

Quercetin and its methylated metabolites : the chemical basis of activity

Citation for published version (APA):

Moalin, M. (2014). *Quercetin and its methylated metabolites : the chemical basis of activity*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20140611mm>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20140611mm](https://doi.org/10.26481/dis.20140611mm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

Summary

An important principle in toxicology is that the risk of a compound depends on its hazard and its exposure. For humans, the highest exposure comes from air with molecular oxygen as the culprit. The hazard of molecular oxygen partly arises from its diradical ($O_2^{2\bullet}$) nature. It can be fairly deduced that the hazard in combination with the high exposure makes oxygen by far the greatest risk to humans. Unfortunately, reducing exposure is not an option because $O_2^{2\bullet}$ is, paradoxically, the most important substance for sustaining human life. In the body, its vital function is to release energy from food resulting in the conversion of oxygen into water. Another paradox is that in its vital function, oxygen toxicity is also promoted. This is due to the formation of several types of reactive oxygen species (ROS) as byproducts. These ROS are even more hazardous than oxygen and are thought to actually initiate oxygen toxicity. It is well known that ROS can cause oxidative stress *in vivo* and severely damage tissues. Fortunately, the body is endowed with an intricate network of anti-oxidants that provide protection against ROS. The anti-oxidants derived from food form a pivotal part of this protection.

In this thesis, the focus is put on free radical scavenging anti-oxidants. As elaborated in this thesis, a free radical scavenger functions as a catalyst that channels the dangerous reactivity of ROS safely into the anti-oxidant network of the body. From this definition, three important criteria have been deduced that make up a good scavenging anti-oxidant: (i) the anti-oxidant should be able to react relatively fast with radicals, (ii) it should form a relatively stable product when it has neutralized a ROS and finally (iii) the oxidized anti-oxidant should be safely regenerated in the anti-oxidant network of the body.

Quercetin (**Q**), which is the most prominent anti-oxidant found in the Western diet (Figure 1), and its methylated derivatives have been chosen as anti-oxidant models for our research. Our aim is to identify the structural elements that are important for an anti-oxidant to fulfill the three criteria mentioned above. This will help to elucidate the biological effect of **Q** and will provide a rationale for the

Summary

use of this anti-oxidant and/or its methylated derivatives. The final goal is to rationally design more potent anti-oxidants that can combat oxygen toxicity.

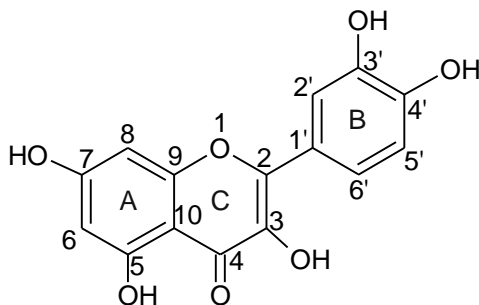


Figure 1. The chemical structure of quercetin with the numbering of the carbon atoms and the rings A, C and B indicated.

Chapter 1 reviews the metabolism of **Q** and gives an inventory of its known metabolites. **Q** is extensively metabolized *in vivo* and is mainly found as metabolites. This is shifting the focus on the anti-oxidant research to the metabolites of **Q**, because these metabolites might actually be responsible for the health benefits associated with **Q** intake. The initial routes of metabolism appear to be *O*-glucuronidation, *O*-methylation and *O*-sulfation. Especially the methylated metabolites are of interest because of their relatively low toxicity, relatively high metabolic stability and improved absorption *in vivo* when compared to **Q**.

In **Chapter 2**, we have developed a refined method for the *O*-methylation of **Q** using micro-reactor technology. The micro-reactor consists of a flow system in which the reactants are mixed in a highly controlled and well-defined micro-reactor. The advantage of this system is the reproducibility and the relatively high purity that can be achieved. Additionally, larger quantities can be produced with relative ease by up-scaling to a “Kilo-Flow”.

In **Chapter 3**, the anti-oxidant capacity of **Q** and its methylated derivatives were established. The electron donating effect of the hydroxyl groups and the relatively planar structure of **Q** has been shown to be the main structural element

Summary

responsible for its high anti-oxidant capacity. The planar conformation enables the distribution of the electron donating effect through the large conjugated π -system over the entire molecule. This is essential for the cooperation of the electron donors located in the AC-ring with those located in the B-ring of **Q**. The mono-methylated derivatives of **Q** also demonstrate relatively high anti-oxidant capacity, which is influenced by the position of methylation. The mono-methylated derivative with the lowest anti-oxidant capacity, tamarixetin, still has twice the anti-oxidant capacity of ascorbate. This indicates that the methylated metabolites of **Q** possess sufficient anti-oxidant capacity to exert health effects *in vivo*.

