonin. Kako bi se sintetizirao antocijanin obično se na antocijanidin dodaje šećerna komponenta ili više istih, te na taj način nastaju monosaharidi, disaharidi ili trisaharidi. Neke od najčešćih šećernih komponenata su glukoza i galaktoza, ali se u sastavu antocijanidina mogu pronaći i ramnoza i arabinoza [2, 14].

4.2. Flavonoli

Flavonoli su, uz flavone i izoflavone, podskupina flavonoida najčešće zastupljena u ljudskoj prehrani. Kao i većina flavonoida odgovorni su za boju, a dijelom i za okus hrane. Kao i većina drugih flavonoida imaju sposobnost antioksidacijskog djelovanja na slobodne radikale [6]. Svaki flavonol sastoji se od prstena na koji je vezana 3-hidroksipiridin-4-onska skupina [14].

Najvažniji flavonoli su kvercetin i mircetin, a ujedno su ta dva predstavnika ove skupine i najčešći polifenolni spojevi [2]. Kvercetin (slika 7.) je flavonol poznat po antioksidacijskom djelovanju koje će detaljnije biti objašnjeno u poglavlju koje uključuje bioaktivnost. Također mu se pripisuje i antineoplastično djelovanje, zbog čega je kvercetin česta komponenta citostatika [13].

Jedan od zanimljivijih flavonola je i kempferol (slika 7.). Radi se o tetrahidroksiflavonu koji je također vrlo poznat antioksidans, ali osim toga je i inhibitor enzima protein-kinaze koji je odgovoran za kataliziranje prijenosa fosfatne skupine sa adenzin-3-fosfata na protein.



Slika 7. Struktura kempferola (A) i kvercetina (B) [8].

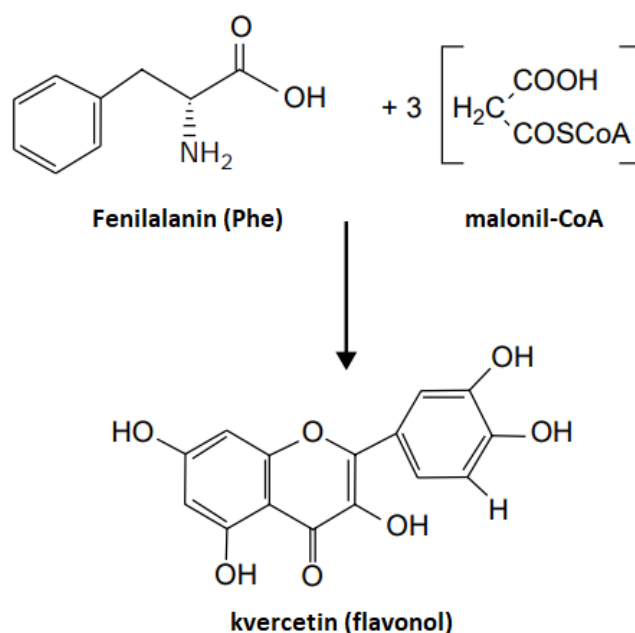
5. BIOSINTEZA FLAVONOIDA

Biosinteza svih vrsta flavonoida kreće iz dvije osnovne strukture, 4-kumaril-CoA i malonil-CoA (koenzim A – CoA), te uz prisutnost dva različita enzima čaklon-reduktaza i čaklon-sintetaza [2].

Biosinteza antocijanina kreće uvodnom reakcijom između 4-kumaril-CoA i malonil-CoA potpomognutom enzimom čaklon-sintetaza, a kao produkt nastaje čaklon. Iz čaklona daljnjom enzimski posredovanom izomerizacijom nastaje naringerin, koji je zapravo predstavnik flavanona. Djelovanjem flavon-sintetaze na taj spoj nastaju flavoni [2].

Iz naringerina posredstvom flavon-3-hidroksilaze nastaje dihidrokempferol. Taj se spoj prestrukturira uzajamnim djelovanjem dva enzima pri čemu nastaje dihidromircetin ili dihidrokvercetin ovisno o alkilnim skupinama. Ta dva spoja su derivati flavonola, a djelovanjem enzima flavonol-sintetaze mogu tvoriti i druge flavonole [2].

