

**Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften
verschiedener Carotinoide
in unterschiedlichen Antioxidans-Assays**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf



vorgelegt von

Stefan Sell
aus Velbert

Düsseldorf 2009

Aus dem Institut für organische und makromolekulare Chemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Braun
Koreferent: PD Dr. K. Schaper

Tag der mündlichen Prüfung:

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht:

“Chemistry of Carotenoid Oxidation and Free Radical Reactions“

H.-D. Martin, S. Beutner, B. Mayer, C. Ruck, M. Schmidt, S. Sell, R. Walsh,
Pure and Appl. Chem., 71 (12), 2253, 1999

“Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant function”

S. Beutner, B. Blödorn, S. Frixel, I. Hernández Blanco, T. Hoffmann, H.-D. Martin, B. Mayer, P. Noack, C. Ruck, M. Schmidt, I. Schuelke, S. Sell, H. Ernst, S. Haremza, G. Seyboldt, H. Sies, W. Stahl, R. Walsh,
J. Sci. Food Agric. 2001, 81, 559-568

“Time-course of Carotenoid and Degraded Carotenoid Concentrations during Antioxidant Activity and Function”

S. Beutner, H. Ernst, S. Frixel, I. Hernández Blanco, B. Mayer, C. Ruck, M. Schmidt, S. Sell, R. Walsh, H. Sies, W. Stahl, H.-D. Martin,
Free Rad. Res. 2002, 36, Suppl. 1, 66-68

„Modified Flavonoids as strong photoprotecting UV-Absorbers and Antioxidants“

H.-D. Martin, S. Beutner, S. Frixel, B. Bloedorn, I. Hernández Blanco, B. Mayer, A. Pérez Gálvez, C. Ruck, M. Schmidt, S. Sell, T. Hoffmann, P. Noack, I. Schuelke, N. Kiesendahl, R. Scherrers, H. Sies, W. Stahl, H. Ernst, S. Haremza and R. Walsh in “Strategies for Safe Food“, (Ed. T. Eklund, H. De Brabander, E. Daeseleire, I. Dirinck, W. Ooghe), Vol.1, p. 288, Koninklijke Vlaamse Vereniging 2003 (ISBN 90-804957-2-7)

“Carotenylflavonoids, a novel group of potent, dual-functional antioxidants”

S. Beutner, S. Frixel, H. Ernst, T. Hoffmann, I. Hernández Blanco, C. Hundsdoerfer, N. Kiesendahl, S. Kock, H.-D. Martin*, B. Mayer, P. Noack, A. Pérez Gálvez, G. Kock, R. Scherrers, W. Schrader, S. Sell, W. Stahl
Arkivoc 2007 (VIII) 279-295

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand,
danke ich für seine vielseitigen Anregungen und stete Unterstützung, welche
diese Arbeit immer begleitet und mitgeformt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Braun für die freundliche
Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

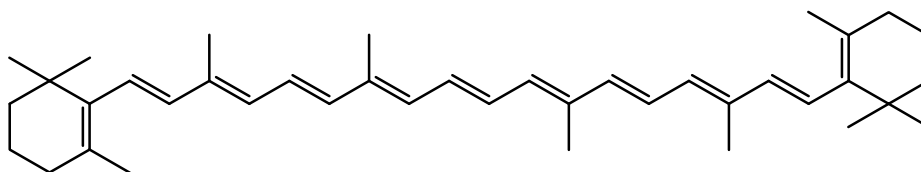
Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite	7
1.2	Abbaureaktionen des β -Carotins	Seite	8
1.3	Biochemische <i>in vivo</i> Messverfahren	Seite	13
2.	Problemstellung	Seite	39
3.	Hauptteil	Seite	41
3.1	Stickstoffhaltige Carotinoide	Seite	41
3.2	Darstellungen der Carotinoidazine	Seite	42
3.3	UV-Vis-Spektroskopie der Carotinoidazine	Seite	51
3.4	Semiempirische Berechnungen der Carotinoidazine	Seite	54
3.5	Darstellungen der Carotinoidphenylhydrazone	Seite	66
3.6	UV-Vis-Spektroskopie der Carotinoidphenylhydrazone	Seite	73
3.7	Semiempirische Berechnungen der Carotinoidphenylhydrazone	Seite	75
3.8	Monoprotonierte stickstoffhaltige Carotinoidspezies	Seite	87
4.	Antioxidative Messverfahren		
4.1	ABTS-Assay	Seite	98
4.2	Messergebnisse des ABTS-Assays		
4.2.1	Trolox	Seite	108
4.2.2	Lycopin	Seite	113
4.2.3	Cryptoxanthin	Seite	118
4.2.4	Lutein	Seite	123
4.2.5	Zeaxanthin	Seite	128
4.2.6	β -Carotin	Seite	132
4.2.7	Canthaxanthin	Seite	136
4.2.8	Astaxanthin	Seite	140
4.3	Zusammenstellung der gemessenen RAA(AUC)-Werte	Seite	144
4.4	Diskussion der Ergebnisse aus dem ABTS-Assay	Seite	145
4.4.1	Diskussion der Troloxreaktion	Seite	150
4.4.2	Diskussion der Carotinoidreaktion	Seite	154
4.4.3	Diskussion von Cantha- und Astaxanthin	Seite	163
4.4.4	Abschließende Diskussion	Seite	168

5.	Druckmessungen der Sauerstoffdruckabnahme	Seite 171
5.1	Messergebnisse Lycopin	Seite 175
5.2	Messergebnisse Cryptoxanthin	Seite 176
5.3	Messergebnisse Zeaxanthin	Seite 177
5.4	Messergebnisse Lutein	Seite 178
5.5	Messergebnisse β -Carotin	Seite 179
5.6	Messergebnisse Canthaxanthin	Seite 180
5.7	Messergebnisse Astaxanthin	Seite 181
5.8	Interpretation der Messergebnisse	Seite 182
6.	Messungen der Cumolhydroperoxidbildung	Seite 184
6.1	Messergebnisse Lycopin	Seite 187
6.2	Messergebnisse Astaxanthin	Seite 188
6.3	Messergebnisse Canthaxanthin	Seite 189
6.4	Messergebnisse Zeaxanthin	Seite 190
6.5	Messergebnisse Cryptoxanthin	Seite 191
6.6	Messergebnisse Lutein	Seite 192
6.7	Messergebnisse β -Carotin	Seite 193
7.	Vergleich der Messergebnisse	Seite 195
8.	Zusammenfassung	Seite 214
9.	Englische Zusammenfassung	Seite 220
10.	Experimenteller Teil	
10.1	Allgemeines	Seite 220
10.2	Durchführung des ABTS-Assays	Seite 228
10.3	Durchführung Druckmessung der Sauerstoffabnahme	Seite 232
10.4	Durchführung der Cumolhydroperoxidbestimmung	Seite 236
10.5	Versuchsbeschreibungen	Seite 238
11.	Literatur	Seite 254

1. Einleitung

Die Carotinoide gehören zur Stoffklasse der Tetraterpene, die aus acht Isopreneinheiten so verknüpft sind, dass sich die Anordnung in der Mitte des Moleküles umkehrt. Die beiden zentralen Methylgruppen stehen in 1,6-Position, während die beiden anderen Methylgruppen der Polyenkette in 1,5-Position stehen. Die Carotinoide besitzen ein C_{40} -Kohlenwasserstoffgerüst mit einem zentralen C_{22} -Polyenkörper. Die Endgruppen können offenkettig oder zyklisch sein, es können zwei unterschiedliche oder zwei gleiche Endgruppen enthalten sein. Carotinoide, die Sauerstoff ($-OH$ oder $=O$) enthalten, heißen Xantophylle^[1]. Carotinoide sind in der Natur sehr weit verbreitete Substanzen und besitzen eine charakteristische gelbe, orange bis rote Färbung. Den Namen Carotinoide erhielten sie vom dem wohl bekanntesten Vertreter, dem β,β -Carotin **1**.