In **Chapter 4**, we have used electron spin resonance (ESR) spectroscopy to investigate the structures of the radicals of **Q** (**Q'**) and its methylated metabolites. The delocalization of the unpaired electron (**UE**) in **Q'** is responsible for its relatively low reactivity that is crucial in the anti-oxidant activity. Our findings demonstrate that the **UE** is primarily delocalized in the B-ring of **Q'** (Figure 2). This is because the oxygen atoms in the B-ring (i.e. 3'O and 4'O) and the AC_Q-ring have an electron donating effect that stabilizes the electron deficient π -system in the B-ring of **Q'**. Our findings also demonstrate that an un-substituted OH group at the C3 position in the C-ring is essential for the electron donating effect of the AC_Q-ring. The conclusion is that one of the main reasons for **Q'**'s exceptional anti-oxidant activity is the ability of its radical (i.e. **Q'**) to safely cage and stabilize the **UE** in the conjugated π -system of its B-ring.

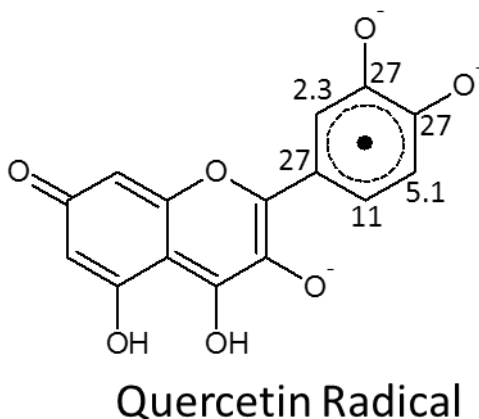


Figure 2. Simplified structure of the quercetin radical, with the spin-distribution (%) calculated by O'Connell's equation from the hyperfine couplings of its ESR spectrum.

In **Chapter 5**, we have investigated which of the two pharmacophores, i.e. the AC-ring or the B-ring, of **Q** is prone to donate an electron to reactive species, by studying peroxynitrite (PON) scavenging. Our findings corroborate previous studies that both the AC- and the B-ring are potent PON scavengers on their own. In addition, quantum molecular calculations illustrate that the highest occupied molecular orbital (HOMO) is mostly concentrated on the AC-ring of **Q**, specifically on the C2 position (Figure 3). The HOMO is the molecular orbital that is most likely to donate electrons to a free radical. The electron donation, through resonance effect, of the 3OH of **Q** is the main reason for the high concentration of the HOMO at the C2 position. In addition, the oxygens at the 5 and the 7 position of **Q** activate the 3OH via the carbonyl group at the 4 position through resonance effect. This further increases the HOMO concentration at the C2 of **Q**. So, the AC-ring of **Q** is most likely to donate the first electron.

Summary

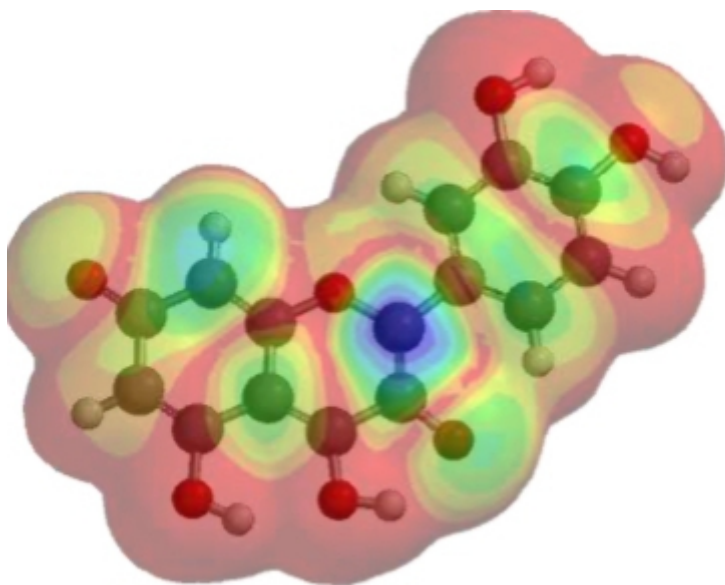


Figure 3. HOMO map, generated with *ab initio* calculations in Spartan '10, on the activated form of **Q**. Blue indicates a high concentration of the HOMO, and red indicates the lowest concentration.