Postoji i drugi put biosinteze flavonola koji je vezan za direktnu reakciju određene aminokiseline, odabrane na temelju očekivanog produkta, te tri molekule malonil-CoA. Na slici 8. prikazana je biosinteza flavonola na primjeru kvercetina, koji je zastupljen u polifenolnom profilu crne bazge. Kvercetin je u ovom slučaju produkt reakcije aromatske aminokiseline fenilalanina i tri molekule malonil-CoA. Dakle, za biosintezu flavonoida općenito od iznimne je važnosti prisustvo malonil-CoA [19].



Slika 8. Biosinteza kvercetina iz fenilalanina i malonil-CoA [19].

Malonil-CoA je bitan faktor u regulaciji biosinteze masnih kiselina točnije enzima koji katalizira nastajanje istog iz acetil-CoA u prisutnosti adenzinotrifosfata (ATP-a). Riječ je o biotinskom enzimu (biotin je vezan za lizinski aminokiselinski ostatak), a naziva se acetil-CoA-karboksilaza. Takva regulacija poznatija je kao regulacija povratnom spregom u kojoj se inhibira enzim koji katalizira prvu u nizu reakcija. Regulacija je direktno povezana i s količinom ATP-a, odnosno količinom energije jer se cijepanjem navedenog trifosfatnog spoja oslobađa energija koja usmjerava reakciju [20].

Iz flavonola se dalje sintetiziraju leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli). Leukoantocijanidin-diokisigenazom iz leukoantocijanidina nastaju kationi 3-hidroksi-antocijanidina koji imaju tendenciju izomerizacije što rezultira nastajanjem antocijanina. Ovu izomerizaciju pospješuju i čine mogućom tri vrste mutaza, te se ista provodi u tri zasebna koraka i preko tri međuprodukta [2].

Većina međuprodukata biosinteze flavonoida izomeriziraju, a priroda flavonida kao skupine je takva da se vrlo lako polimeriziraju. Primjerice, u određenim uvjetima međuprodukt naringerin može izomerizirati u eriodiktiol koji daljnjim enzimskim reakcijama dovodi do nastanka flavan-4-ola [2].

6. BIOAKTIVNOST FLAVONOIDA

Bioaktivni spojevi poput flavonoida su spojevi koji blagonaklono utječu na zdravlje organizma umanjujući rizik od bolesti srca, raka, te drugih bolesti. Antioksidacijski kapacitet voća i povrća povezan je s time u kojoj mjeri sadrže antocijanin, fenolne spojeve, karotenoid, askorbinske kiseline i vitamin E. Velika koncentracija slobodnih radikala najčešće rezultira nastankom tzv. oksidativnog stresa koji uzrokuje smanjene aktivnosti obrambenog sustava životinjskog i biljnog organizma. Samim time, prisutnost određenih spojeva (osobito u suvišku) može izravno utjecati na sposobnost obrane organizma od uzročnika bolesti, te može dovesti do pojave stanja kao što su tumor i karcinom [2].

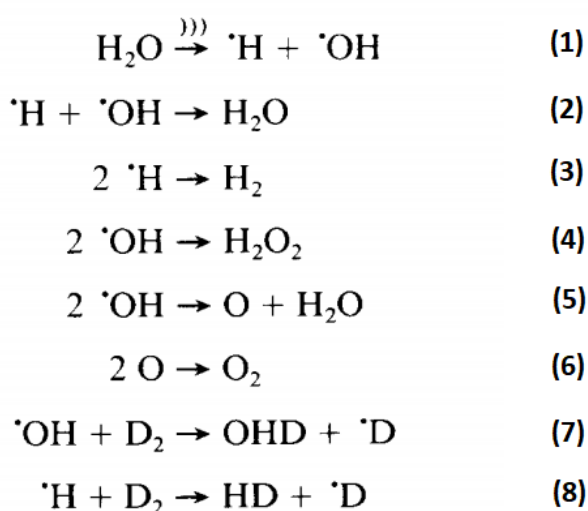
U ljudskoj prehrani flavonoide nalazimo u podgrupama: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijani. Zbog svog antioksidacijskog djelovanja, pojedinačno ili u kombinaciji flavonoidi su se pokazali korisnim u prevenciji koronarne bolesti srca, imaju hepatoprotektivnu, protuupalnu i antikancerogenu aktivnost, dok neki pokazuju potencijalno antivirusno djelovanje. U biljnim sustavima flavonoidi pomažu u borbi protiv oksidativnog stresa i djeluju kao regulatori rasta. U farmaceutske svrhe razvija se ekonomična masovna proizvodnja različitih vrsta flavonoida uz pomoć mikrobne biotehnologije [21].