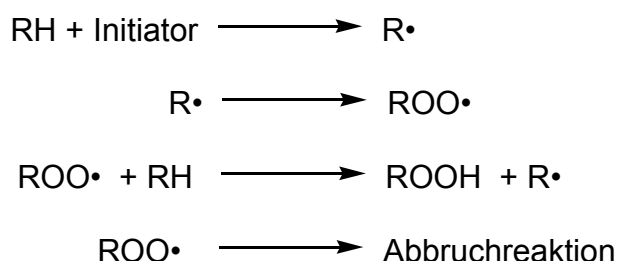
1

Die charakteristische Farbe erklärt sich aus dem ausgedehnten Doppelbindungssystem, was zu einer Lichtabsorption im sichtbaren Bereich von 320 nm bis 550 nm führt. Die ersten Carotinoide wurden in der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts entdeckt. Neben der Strukturaufklärung und der Farbe lag das Hauptinteresse in der Forschung schon früh bei einer vermuteten Provitamin-A Aktivität der Carotinoide. Seit Peto^[2] im Jahre 1981 den hemmenden Einfluss von β -Carotin auf menschliches Tumorstadium entdeckte, wuchs das Interesse an den biologischen Funktionen dieser Stoffklasse. Eine der wichtigsten Funktionen ist, neben dem Quenchen von Singulett-Sauerstoff und der Eigenschaft als Lichtsammler im Photosystem der Pflanzen zu fungieren, auch als Radikalfänger beziehungsweise als Antioxidans zu dienen. Man ist der Überzeugung, dass beim Menschen „freie Radikale“ Auslöser von vielen Krankheiten sind^[3,4,5]. So können zum Beispiel Nitroxyl-, Peroxyl- und Hydroxyl-Radikale DNA-Basen oxidativ verändern. Sie sind damit

ursächlich an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt. Im zentralen Interesse steht deshalb unter anderem die Aufklärung des antioxidativen Verhaltens der Carotinoide^[6].

1.2 Abbaureaktionen des β -Carotins

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zum Oxidationsverhalten von β -Carotin. Es zeigt sich, dass die radikalische Oxidation des β -Carotins nicht, wie bei gesättigten Kohlenwasserstoffen häufig beobachtet, einem einfachen Schema mit :



folgt. Durch die stark ungesättigte Struktur des β -Carotins sind verschiedene Reaktionspfade möglich:

1) Oxidation durch Elektronentransfer:

Elektrophile Radikale und Radikalkationen entfernen ein Elektron aus dem Polyensystem, wodurch das neutrale Carotin in ein Carotinoidradikalkation übergeht.

2) Oxidation durch Addition von Radikalen:

Peroxyradikale können an das Polyensystem addieren, wodurch das Carotin in ein stark mesomeriestabilisiertes Carotinoidperoxyradikal übergeht.

3) Oxidation als Folgereaktion einer Wasserstoffabstraktion:

Methylengruppen im Cyclohexenring der Carotinoide enthalten leicht abstrahierbare allylische Wasserstoffatome. Nach Wasserstoffabstraktion ergibt sich bei dieser Reaktion ein stark mesomeriestabilisiertes Carotinylnradikal.

4) Einfluss von oxidierten Produkten:

Während der Oxidation von Carotinoiden entsteht eine Vielzahl an ungesättigten Carotinoidbruchstücken. Deren Einfluss ist bei der Interpretation von antioxidativen Reaktionen zu berücksichtigen.

Eine der maßgeblichen Veröffentlichungen zur β -Carotinoxidation erschien 1984 von Burton und Ingold^[7]. Burton und Ingold untersuchten den antioxidativen Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an β -Carotin bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken in der radikalisch induzierten Oxidation von Tetralin. Sie fanden, dass die antioxidative Wirksamkeit des β -Carotins stark von seiner Konzentration und dem Partialdruck des Sauerstoffs im Meßsystem abhängig ist. So unterdrückt β -Carotin die Tetralinoxidation sehr effektiv im Konzentrationsbereich von 10^{-5} mol/l bis 10^{-3} mol/l bei einem geringen Sauerstoffpartialdruck von 15 Torr. Für Konzentrationen größer 10^{-3} mol/l und hohen Sauerstoffpartialdrücken von 760 Torr wurde dagegen eine weniger effektive antioxidative Wirkung auf die Tetralinoxidation gefunden. Dieses Beispiel veranschaulicht bereits die Komplexität der ablaufenden Radikalmechanismen und deren mögliche Interpretation. Als Erklärung der veränderlichen antioxidativen Wirksamkeit gaben Burton und Ingold die Ausbildung einer Gleichgewichtsreaktion an, in welcher ein Carotinylnradikal mit Sauerstoff reversibel zu einem β -Carotinperoxylnradikal reagiert.



Bei geringem Sauerstoffpartialdruck wird das Gleichgewicht nach links verschoben. Die Anzahl der kettenfortführenden β -Carotinperoxylnradikale wird verringert. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck dagegen verschiebt sich das Gleichgewicht nach rechts. Das entstehende β -Carotinperoxylnradikal ist für vermehrte radikalische Oxidation und somit für eine weniger effektive antioxidative Wirkung verantwortlich.

Eine weitere wichtige Studie zur Aufklärung der β -Carotinoxidation wurde von Mordt^[8] verfasst. Das entscheidende an dieser Studie war, dass mit Hilfe von HPLC-Chromatographie, neben der Autoxidation des β -Carotins, gleichzeitig die Bildung von verschiedenen Oxidationsprodukten verfolgt wurde. Als Primärreaktion wurde die Addition eines Peroxylradikals an das β -Carotin, unter Bildung eines β -Carotinperoxylnradikals **2**, angenommen. Diese Reaktion ist in Abbildung 1.1 veranschaulicht.