After the first electron donation to a free radical from the C2 of **Q**, the **UE** should be located on the AC-ring of **Q**[•] at its C2 position (Figure 4). However, the ESR spectrum of **Q**[•] (**Chapter 4**) clearly indicates that the **UE** is primarily in the B-ring. To resolve this contradiction, i.e. that the **UE** is formed in the AC-ring and subsequently stabilized in the B-ring, we postulate that the B-ring intramolecularly scavenges the AC-ring of **Q**[•] to safely cage the **UE** in the conjugated π -system of its B-ring. This means that the electron richness of the AC-ring is restored, enabling it to donate another electron to a second free radical. After the donation of the second electron, a quinone methide is formed that can be processed in the anti-oxidant network of the body.

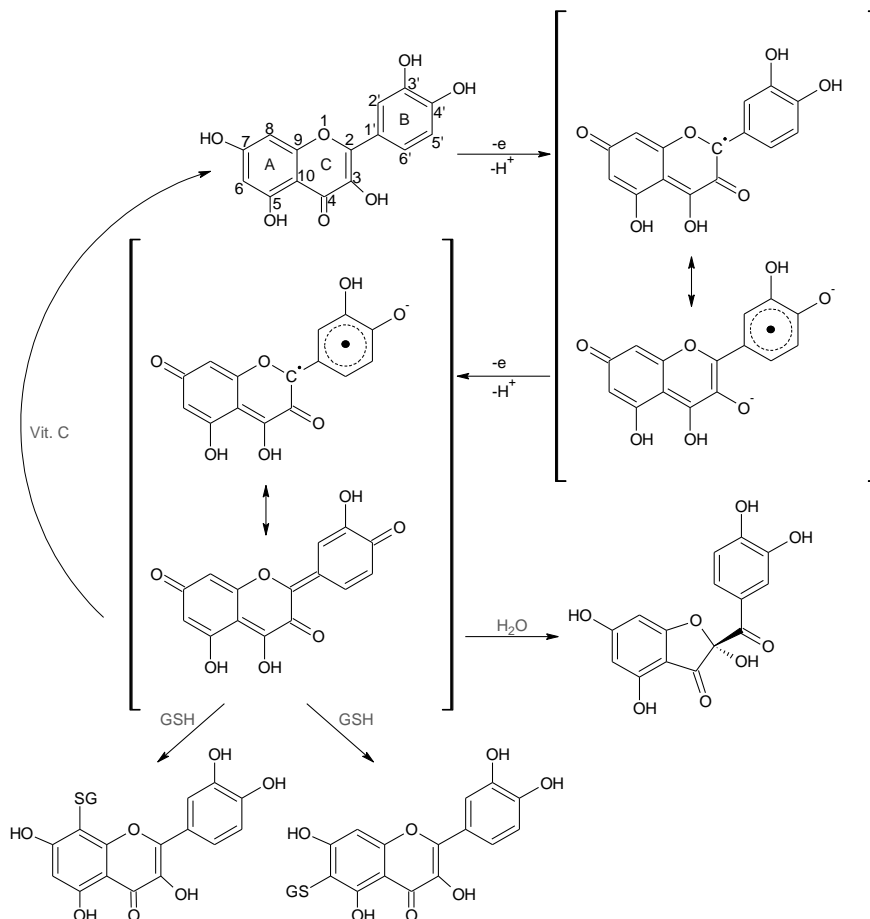


Figure 4. Schematic representation of the different steps involved in the anti-oxidant mechanism of **Q**.

In **Chapter 6**, the interaction between the anti-oxidant network and the quinones of **Q** and its methylated metabolites are described. We have illustrated three main pathways that the quinone methide of **Q** (**oxQ**) can undergo in Figure 4; i) **oxQ** can react with water, ii) **oxQ** can react with GSH to form GSH-adducts and iii) **oxQ** can be regenerated to **Q** by ascorbate. In corroboration with previous studies, our findings also demonstrate that **oxQ** reacts much faster with thiols such as GSH than with ascorbate. This relatively high thiol reactivity of **oxQ** can

Summary

be disadvantageous *in vivo* because it can impair the function of vital thiol-containing proteins. To circumvent thiol toxicity, our strategy was to identify **Q** derivatives that would rather react with ascorbate than with thiols. An additional advantage of the reaction with ascorbate is that the parent flavonoid is recycled, which enhances the overall anti-oxidant activity of the flavonoid. Oxidized ascorbate can easily be regenerated *in vivo* by dehydroascorbate reductase, with nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) as a cofactor, completing the anti-oxidant cycle.