6.1. Nastajanje slobodnih radikala

Neki od u organizmu najčešćih slobodnih radikala su superoksid radikal-anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), hidropersidni radikal (HO_2^{\bullet}) i lipidni persidni radikal (LO_2^{\bullet}) [22]. Postoje i brojne druge vrste visoko reaktivnih čestica, kao što su okolišni i endogeni ozon, ali mehanizmi djelovanja tih tvari nisu još u potpunosti razjašnjeni. Povećana koncentracija slobodnih radikala dovodi do ubrzane apoptoze koja se može manifestirati na razne načine. Najčešće uzrokuje kardiovaskularne bolesti koje su povezane s povišenom razinom LDL kolesterola (lipoprotein niske gustoće), ali može biti i uzrok astme, razvoja karcinoma, upalnih procesa, te drugih patoloških stanja [2].

Na slici 9. prikazan je primjer reakcija koje dovode do nastanka slobodnih radikala. Radi se o mehanizmu sonolize pri 300 kHz u vodenoj otopini deuterija (D_2). Inicijalna reakcija označena na slici 9. pod (1) je raspadanje molekule vode na hidroksidni i vodikov radikal. Ta reakcija je fotolitički katalizirana, dakle ključni čimbenik inicijalne reakcije je izvor fotona (svjetlosti). U nastavku, reakcije od (2) do (5) prikazuju ciklus regeneracije molekule

vode, preko međuprodukta vodikova peroksida. Zadnja dva koraka, koraci (7) i (8), predstavljaju „neutralizaciju“ odnosno smanjivanje reaktivnosti vodikovog i peroksidnog radikala u prisustvu plinovitog D₂ pri čemu nastaje OHD i HD kompleks uz oslobađanje po jednog radikala D₂ po reakciji koji su manje reaktivni od inicijalno prisutnih hidroksidnih i vodikovih radikala. Dakle, u odsutnosti D₂ dolazi do ponovnog spajanja hidroksidnog i vodikovog radikala u vodu. Stoga je D₂ u ovom slučaju antioksidans koji sprječava štetno djelovanje hidroksidnog i vodikova radikala [15]. Slobodni radikali se mogu stabilizirati stvaranjem intramolekulskih vodikovih veza (ovisno o strukturi radikala), delokalizacijom elektrona ili reakcijom s drugim slobodnim radikalom, primjerice s gore navedenim lipidnim radikalima [2].



Slika 9. Kaskada nastajanja slobodnih radikala u vodenoj otopini [22].

6.2. Antioksidacijsko djelovanje flavonoida

Antioksidacijska aktivnost flavonoida može se temeljiti na „hvataju“ slobodnih radikala, čime se radikali inaktiviraju. Također, jedan od mogućih načina antioksidacijskog djelovanja flavonoida je i stvaranje kompleksa s prijelaznim elementima (Mn²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, ...). Nadalje, postoje slučajevi gdje je smanjivanje reaktivnosti slobodnih radikala uvjetovano djelovanjem na određene enzime, odnosno aktiviranjem antioksidacijskih enzima i/ili inhibiranjem oksidaza [2].

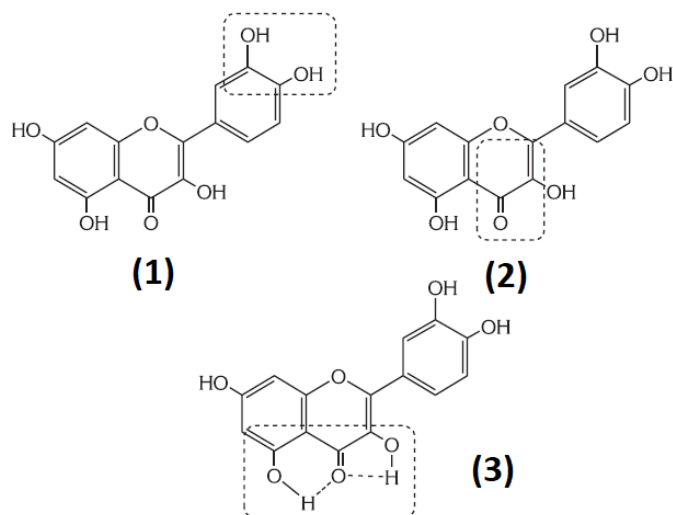
Antioksidacijska aktivnost (AO) često se izražava pomoću TEAC vrijednosti (engl. *trolox equivalent antioxidant activity*). Riječ je o antioksidacijaskoj aktivnosti ekvivalentnoj

troloksu (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), a to je analog vitamina E koji je topljiv u vodi za razliku od vitamina E. TEAC vrijednost se definira kao mmol/dm³ koncentracija otopine troloksa, ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1 mmol/dm³ otopine ispitivanog flavonoida [2].