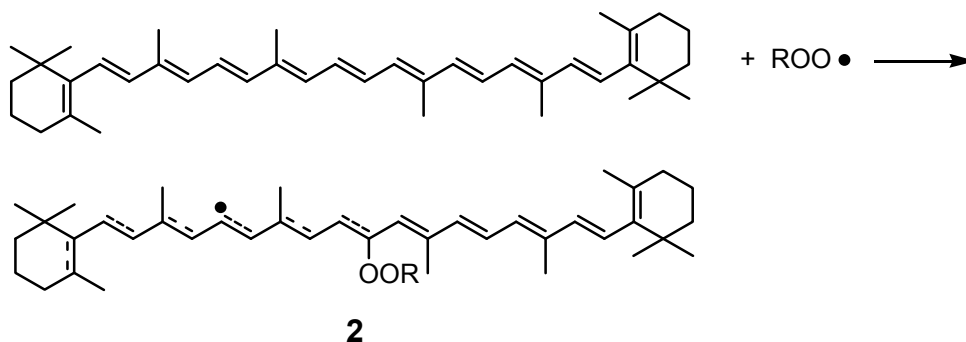


Abbildung 1.1

Ausgehend von dem primären Oxidationsprodukt dem β -Carotinperoxyradikal **2** erhält man eine Fülle stabiler sekundärer Produkte. So konnten Kennedy und Liebler^[9] in einer radikalisch-induzierten Oxidation von β -Carotin mittels HPLC-Chromatographie die Bildung von Carotinoidepoxiden nachweisen. In Abbildung 1.2 ist beispielhaft die Bildung eines β,β -Carotin-5,6-epoxids **3** aus dem β -Carotinperoxyradikal gezeigt.

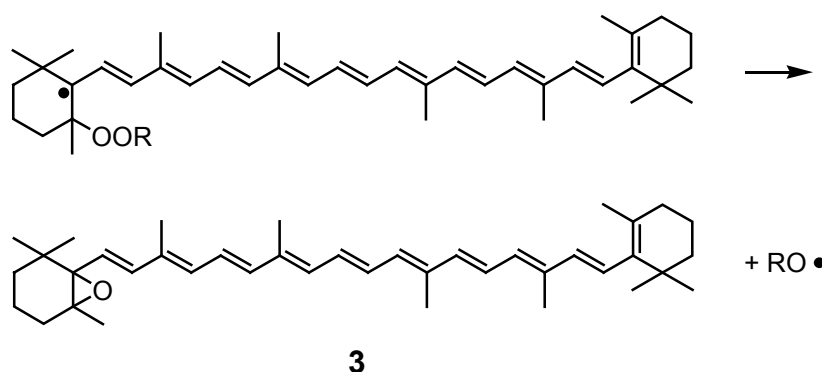


Abbildung 1.2

Zudem ist das Carotinperoxyradikal **2** in der Lage, durch Addition von weiterem Sauerstoff und β -Carotinmolekülen zu polymerisieren. Dabei wird ein Peroxo-Oligomer **4**^[10] ausgebildet, welches die Abbildung 1.3 zeigt.

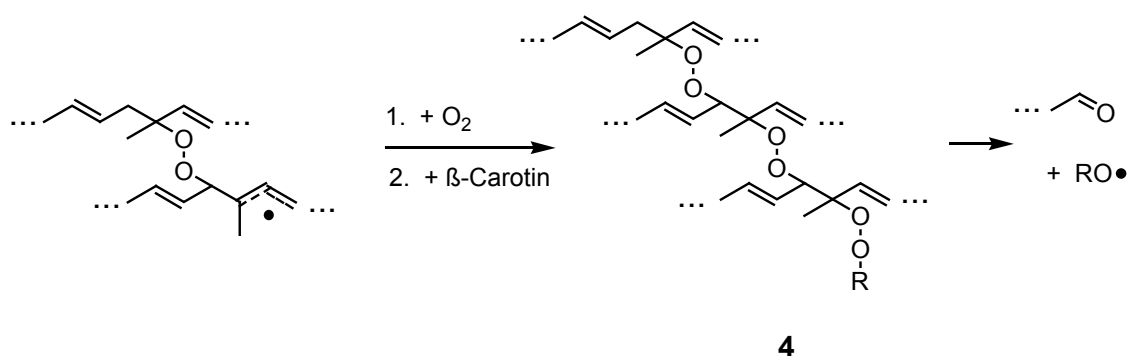


Abbildung 1.3

Man kann der Abbildung 1.3 entnehmen, dass das Peroxo-Oligomer schließlich in Aldehyd- (und) oder Ketokomponenten zerfällt. Diese „Breakdown“-Reaktion führt zu einer wichtigen Stoffklasse an Abbauprodukten, den Apo-Carotinolen. Die Wichtigkeit der Detektion und Analyse von Apo-Carotinolen ergibt sich aus ihrer Funktion, als Indikatoren den primären Polykettenangriff anzuzeigen. Die Interpretationen zu den Reaktionen der Apo-Carotinolen wurden insbesondere von Mordl^[8], Krinsky^[11] und Handelman^[12] verfasst. Als Beispielreaktion sind in Abbildung 1.4 die Polyketten-Zerfallsprodukte Apo-10'- β -Carotinal **5** und β -Ionon **6** gezeigt.

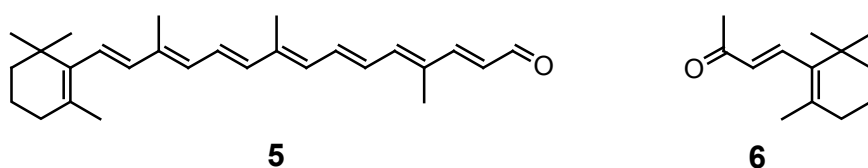


Abbildung 1.4

Ferner sei die Arbeit von Kanasawud und Crouzet^[13] angeführt, in welcher die Bildung von kleinen und flüchtigen Ketonen und Aldehyden, wie zum Beispiel dem β -Ionon **6**, untersucht wurde. Die Bedeutung dieser Studie liegt in der Quantifizierung der leicht flüchtigen Substanzen, um eine möglichst vollständige Produktbilanz einer Gesamt-Carotinoidoxidation aufzustellen.

Zur Bildung der Apo-Carotinalen wurde ein weiterer Mechanismus vorgeschlagen^[8]. Dabei addiert ein Carotenylradikal ein Molekül Sauerstoff und zerfällt über eine dioxetanische Zwischenstufe in die entsprechenden Apo-Carotinalen (Abbildung 1.5).

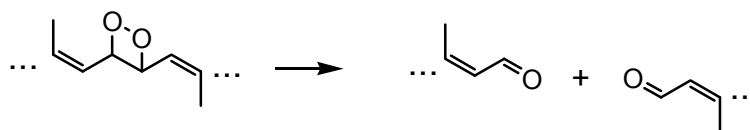
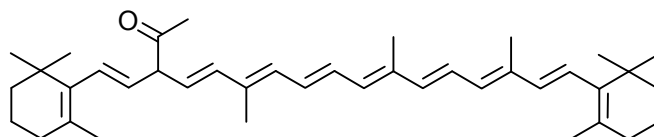


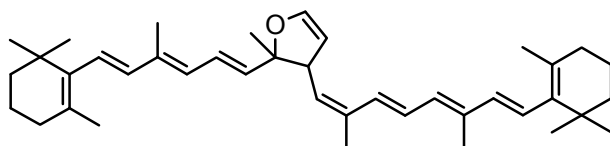
Abbildung 1.5

Es existieren zahlreiche weitere Untersuchungen^[14,15,16], welche sich mit den Abbauprodukten, der Autoxidation oder mit induzierten Oxidationsreaktionen des β -Carotins beschäftigen. Als wichtigste Abbauprodukte seien die Apo-Carotinalen, das 5,6-Epoxid, das 5,6-5',6'-Diepoxid und das 5,8-Epoxid angeführt. Gleichwohl gibt es Untersuchungen mit außergewöhnlichen Zerfallsprodukten und speziellen Funktionalisierungen an Carotinoiden.