We have found that the most effective derivative was tamarixetin, 4'-O-methylquercetin (**4'MQ**), that has a corresponding oxidation product (**ox4'MQ**) with thiol reactivity 350 times lower than **oxQ**. This indicates that the endogenous metabolism of **Q** to **4'MQ** might actually be a physiological way to safely benefit from the potential of **Q**.

Samenvatting

Samenvatting

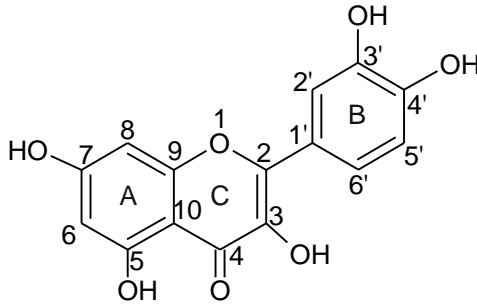
Samenvatting

Toxicologie is gebaseerd op het principe dat het risico van een stof is gecorreleerd aan zijn intrinsieke giftigheid en blootstelling. Mensen ervaren een levenslange blootstelling aan zuurstof, die een intrinsieke giftigheid heeft omdat het in de natuur voorkomt als een reactieve diradicaal. Helaas kan de blootstelling aan zuurstof niet verminderd worden, omdat het essentieel is voor het menselijke leven. In het lichaam wordt de reactiviteit van zuurstof gebruikt om energie vrij te maken vanuit de voeding. In dit proces, worden reactieve zuurstof soorten (reactive oxygen species [ROS]) gevormd als bijproducten. Deze bijproducten kunnen zelfs gevaarlijker zijn dan zuurstof. Het is algemeen bekend dat deze ROS kunnen leiden tot oxidatieve stress. De bescherming tegen ROS is in dat geval niet meer toereikend. Het gevolg is dat weefsels beschadigen. De bescherming van het lichaam tegen ROS bestaat uit een netwerk van anti-oxidanten die op een elegante manier kunnen samenwerken. Daarmee wordt het evenwicht in het lichaam bewaard. Het anti-oxidant netwerk van het lichaam kan versterkt worden door anti-oxidanten die opgenomen worden uit de voeding.

In dit proefschrift wordt de nadruk gelegd op anti-oxidanten die vrije radicalen onschadelijk maken door er direct mee te reageren. In dit proefschrift wordt een anti-oxidant gepositioneerd als een stof die de gevaarlijke reactiviteit van ROS veilig in het anti-oxidant netwerk van het lichaam kan leiden. Vanuit deze definitie zijn er drie belangrijke eisen voor een goede anti-oxidant afgeleid: (i) de anti-oxidant moet relatief snel kunnen reageren met radicalen, (ii) vervolgens moet de geoxideerde anti-oxidant een relatief stabiel product vormen, (iii) en uiteindelijk moet de geoxideerde anti-oxidant veilig geregenereerd kunnen worden in het anti-oxidant netwerk van het lichaam.

Quercetine (**Q**) is één van de meest prominente anti-oxidant in het westerse dieet (Figure 1). **Q** en zijn gemethyleerde derivaten zijn gekozen als model voor ons onderzoek. Het doel van ons onderzoek was om de structurelementen te identificeren die belangrijk zijn, om aan de drie eisen die boven gesteld zijn te voldoen. Dit, zo stelden wij, zal leiden tot meer inzicht in de biologische werking

van **Q** en een rationaal geven voor het gebruiken van deze anti-oxidant en/of zijn methyl derivaten. Het ultieme doel is om rationeel anti-oxidanten te ontwikkelen die grotere potentie hebben, om het lichaam te beschermen tegen zuurstof toxiciteit.



Figuur 1. Chemische structuur van quercetine met de drie (A, C en B) ringen, en de nummering van de atomen in de drie ringen aangegeven.