Jedan od parametara koji opisuje jakost antioksidacijskog djelovanja kako flavonoida, tako i ostalih polifenolnih spojeva je antiradikalska aktivnost (AR). Ona se određuje obojenim indikatorom – DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazilni radikal) koji u prisutnosti antioksidansa mijenja boju, a promjena boje ekvivalentna je intenzitetu antiradikalske aktivnosti [2].

6.2.1. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja prekidanjem lančanih reakcija slobodnih radikala

Jedan od načina antioksidacijskog djelovanja je prekidanje lančanih reakcija slobodnih radikala. Da bi neki flavonoid bio dobar antioksidans mora zadovoljiti dva osnovna uvjeta. Prvi uvjet je da se dodavanjem flavonoida u relativno maloj koncentraciji postigne prekid lančane reakcije slobodnih radikala, odnosno prekid reakcija oksidacije. S druge strane, flavonoidi u reakciji sa slobodnim radikalom moraju kao produkt stvoriti radikal koji je manje reaktivan od inicijalnog slobodnog radikala [2].



Slika 10. Strukturne karakteristike flavonoida važne za antioksidacijsku aktivnost i stabilizaciju [2].

Flavonoidi uobičajeno sadrže strukturne skupine koje pospješuju antioksidacijsku aktivnosti i stabiliziranje slobodnih radikala. Na slici 10. prikazane su općenite strukture flavonoida s naznačenim skupinama koje pridonose delokalizaciji elektrona. Struktura pod (1) sadrži kateholnu skupinu (o-dihroksilna skupina), a to je strukturni motiv neophodan za superiornu antioksidacijsku aktivnost. Zatim, pod (2) je prikazana složena konjugacija keto-skupine na četvrtom ugljikovom atomu s dvostrukom vezom između drugog i trećeg ugljikova atoma flavonoidne strukture, što je bitno za antioksidacijsku aktivnost i za stvaranje vodikovih veza. Treća struktura prikazuje vodikove veze između keto-skupine i susjednih hidroksilnih skupina [2].

6.2.2. Antioksidacijsko djelovanje flavonoida posrednim putem

Antioksidacijsko djelovanje flavonoida može biti pojačano fiziološkim antioksidansom. Jedan od najčešćih takvih antioksidansa je askorbinska kiselina ili vitamin C [2].

Vitamin C nužan je faktor neophodan za sintezu kolagena, odnosno kolagenskih vlakana. Manjak vitamina C može uzrokovati skorbut, bolest koja je prvi puta primijećena kod zamoraca. Ovaj antioksidans aktivira enzim prolil-hidrolazu koja je odgovoran za ubrzavanje reakcije sinteze glavne komponente kolagena, 4-hidroksiprolina. Kolagenska vlakna sadrže glicinske (Gly) ostatke za čije je amino-krajeve vezan prolin koji se hidroksilira. Da bi se reakcija provodila nužan je izvor kisika jer molekula kisika također sudjeluje u reakciji. Jedan atom kisika reducira α -ketoglutarat u sukcinat, dok se drugi veže za četvrti ugljikov atom prolina. Ovu reakciju katalizira prolil-hidrolaza koja u svojoj strukturi ima kelatno vezano željezo (Fe^{2+}) nužno za aktivaciju molekule kisika. Aktivacijom molekule kisika oksido-redukcijskom reakcijom s Fe^{2+} , navedeni ion prelazi u oksidirani oblik koji inaktivira enzim prolil-hidrolaze i samim time sprječava daljnje grananje molekule kolagena. Za povratak aktivnosti enzima upravo je odgovoran askorbat jer reducira nastali oksidirani oblik željeza čineći ga opet sposobnim za aktiviranje molekule kisika. Budući da se na desnim u usnoj šupljini događa najbrža izmjena kolagena, manjak vitamina C direktno se manifestira krvarenjem desni i ispadanjem zubi, a moguća je i infekcija peridonta [20].