Erwähnt werden sollen zwei Arbeiten, welche die Isolierung außergewöhnlicher Zerfallsprodukte der β -Carotinoxidation beschreiben. In der Arbeit von Yamauchi^[17] wurden, in einer radikalisch-induzierten β -Carotinoxidation, die folgenden Verbindungen beschrieben: Das Methylgruppen-Oxidationsprodukt, ein β,β -Carotin-formylderivat **7**, und das Ketten-Oxidationsprodukt, ein Furanderivat **8**.

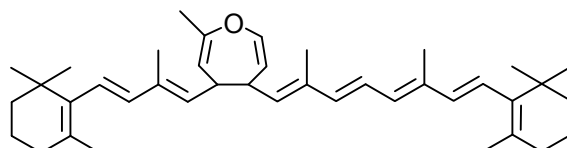


19-Methyl-19-oxo-10-nor- β,β -Carotin **7**



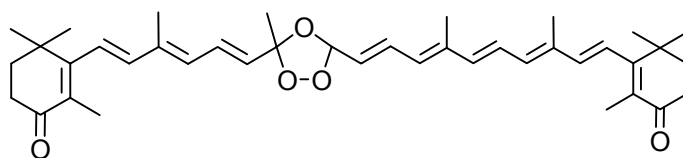
13,15'-Epoxyvinyleno-13,15'-dihydro- β,β -Carotin **8**

In einer β -Carotinoxidation mit Percarbonsäuren konnte Pfander^[18] das Dihydro-Oxepin **9** nachweisen.



11,15'-Dihydrooxepin- β,β -Carotin **9**

Ferner konnte Pfander^[19] bei der Oxidation von Canthaxanthin (4,4'-Diketo- β,β -Carotin) mit Percarbonsäuren erstmals das Ozonid **10** isolieren.



13,14-(cis/trans)-Canthaxanthin-13,14-ozonid **10**

1.3 Biochemische *in vivo* Messverfahren

Es ist schon lange bekannt, dass Reaktionen von „freien Radikale“ in allen Lebensprozessen zu Schädigungen einzelner Zellbestandteile führen können. Besonders die Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können mit Proteinen, Lipiden oder der DNA reagieren. Proteine werden durch Radikaleinwirkung oxidiert. Die entstandenen Produkte enthalten modifizierte, beziehungsweise degradierte Aminosäuren. Durch die neu eingeführten funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Hydroxyl- oder Carbonylgruppen, werden zahlreiche Folgereaktionen induziert. Zu diesen Reaktionen gehören Proteinfragmentierungen oder „Crosslinks“, die mit einer Zerstörung der Tertiärstruktur und dem Verlust der Proteinfunktionalität einhergehen. Ebenso wie Proteine können durch ROS auch Lipide oxidiert werden. Die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren läuft als radikalische Kettenreaktion in den Zellmembranen ab und liefert als Hauptprodukt Lipidperoxide. Die Lipidoxidation führt zu strukturellen und funktionalen Veränderungen in den Membranen. Diese Oxidation spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von degenerativen Krankheiten und wird insbesondere für Alterungsprozesse verantwortlich gemacht. Durch freigesetzte Hydroperoxylradikale oder Alkoxyradikale der Lipidperoxidation werden weitere Zellschädigungen induziert. Hier ist besonders die Reaktion der Hydroperoxylradikale mit DNA-Basen zu nennen. Die entstandene DNA-Schäden stehen im Verdacht Promotoren der Kanzerogenese zu sein. Allgemein wird eine direkte Beteiligung der ROS an Prozessen der Initiation und Promotion von Krebserkrankungen vermutet. Es können DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche resultieren, auch treten komplette Basenverluste auf. Der Großteil oxidativer DNA-Schäden sind aber modifizierte DNA-Basen, welche direkt aus Radikalreaktionen hervorgehen. Dabei sind über 100 verschiedene oxidative DNA-Basenmodifikationen bekannt. Betroffen sind Purin-Basen wie auch Pyrimidin-Basen. Im zentralen Interesse steht nun *in vivo* Messmethoden zu entwickeln, um diese oxidativen Schädigungen nachzuweisen und zu quantifizieren. Außerdem wird nach Wirkungsmechanismen von Antioxidantien, wie zum Beispiel den Carotinoiden geforscht, um diese oxidativen Belastungen wirksam zu unterdrücken.

Es ist notwendig, über *in vivo* Testmethoden den Verbrauch an antioxidativ wirkenden Substanzen zu ermitteln. So kann eine konkrete Bedarfsfeststellung, beispielsweise für eine optimale Carotinoidkonzentration im menschlichen Plasma, zur Bekämpfung einzelner Krankheiten bestimmt werden.

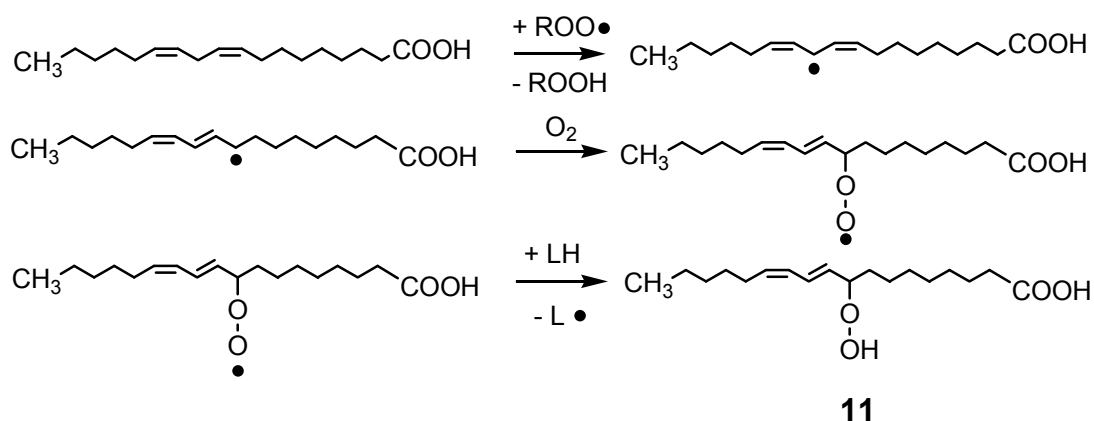
Dieses Kapitel fasst in den ersten Teilen wichtige und zuverlässige Routinemessverfahren zur Feststellung von Oxidationen an den drei oxidativ veränderbaren Hauptzellbestandteilen zusammen:

- Teil 1.3.1: Lipide
- Teil 1.3.2: DNA , DNA-Basen
- Teil 1.3.3: Proteine

Im Teil 1.3.4 werden einige Messungen vorgestellt, die sich zur *in vivo* Bestimmung von antioxidativen Kapazitäten eignen. Eine vertiefende Diskussion wird in den Folgekapiteln dieser Arbeit geführt, in dem eigene *in vitro* Oxidationsmessungen und Interpretationen der Carotinoidmessungen dargestellt werden.