Hoofdstuk 1 is een review over de metabolisme van **Q** en inventariseert reeds geïdentificeerde metabolieten. Uit de literatuur blijkt dat **Q** extensief gemetaboliseerd wordt en *in vivo* bijna volledig als metabolieten terug wordt gevonden. Het anti-oxidant onderzoek rondom **Q** is de laatste jaren verschoven naar zijn metabolieten vanwege het inzicht dat de metabolieten waarschijnlijk verantwoordelijk zijn voor de gezondheidseffecten die worden geassocieerd met inname van **Q**. Metabolisme van **Q** lijkt te beginnen met *O*-glucuronidering, *O*-methylering en *O*-sulfatering. Vooral de gemethyleerde metabolieten zijn interessant omdat ze een relatief lage toxiciteit, een hoge metabole inertie en een verbeterde absorptie vertonen *in vitro* in vergelijking met **Q**.

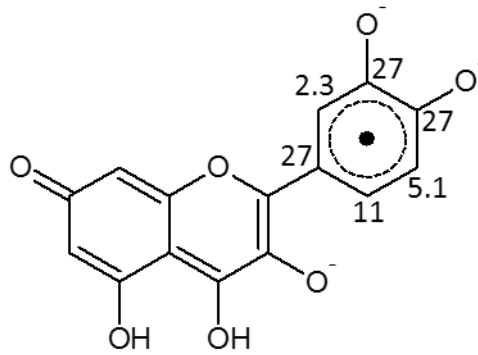
In **Hoofdstuk 2** hebben we een elegante methode ontwikkeld voor de *O*-methylering van **Q** m.b.v. micro-reactor technologie. De technologie bestaat uit een “flow” systeem, en de reactanten worden gemengd in de zeer gecontroleerde en goed gedefinieerde micro-reactor omgeving. De voordelen van zo’n systeem blijken de reproduceerbaarheid en de relatief hoge zuiverheden die bereikt

Samenvatting

kunnen worden. Verder kunnen relatief grote hoeveelheden geproduceerd worden, omdat de procedure met gemak te vertalen is naar een “Kilo-Flow”.

In **Hoofdstuk 3** zijn de anti-oxidant capaciteiten van **Q** en zijn methylderivaten vast gelegd. Het elektrondonerende effect van de hydroxylgroepen en de relatief vlakke structuur van **Q** blijken de belangrijkste structurelementen te zijn voor zijn hoge anti-oxidant capaciteit. Door de vlakke structuur kunnen de gedoneerde elektronen, via het relatief grote geconjugeerde π -systeem, over het hele molecuul verspreid worden. Dit is essentieel voor de samenwerking tussen de elektrondonoren in de AC-ring en de elektrondonoren in de B-ring. De mono gemethyleerde derivaten van **Q** blijken nog steeds een groot gedeelte van de anti-oxidant capaciteit te bezitten. De positie van methylgroep in het molecuul is in dit verband van belang. Het mono gemethyleerde derivaat met de laagste capaciteit is tamarixetine. Deze stof blijkt nog altijd twee keer meer anti-oxidant capaciteit te hebben dan vitamine C. Dit geeft aan dat de gemethyleerde metabolieten van **Q** nog steeds genoeg anti-oxidant capaciteit hebben om *in vivo* werkzaam te zijn.

In **Hoofdstuk 4** hebben we de elektronspinresonantie (ESR) techniek gebruikt om de structuur van de radicalen van **Q** (**Q'**) en zijn gemethyleerde metabolieten te bestuderen. Delokalisatie van het ongepaarde elektron in **Q'** is verantwoordelijk voor zijn relatief lage reactiviteit, die cruciaal is voor de anti-oxidant activiteit. Onze bevinding tonen aan dat het ongepaarde elektron hoofdzakelijk gedelokaliseerd is in de B-ring van **Q'** (Figure 2). Dit komt door het elektrondonerend effect van de zuurstof atomen in de B-ring (i.e. 3'O en 4'O) en de AC-ring, die stabiliserend werken op het elektrondeficiënte π -systeem in de B-ring van **Q'**. Voor het elektrondonerende effect van de AC-ring is vooral een niet-gesubstitueerde OH groep op de C3 positie in de C-ring essentieel. Dus een van de belangrijkste redenen voor de hoge anti-oxidant activiteit van **Q** is; het vermogen van zijn radicaal (**Q'**) om het ongepaarde elektron veilig op te vangen en te stabiliseren in het geconjugeerde π -systeem van de B-ring.