Kao vanjski antioksidans, askorbinska kiselina može sinergijski djelovati s flavonolom kvercetinom koji je dio polifenolnog profila crne bazge. Askorbat svojim vezanjem za kvercetin sprečava pretjeranu oksidativnu degeneraciju te polifenolne strukture. Samim

time, može se izvesti zaključak da uzajamno djelovanje kvercetina i askorbata može pojačati tzv. antiproliferativni učinak odnosno smanjiti rast i razvoj tumorskih stanica [2].

7. BIOAKTIVNOST SPOJEVA IZ BAZGE

Određivanjem polifenolnog profila potvrđeno je da bazga u svojem sastavu sadrži antocijanine cijanidin i pelargonidin, te flavonol kvercetin [3]. U tablici 2. prikazani su su eksperimentalni rezultati istraživanja antioksidacijskog djelovanja polifenola iz crne bazge [2].

Tablica 2. Flavonoidi i flavonoidi iz polifenolnog profila crne bazge, te eksperimentalno utvrđeni parametri njihovog antioksidacijskog djelovanja (antioksidacijsko i antiradikalno djelovanje) [2].

Flavonoid	Skupina	Slobodne OH-kupine/ položaj	2,3 -dvostruka veza	TEAC vrijednost/ (mmol/dm ³)	AR Literaturno /%	AR eksperimentaln o/%
cijanidin	antocijanin	3, 5, 7, 3', 4'	-	4,4	-	-
kvercetin	flavonol	3, 5, 7, 3', 4'	-	4,7	89,8	94,2
pelargonidin	antocijanin	3, 5, 7, 4'	-	1,3	-	-
kempferol	flavonol	3, 5, 7, 4'	+	1,34	93,5	93,7
mircetin	flavonol	3, 5, 7, 3', 4', 5'	+	3,1	72,8	68,5

7.1. Bioaktivnost kvercetina

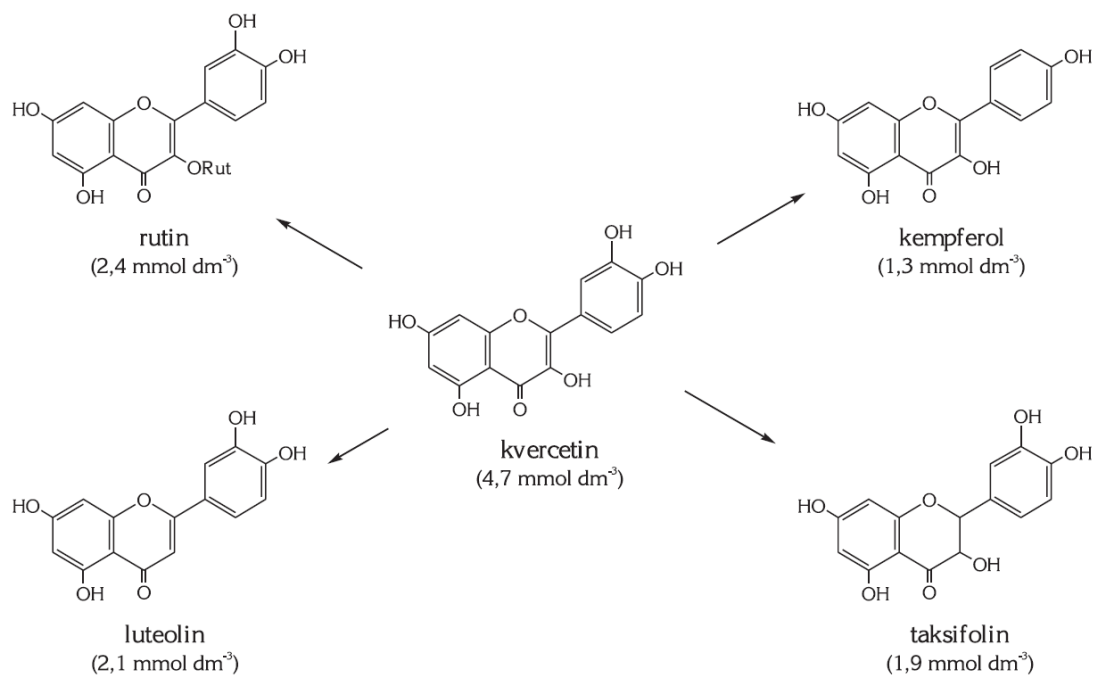
U sastavu uzorka crne bazge pronađen je flavonol kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon), formule C₁₅H₁₀O₇ [3]. Od svih potvrđenih flavonoida, jedini ima dostupan podatak vezano za antiradikalno i antioksidacijsko djelovanje u obliku TEAC vrijednosti i AR-a.