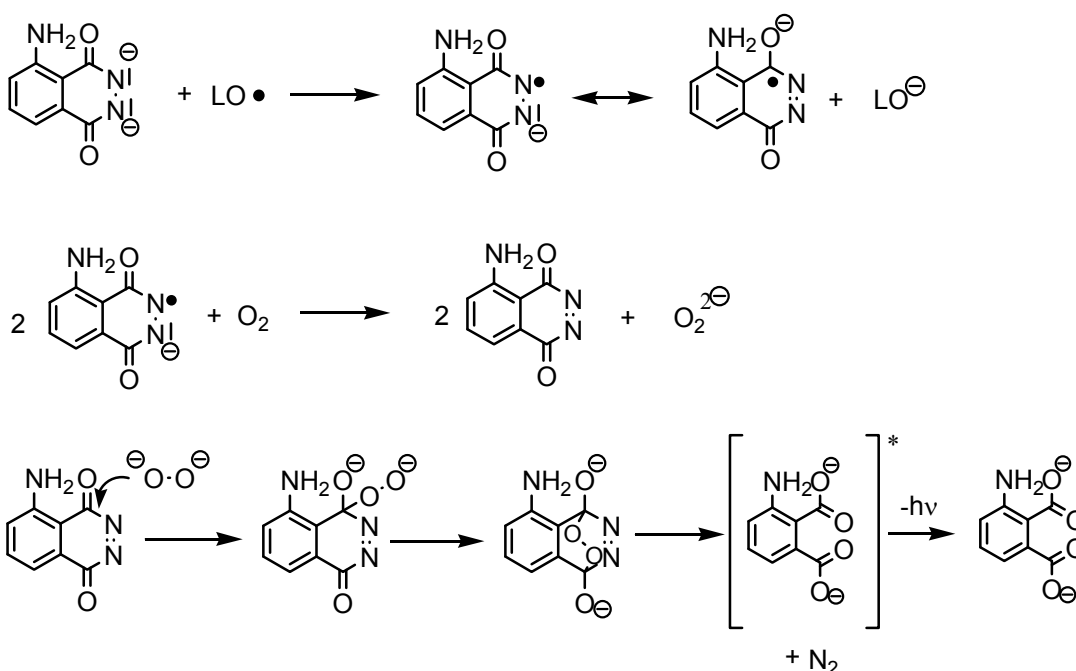
1.3.1 *In vivo* Verfahren zur Bestimmung von oxidativen Schäden bei Lipiden

Bei der radikalischen Oxidation von Lipiden LH werden Lipidperoxide LOOH **11** nach folgendem Schema gebildet:





Die eigentliche Chemilumineszenzreaktion besteht in der Oxidation des Luminols zu der elektronisch angeregten 3-Aminophthalsäure*. Diese kehrt unter Abgabe von Licht der Wellenlänge $\lambda = 425 \text{ nm}$ in den Grundzustand zurück. Es läuft die folgende Oxidation ab:



In Abbildung 1.6 ist der schematische Versuchsaufbau der post-column Chemilumineszenz-Detektion gezeigt. Das entstehende Licht wird in einem Sekundärelektronenvervielfacher registriert und verstärkt. Zur Steigerung der Lichtempfindlichkeit wird ein Hohlspiegel eingesetzt, welcher die Lichtausbeute der empfindlichen Chemilumineszenzreaktion steigert. Das Verfahren ist auch zur quantitativen Analyse geeignet.

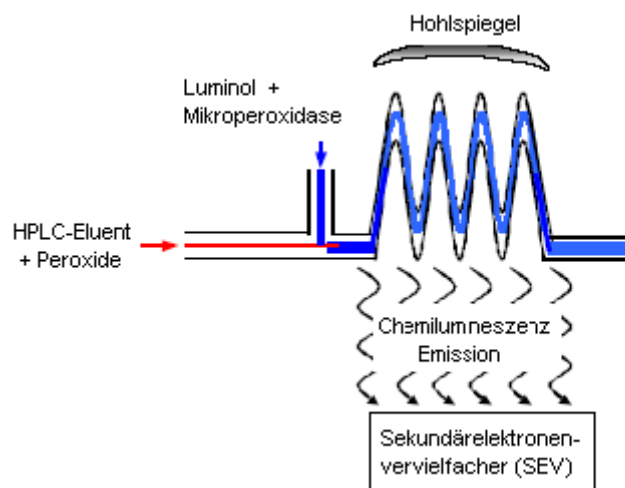
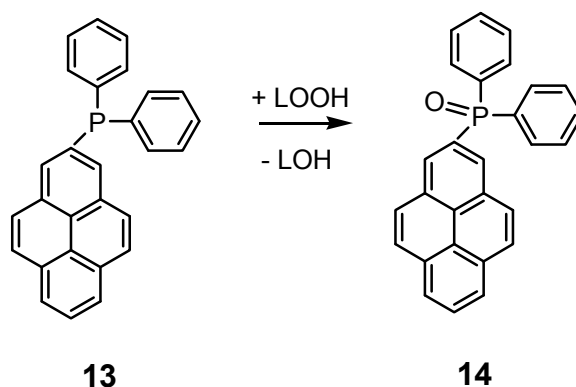


Abbildung 1.6

Eine fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Lipidperoxidation wurde von Akasaka^[21] entwickelt. Bei dieser Methode werden die Lipidperoxide zunächst HPLC-chromatographisch isoliert und über Fluoreszenzspektroskopie quantifiziert. Es wird ein Phosphan, das Diphenyl-1-pyrenylphosphan **13** zugesetzt. Bei der Oxidation des Phosphans durch das Lipidperoxid entsteht das Phosphanoxid **14**, dieses fluoresziert nach Anregung bei $\lambda = 380 \text{ nm}$.

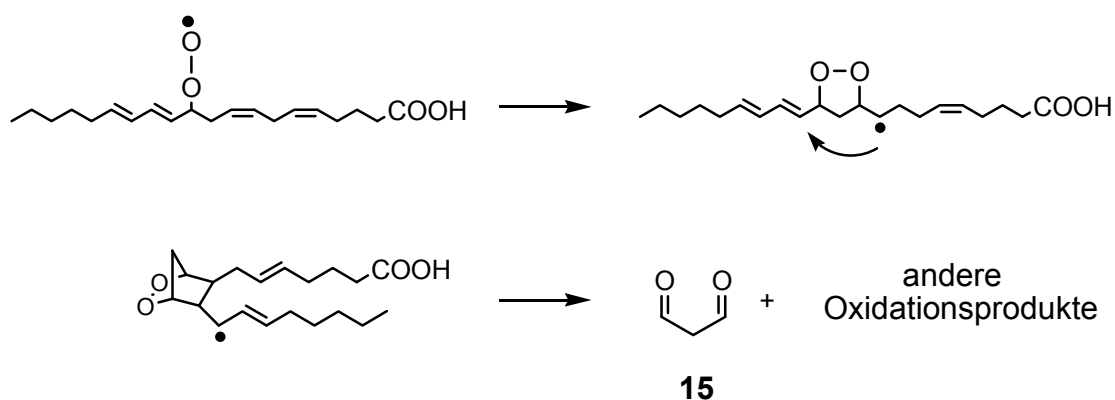


Das Akasaka-Verfahren eignet sich jedoch nicht uneingeschränkt zur Lipidperoxidbestimmung, da schon geringste Mengen an freiem Sauerstoff die Empfindlichkeit der Analysemethode stören.