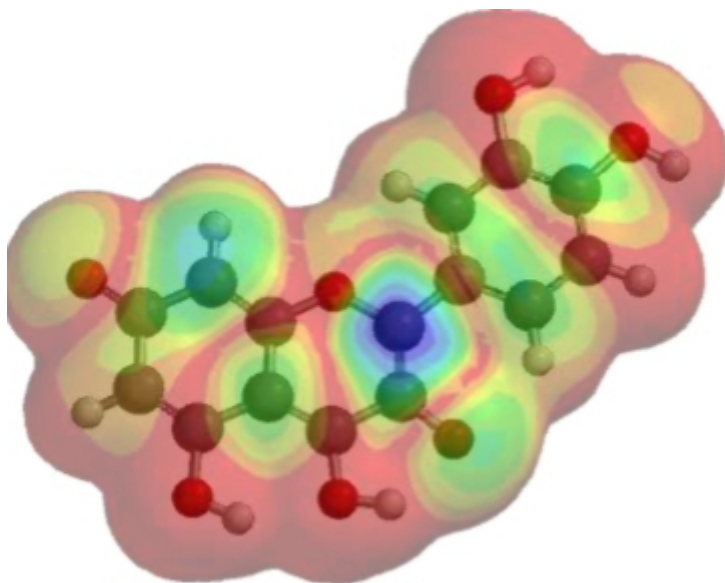


Quercetin Radical

Figure 2. De structuur van het quercetine radicaal met de relatieve spinverdeling (%) die afgeleid zijn van de hyperfijne koppelingen van zijn ESR spectrum.

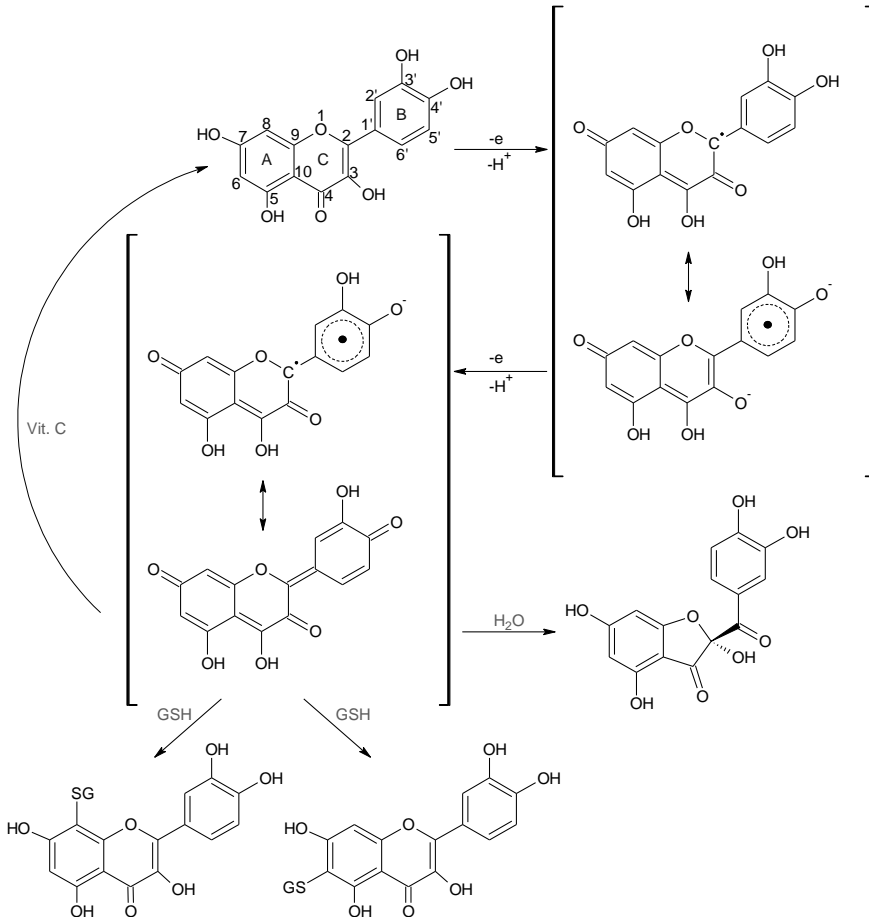
In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht welke van de twee farmacoforen, de AC- of de B-ring, van **Q** meer neigen naar de elektrondonering. Dit hebben we onderzocht door gebruik te maken van de peroxy-nitriet assay. In deze assay wordt de snelheid gemeten waarmee anti-oxidanten met peroxy-nitriet reageren. Onze resultaten geven aan dat beide ringen, AC- en B-ring, van **Q** direct bescherming kunnen geven tegen peroxy-nitriet. Uit quantum moleculaire berekeningen blijkt dat de hoogste bezette moleculaire orbitaal, de HOMO, vooral is geconcentreerd op de C2 positie in de AC-ring van **Q** (Fig. 3). De HOMO is de orbitaal die als eerste een elektron doneert. De elektrondonering van de 3OH van **Q** is hoofdzakelijk verantwoordelijk voor de hoge concentratie van de HOMO op de C2 positie. Dit komt door het resonantie effect. Daarnaast kunnen de 5OH en de 7OH van **Q**, door resonantie, activerend werken op de 3OH via de carbonylgroep op de 4 positie. Dit leidt ook tot een verhoging van de HOMO concentratie op de C2. Het lijkt er dus op dat de AC-ring van **Q** meer geneigd is om het eerste elektron te doneren.