Kvercetin ima najvišu TEAC vrijednost od svih promatranih flavonoida. Izraženo antioksidacijsko djelovanje kvercetina je prvenstveno posljedica strukture. Struktura kvercetina prikazana je na slici 6. Sadrži 4-ketoskupinu vezanu za 2,3-dvostruku vezu što se također može vidjeti i na slici 10. Ta kombinacija strukturnih komponenata omogućava dobru stabilizaciju nastalog rezonantnog hibrida. Bolja delokalizacija elektrona kroz rezonantne strukture (poželjno je da je prsten nezasićen, a delokalizacija neometana) pridonosi jačem antioksidacijskom djelovanju [2].

Kempferol koji je strukturno vrlo sličan kvercetinu (slika 7.) ima znatno nižu TEAC vrijednost ($1,34 \text{ mmol/dm}^3$). Ta se činjenica može razjasniti strukturom. Na antioksidacijsko djelovanje direktno utječe ukupni broj hidroksilnih skupina na B prstenu. U reakcijama kvercetina s hidroksidnim i peroksidnim radikalima istima se donira vodikov atom i elektron s hidroksilne skupine. Stoga, kempferol ima jednu elektrondonorsku hidroksilnu skupinu manje na B prstenu od kvercetina. Iz tog razloga stabilizacija teče kroz manje rezonantnih struktura u odnosu na kvercetin. Kvercetin je dakle jače stabiliziran, pa lakše delokalizira slobodni elektron radikala. S druge strane, dodatna hidroksilna skupina na B prstenu daje kateholsku skupinu (slika 10.) koja lako oksidira. To je jedan od razloga zašto flavonol mircetin nema znatno višu TEAC vrijednost od kvercetina, iako ima jednu više hidroksilnu skupinu [2].

Presudni faktor kvercetina u borbi sa slobodnim radikalima je upravo prisutnost hidroksilne skupine na trećem C atomu B prstena. Zbog navedene prisutnosti kvercetin i kateholski flavonoidi imaju planarnu strukturu. Takav oblik molekule ima veliku tendenciju konjugacije i delokalizacije elektrona. Samim time, nastaje fenoksidni radikal flavonoida jače stabilnosti [2].

Jedan od faktora koji također utječe na antioksidacijska svojstva je i hidroksiliranost ugljikova atoma na trećem položaju središnjeg prstena (prsten A). Na slici 11. vidljive su strukture antioksidansa s 3-hidroksilnom skupinom. Glikozidacijom hidroksilne skupine najbliže keto-skupini kvercetina nastaje rutin. Tim procesom smanjuje se antioksidacijsko djelovanje, čemu ide u prilog niža TEAC vrijednost. Dakle, aglikoni su obično jači antioksidansi od glikozida [2].



Slika 11. Flavonoidi s 3-hidroksilnom skupinom [2].

Kombinacija 3-hidroksilne skupine s 4-ketoskupinom i 2,3-dvostrukom vezom daje flavonoidima maksimalnu sposobnost u borbi sa slobodnim radikalima. Na primjer, taksifolin u svojoj strukturi nema 2,3-dvostruku vezu, pa je samim time delokalizacija elektrona oslabljena, što rezultira drastičnim padom TEAC vrijednosti u odnosu na kvercetin (1,9 mmol/dm³). Kvercetin je nadmoćniji antioksidans i od luteolina jer luteolin u svojoj strukturi nema hidroksilnu skupinu vezanu za treći ugljikov atom A prstena. TEAC vrijednost stoga opada na 2,1 mmol/dm³ [2].

7.2. Bioaktivnost antocijanina

U polifenolnom profilu crne bazge od antocijanina prisutni su cijanidin i pelargonidin u formi glikozida, te se strukture navedenih glikozida vide na slici 12. [3]. Cijanidin inicijalno ima gotovo jednaku TEAC vrijednost kao i kvercetin. Antocijanidinski prsten cijanidina ima jednako kao i kvercetin veliku sposobnost konjugacije i delokalizacije elektrona. Međutim, u sastavu uzorka bazge cijanidin nije prisutan u klasičnoj formi, nego u obliku glikozida kao i pelargonidin [2].