Das dritte Verfahren ist die elektrochemische Detektion von Lipidperoxiden. Das Grundprinzip der elektrochemischen Detektion basiert auf der Oxidation oder Reduktion des Analyten durch Anlegen einer Spannung. Messgröße ist der geflossene elektrische Strom, welcher über das Faraday'sche Gesetz auch zur quantitativen Substanzbestimmung eingesetzt werden kann. Eine klassische Versuchsanordnung, welche auf Korytowski^[22] zurückgeht, ist die polarographische Phospholipidperoxid-Abscheidung an einer Quecksilber-Tropf-Elektrode (**D**ropping **M**ercury **E**lectrode **DME**). Moderne elektroanalytische Techniken beruhen hauptsächlich auf der Methode der coulometrischen Array-Detektion. Hier sind einer HPLC-Trennsäule post-column mehrere elektrochemische Zellen nachgeschaltet. Gestört wird das Ergebnis der coulometrischen Bestimmung durch die unvollständige Reduktion der Lipidperoxide und der Bildung von reaktiven Alkoxyradikalen:

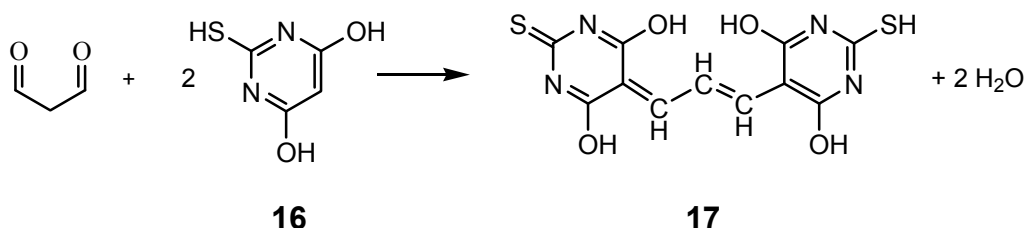


Ein weiterer wichtiger Nachweis der Lipidperoxide ist der Thiobarbitursäure-Test (TBAR-Test). Dieses Testverfahren gehört zu den indirekten Nachweismethoden. Nachgewiesen wird in diesem Test der Malondialdehyd **15**, welcher ein Abbauprodukt der Lipidperoxidbildung ist^[23].



Der Malondialdehyd reagiert mit der 2-Thiobarbitursäure **16** zu dem Thiooxonolfarbstoff **17**. Dieser rote Farbstoff kann photometrisch bei $\lambda = 532$

nm oder über Fluoreszenzmessungen bei $\lambda_{\text{Emission}} = 555 \text{ nm}$ vermessen werden^[24].



Der Test lässt sich in seiner Genauigkeit erhöhen, wenn der Malondialdehyd HPLC-chromatographisch isoliert wird, und erst in einer nachfolgenden Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure versetzt wird^[25]. Der Nachteil dieser Isolierung ist die sehr komplexe Aufarbeitung des biologischen Materials, und die Abtrennung vieler aldehydischer Oxidationsprodukte.

Ein junges Verfahren zur Quantifizierung der *in vivo* Lipidperoxidation ist die Isolierung der Isoprostane. Sie besitzen den Vorteil, dass die Isoprostane als „Biomarker“ direkte Endprodukte der Lipidperoxidation sind. Die Isoprostane leiten sich von den Prostaglandinen ab. Diese sind charakteristische Produkte aus der enzymatischen Lipidperoxidation. Prostaglandine gehören zur Klasse der ungesättigten Hydroxy- oder Hydroxyketosäuren bestehend aus 20 C-Atomen, und einem Cyclopentanring. Das Grundgerüst veranschaulicht die Prostansäure **18**.



Das Prostaglandin PGF_{2α} **19** stellt ein für den menschlichen Körper wichtiges Oxidationsprodukt der Arachidonsäurekaskade dar. Neben dieser enzymatisch gesteuerten Kaskadenoxidation entstehen, über die vermehrte Einwirkung von Sauerstoffradikalen, die Isoprostane. Es wird eine gesteigerte Oxidation angezeigt. Die genauesten Untersuchungen erfolgten zu dem (Iso)-Prostan des F-Typs **19**. Die wichtigsten, bis heute detektierten, Isoprostane **20-23** zeigt die Abbildung 1.7 ^[26].

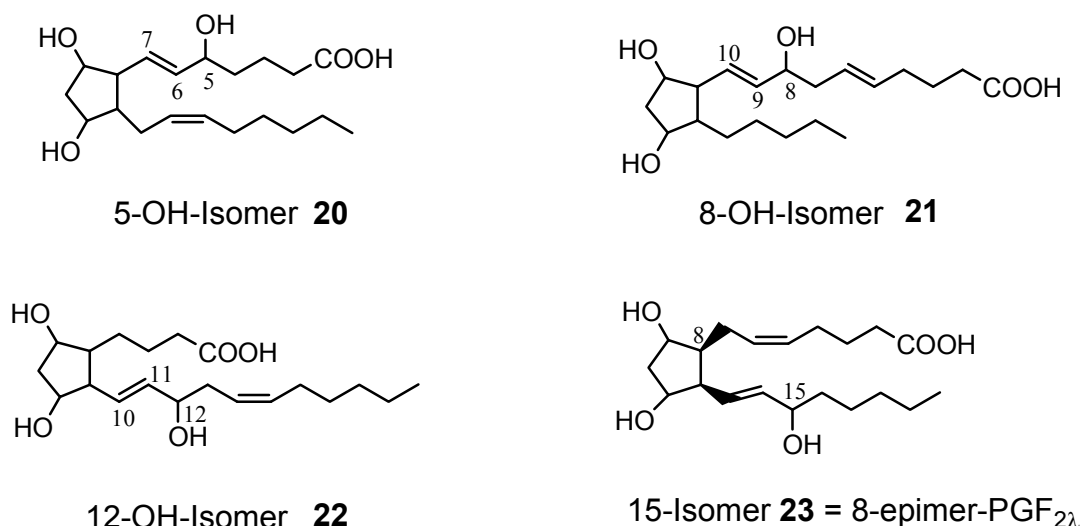


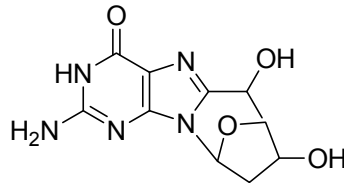
Abbildung 1.7

Die Isoprostanbildung kann antioxidativ nur schwer unterdrückt werden und steht im Verdacht, ein auslösender Faktor der Alzheimer Krankheit^[27] zu sein. Isoprostane können im menschlichem Gewebe, dem Urin und dem Plasma nachgewiesen werden. Detektiert werden sie über HPLC-MS-Kopplung. Nachteilig ist, dass die Isoprostane sehr instabil sind und vor Weiteroxidation, insbesondere während der Aufarbeitung des biogenen Materials, geschützt werden müssen^[28].