Samenvatting



*Figuur 3. De HOMO verdeling op de geactiveerde vorm van **Q** die gemaakt is met quantum moleculaire berekeningen in Spartan '10. Hoogste concentratie van de HOMO wordt aangegeven met blauw kleur, en laagste concentratie wordt aangegeven met rood.*

Na het doneren van het eerste elektron vanuit de C2 van **Q** zou het ongepaarde elektron op de C2 van **Q**[•] moeten zitten (Figure 4). Het ESR spectrum van **Q**[•] (**Hoofdstuk 4**) laat echter duidelijk zien dat het ongepaarde elektron hoofdzakelijk te vinden is in de B-ring en niet in de AC-ring. Om deze paradox op te lossen postuleren we dat de B-ring van **Q**[•], intra-moleculair, een elektron doneert aan de AC-ring om zo het ongepaarde elektron veilig op te vangen in zijn geconjugeerde π -systeem. Als gevolg wordt de potentie van de AC-ring van **Q**[•] hersteld, en kan de AC-ring nog een elektron doneren. Na het doneren van het tweede elektron, wordt er een quinone methide gevormd die vervolgens verwerkt kan worden in het anti-oxidant netwerk van het lichaam.



Figuur 4. Schematische weergave van de verschillende stappen die betrokken zijn in het anti-oxidant mechanisme van quercetine.

In **Hoofdstuk 6** wordt de interactie tussen het anti-oxidant netwerk en de quinonen van **Q** en zijn gemethyleerde metabolieten beschreven. We hebben in figuur 4 de drie belangrijkste reacties geïllustreerd, die een quinone methide van **Q** (**oxQ**) kan ondergaan; i) **oxQ** kan reageren met water, ii) **oxQ** kan reageren met GSH om een GSH-adduct te vormen en iii) **oxQ** kan geregenereerd worden naar **Q** door vitamine C. Onze resultaten tonen aan dat **oxQ** veel sneller reageert met thiolen dan met vitamine C. De relatief hoge thiol reactiviteit van **oxQ** kan

Samenvatting

nadelig zijn *in vivo* omdat het de werking van essentiële thiol-houdende eiwitten kan belemmeren. Om de thiol toxiciteit te voorkomen, was onze strategie om **Q** derivaten te identificeren die sneller met vitamine C reageren dan met thiolen. Een extra voordeel van de reactie met vitamine C is dat het flavonoid gerecycled wordt, hetgeen leidt tot een versterking van de anti-oxidant activiteit van het flavonoid. Verder kan het geoxideerde vitamine C geregenereerd worden *in vivo* met het enzym dehydroascorbate reductase (DHR) die nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) gebruikt als cofactor. Dit leidt tot een complete en zelfherstellende anti-oxidant cyclus.

Tamarixetine, 4'-methylquercetin (**4'MQ**), bleek de meest effectieve derivaat te zijn met een oxidatie product (**ox4'MQ**) die 350 keer lager thiol reactiviteit vertoont dan **oxQ**. Waarschijnlijk is de endogene metabolisme van **Q** naar **4'MQ** een fysiologische manier om veilig gebruik te maken van de potentie van **Q**.