Iz tog razloga sposobnost „hvatanja slobodnih radikala“ je znatno slabija u usporedbi s kvercetinom koji je u formi aglikona. Navedena sposobnost slabi kako se povećava brojnost

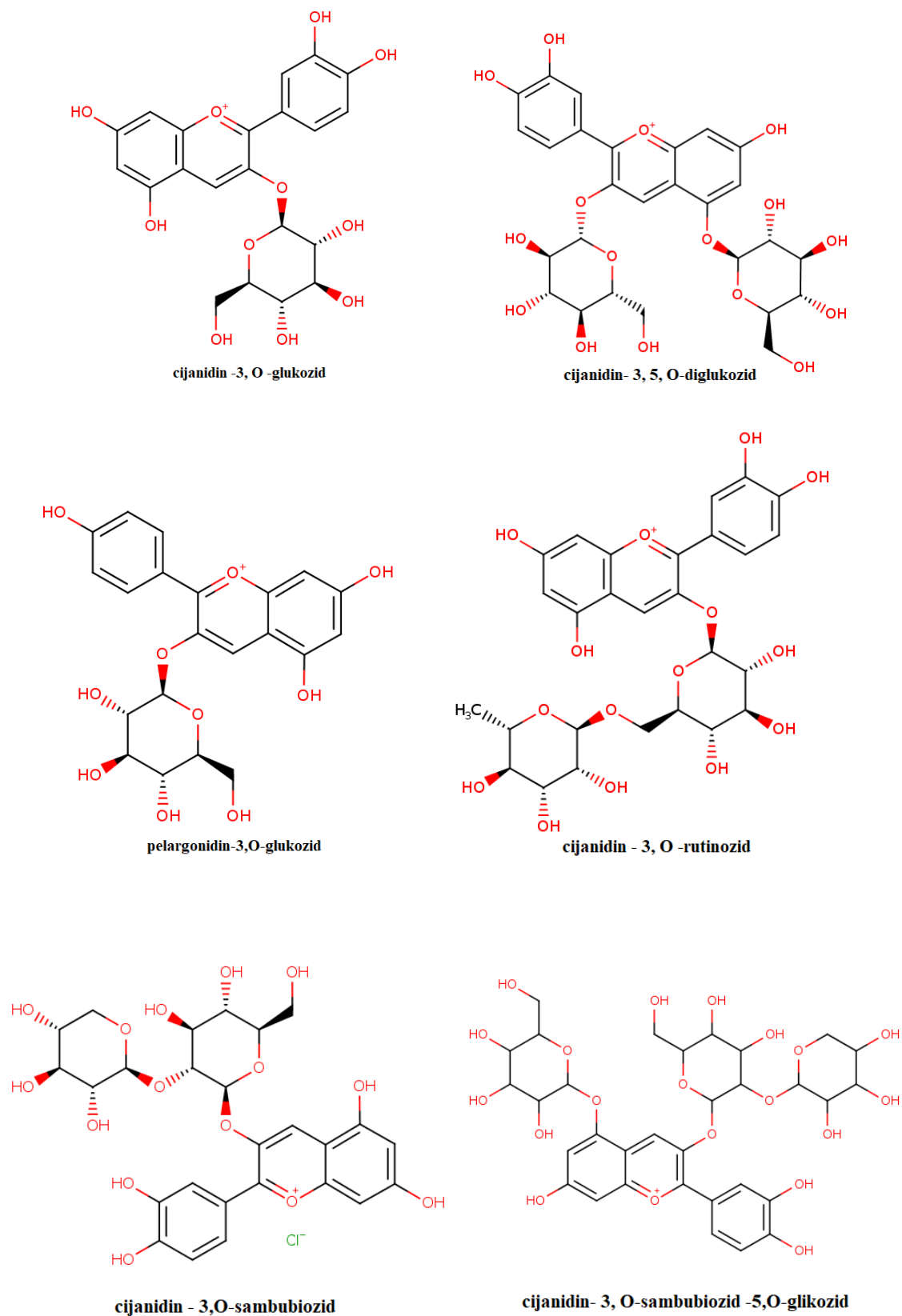
glikozidiranih kisikovih atoma. Osim brojnošću glikozidiranih kisikovih atoma, antioksidacijsko djelovanje je uvjetovano i pozicijom i razgranatošću spomenutih glikozidnih skupina. Razgranatiji glikozidi imaju složenije šećerne komponente u strukturi. Stoga je delokalizacija elektrona slabija, a stabiliziranje jako reaktivnog slobodnog radikala otežano [2].

TEAC vrijednost navedenih polifenolnih komponenata je poprilično niska. Literaturne vrijednosti TEAC-vrijednosti aglikonskih formi naznačene su u tablici 3. [13].