1.3.2 *In vivo* Verfahren zur Bestimmung von oxidativen Schäden bei DNA, DNA-Basen

Der Großteil oxidativer DNA-Schäden zeigt sich anhand modifizierter DNA-Basen. Einige modifizierte Purinbasen, wie auch modifizierte Pyrimidinbasen sind in den Abbildungen 1.8 und 1.9 dargestellt. Derart veränderte DNA-Basen können aus nahezu allen biologischen Quellen gewonnen werden. Sie sind exzellente Biomarker und zeigen schädigende Oxidationsreaktionen an. Die Veränderung des Guanins durch radikalische Oxidation tritt am häufigsten auf^[29]. Die analytisch größte Bedeutung wird dem 7,8-Dehydro-8-oxoguanin **24** (8-Oxoguanin, oft auch 8-Hydroxyguanin) beigemessen, da es die am häufigsten auftretende Basenveränderung ist. 8-Oxoguanin entsteht durch

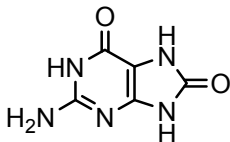
Addition von Hydroxyl-Radikalen an den Kohlenstoff C-8 des Guanins. Bei der DNA-Replikation paart 8-Oxoguanin mit Adenin und führt so zu G:C → T:A Transversionen. Selten werden modifizierte Nucleoside (Base + Zucker) isoliert. Das einzig bedeutsame Produkt ist das 8,5'-cyclo-2'-Desoxyguanosin **25**.



25

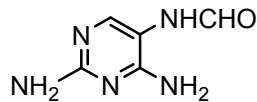
Durch Oxidation modifizierte Purinbasen:

Guanin-Derivate



24

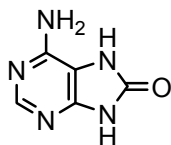
8-Oxoguanin



26

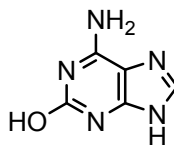
2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin

Adenin-Derivate



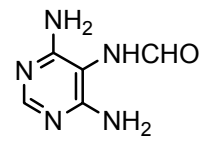
27

8-Oxoadenin



28

2-Hydroxyadenin



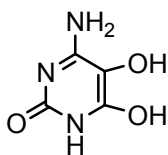
29

4,6-Diamino-5-
formamindopyrimidin

Abbildung 1.8^[30]

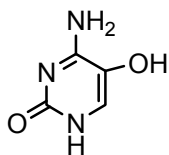
Durch Oxidation modifizierte Pyrimidinbasen:

Cytosin-Derivate



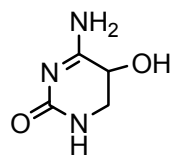
30

5,6-Dihydroxy-
cytosin



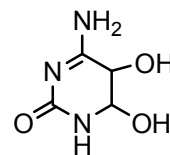
31

5-Hydroxycytosin



32

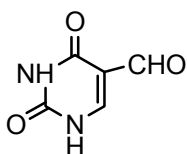
5,6-Dihydro-5-
Hydroxycytosin



33

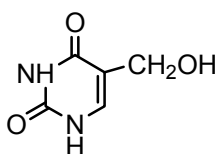
Cytosineglycol

Thymin-Derivate



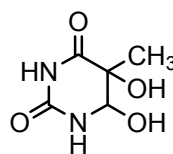
34

5-Formyluracil



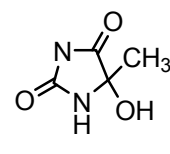
35

5-Hydroxymethyl-
uracil



36

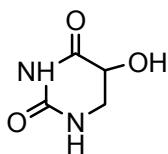
Thymineglycol



37

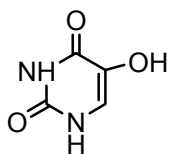
5-Hydroxy-5-
methylhydantoin

Uracil-Derivate



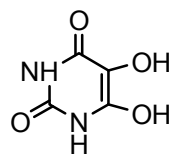
38

5,6-Dihydro-5-
hydroxyuracil



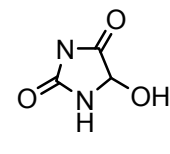
39

5-Hydroxyuracil



40

5,6-Dihydroxy-
uracil



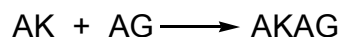
41

5-Hydroxy-
Hydantoin

Abbildung 1.9 ^[30]

Die modifizierten DNA-Basen müssen in sehr aufwendigen Präparationen isoliert werden. Dazu gehört die Extraktion der DNA aus dem Zellmaterial, die Isolierung der DNA und die anschließende Lysierung der DNA. Die einzelnen Basen werden HPLC-chromatographisch vorgereinigt und mittels elektrochemischer Detektion, Immunochromatographie oder Gaschromatographie aufgetrennt. Wird eine gaschromatographische Bestimmung angewendet, werden die veränderten Purin- und Pyrimidinbasen zunächst in ihre silylierten Derivate überführt. Diese besitzen dann eine höhere Affinität zur stationären Phase und können bei mäßigeren Temperaturen aufgetrennt werden. Der gaschromatographischen Trennung folgt eine Analyse durch ein Massenspektrometer. Die Einzelsubstanzen werden über ihre Molmassen $[M+x\text{-Silyl}]$ identifiziert^[31]. Bei einer quantitativen Analyse müssen dem Zellmaterial, vor der DNA Aufbereitung, radioaktiv markierte Nucleoside einer bekannten Konzentration zugegeben werden. Anhand der Verluste an radioaktiv markiertem Material kann man in einem Autoradiogramm die Basenverluste während der Aufarbeitung feststellen.

Immunochemische Methoden werden mit dem ELISA-Test (enzyme-linked-immunosorbent-assay) durchgeführt. Allgemein wird in einer Immunreaktion die außerordentlich hohe Spezifität von Antikörpern für ein bestimmtes Antigen ausgenutzt, um dieses selektiv in einem Gemisch mit einer hohen Empfindlichkeit nachzuweisen. Dabei kann ein Antigen nicht nur nachgewiesen, sondern auch quantifiziert werden. Bei der Reaktion des Antikörpers (AK) mit dem Antigen (AG) bildet sich ein stabiler Antigen-Antikörper-Komplex aus (AKAG):



Um diese Reaktion sichtbar zu machen, muss an einem Reaktionspartner ein nachweisbarer Marker vorhanden sein. Man benutzt in der Regel einen zweiten Antikörper (AK2), der mit dem ersten Antikörper (AK1 primärer Antikörper, jetzt als Antigen wirkend) spezifisch reagiert. An diesem sekundären Antikörper ist ein Marker (*) angebracht:



Es gibt verschiedene Markierungsmöglichkeiten, wobei natürlich sichergestellt sein muss, dass durch die Markierung die Bindungseigenschaften zwischen Antigen und Antikörper nicht beeinflusst werden:

- Radioaktive Markierung (Radio-Immuno-Assay, RIA)
- Kopplung an ein Enzym und Nachweis mit Hilfe der enzymatischen Aktivität (Enzym-Immuno-Assay, EIA)
- Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszenz-Immuno-Assay, FIA)
- Kopplung an Substanzen, die mit Hilfe bio- oder chemiluminenszenz-photometrischer Methoden meßbar sind (Lumineszenz-Immuno-Assay, LIA)