Tablica 3. Literaturne vrijednosti antioksidacijskog djelovanja flavonoida prisutnih u polifenolnom profilu crne bazge (*Sambucus nigra* L.) [13].

flavonoid	vrsta	TEAC vrijednost/mmoldm⁻³
kvercetin	flavonol	4,7 ± 0,1
cijanidin	antocijanin	4,4 ± 0,12
pelargonidin	antocijanin	1,3 ± 0,1

Prema ovom izvoru, čak i u aglikonskoj formi cijanidin i pelargonidin imaju manju sposobnost antioksidacijskog djelovanja [13].



Slika 12. Strukture antocijanina koji se mogu naći u crnoj bazgi (*Sambucus nigra* L.) [3].

8. ZAKLJUČAK

Analiza polifenolnog profila crne bazge (*Sambucus nigra* L.) ukazuje na prisutnost flavonoida, točnije antocijanina i flavonola. Antocijanini su prisutni u formi glikozida, dok je flavonol kvercetin prisutan u tzv. aglikonskoj formi, odnosno formi bez dodatnih supstituenata (šećernih jedinica).

Analiza rezultata pokazala je da je najjači antioksidans u bazgi upravo kvercetin. Kvercetin ima sve osobine dobrog antioksidansa, te u minimalnoj koncentraciji prekida lanac reakcija slobodnih radikala i stvara manje reaktivan i stabilniji radikal od početnog.

Antioksidacijsko djelovanje svih flavonoida i antioksidansa općenito pojačava prisutnost askorbata (vitamina C). Askorbat sinergijski djeluje s antioksidansima, te na taj način dolazi do prekida većeg broja lančanih reakcija slobodnih radikala i njihove inaktivacije.

Prema polifenolnom profilu i bioaktivnosti svih analiziranih spojeva, može se izvesti zaključak da je crna bazga bogata dobrim antioksidansima. Najjači pozitivan utjecaj na organizam postići će pripravci na bazi crne bazge koji u svom sastavu imaju izvor vitamina C (npr. limun). Iz tog razloga bilo bi poželjno u prehranu uvrstiti ovu ljekovitu biljku i na taj način omogućiti adekvatnu obranu organizma od bolesti.

9. LITERATURA

- [1] Lj. Grlić, *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja*, August Cesarec, Zagreb, 1990.
- [2] S. P. Kazazić, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55** (2004), 279-290.
- [3] <http://phenol-explorer.eu/contents/food/124#chromatography> (25. 8. 2019)
- [4] <https://www.plantea.com.hr/crna-bazga/> (17. 7. 2019.)
- [5] <https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/map/search/9539?criteria=Species%20Latin%20Name:Samucus%20nigra%20L.> (17. 7. 2019.)
- [6] V. Kumar, A. Sharma, S. K. Kohli, S. Bali, M. Sharma, R. Kumar, R. Bhardwaj, A. K. Thukral, *Biotechnology Research and Innovation*, **3** (2019), 1-21.
- [7] <http://struna.ihjj.hr/naziv/sekundarni-metaboliti/3374/> (18. 7. 2019.)
- [8] <http://struna.ihjj.hr/naziv/adstringens/13200/> (19. 7. 2019.)
- [9] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370> (19. 7. 2019.)
- [10] <http://struna.ihjj.hr/naziv/stilbeni/37667/> (25. 8. 2019.)
- [11] <https://www.plantea.com.hr/crna-bazga/> (17. 7. 2019.)
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/689043> (19. 7. 2019.)
- [13] J. Hempel, *Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996.
- [14] K. B. Pandey, S. I. Rizvi, *Oxid. Med. Cell Longev.* **2** (2009) 270-278.

- [18] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Phenyl-1-benzopyrylium-chloride> (19. 7. 2019.)
- [15] J. Pleadin, N. Perši, B. Antolović, B. Šimić, I. Kmetič, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3** (2011) 48-56.
- [16] <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=26145> (25. 8. 2019.)
- [17] D. M. Kasote, G. J. Duncan, M. Neacsu, W. R. Russell, *Food Chem.* **290** (2019) 56-63.
- [19] B. Winkel-Shirley, *Curr. Opin. Plant Biol.* **5** (2002) 218-223.
- [20] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [22] P. Riesz, T. Kondo, *Free Radic. Biol. Med.* **13** (1992) 247-270.
- [21] M. R. S. Campos, *Bioactive Compounds, Health Benefits and Potential Applications*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2019.