Ein heterogener ELISA-Test ist die Durchführung der Immunreaktion an einer Festphase. Als Festphase werden Mikrotiterplatten mit einer Polystyrolbeschichtung eingesetzt. An diese Oberfläche werden monoklonale Antikörper, spezifiziert auf 8-Oxoguanin^[32], gebunden. Nach Inkubation und Abspülen von überschüssigem Primärantikörper, erfolgt die Detektion über die Bindung mit einem zweiten spezifischen Antikörper, an welchem kovalent ein Enzym gebunden ist. Der Substratumsatz, folglich die Bildung eines Farbstoffes durch das Enzym, läßt sich einfach photometrisch bestimmen. Für die quantitative Bestimmung, bei dem hier vorgestellten ELISA-Prinzip, ist die Menge an Enzym proportional zu der Menge an gebundenem Serumantikörper. Die Enzymmenge wiederum ist direkt proportional zum Substratumsatz/Zeit. Damit ist die Menge an umgesetztem Substrat proportional zur Menge an gebundenem Primär-Antikörper. Der Substratumsatz ist damit die Meßgröße, die zur quantitativen Bestimmung des Gehalts an Serumantikörpern herangezogen wird. Für die enzymatische Substratreaktion sind zwei Enzyme gebräuchlich, die alkalische Phosphatase oder die Meerrettich-Peroxidase. Beide Enzyme zeichnen sich durch sehr hohe Katalyseaktivitäten aus und sind relativ stabil. Durch die von den Enzymen katalysierte Reaktion wird ein farbloses Substrat in einen Farbstoff umgewandelt. Die Konzentration des Farbstoffes wird dann in einem speziellen Photometer („ELISA-Reader“) gemessen.

Der Comet Assay (Einzelzellmikrogelelektrophorese) ist eine weitere Methode zur *in vivo* Bestimmung von DNA-Schäden. Hierbei können sowohl Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA nachgewiesen werden. Die DNA wird in Agarose eingebettet und einem alkalischen Milieu ausgesetzt, was zum Aufbruch der Wasserstoffbrücken führt und die Einzelstränge freilegt. Im elektrischen Feld wandern die Bruchstücke der DNA in Richtung der Anode und bilden einen Schweif aus, während die intakte DNA im Kern verbleibt^[33]. Nach Anfärbung der DNA wird das Maß der Schädigung (Tailmoment) aus dem Produkt % DNA im Schweif und der Lauflänge ermittelt, welches direkt mit der Anzahl der Strangbrüche korreliert. Das entstandene Bild gleicht einem Cometen, daher der Name „Comet Assay“ (Abbildung 1.10).

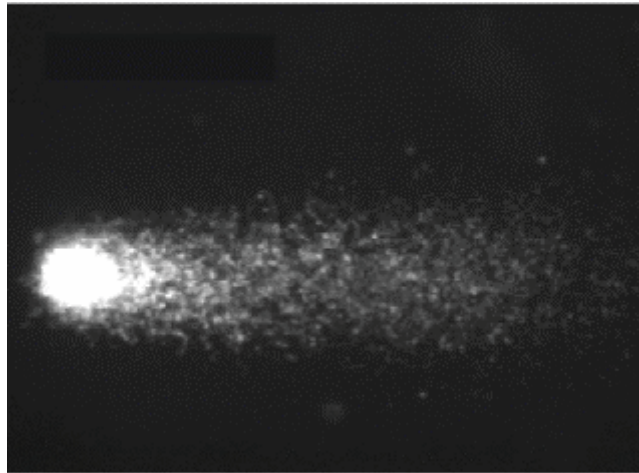


Abbildung 1.10^[33]

Die zur Zeit wohl empfindlichste Methode zum Nachweis von DNA-Addukten, oder oxidativen Veränderungen, ist das Anfang der achtziger Jahre von Randerath^[34] entwickelte ³²P-postlabeling-Verfahren. Die Methode wird heutzutage in einer modifizierten Version verwendet. Die zu untersuchende DNA wird nach ihrer Isolierung enzymatisch in ihre Mononukleotide hydrolysiert. Dazu wird eine Mono-Nuklease (MN) und eine spezielle Phosphodiesterase (SVPD^[35]) eingesetzt, was zur Bildung von unmodifizierten Mononukleosid-3'-monophosphaten führt. Veränderte Nukleotide können durch die spezielle Phosphodiesterase nicht an 5'-Position lysiert werden und fallen als Dinukleosid-3'-monophosphate an. Im Anschluß an diese Hydrolyse wird die freie 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose, mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase mit einer

^{32}P -markierte Phosphatgruppe aus $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosintriphosphat verestert (Abbildung 1.11).

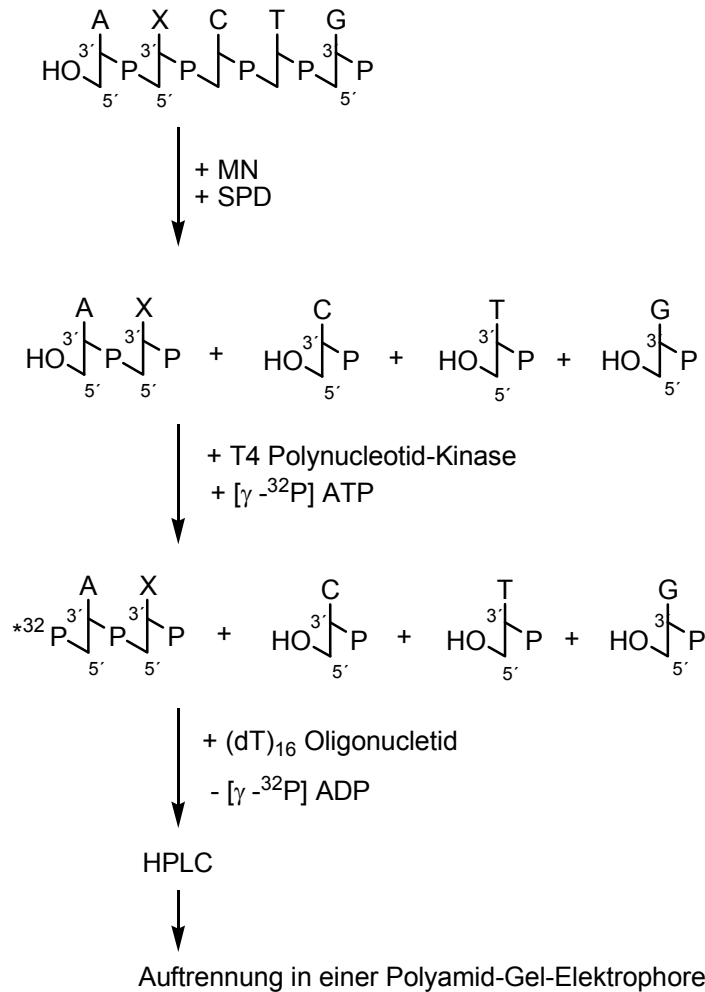


Abbildung 1.11: ^{32}P -postlabelling Protocol (x = veränderte Base)

Ein Überschuß an $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosintriphosphat wird durch zugesetztes Oligonukleotid und Polynukleotid-Kinase wieder vernichtet. Die so entstandenen radioaktiv markierten Mononukleotid-3'-5'-bisphosphate werden durch mehrdimensionale Chromatographie aufgetrennt und autoradiographisch entwickelt. Dadurch erhält man Addukt-Spots mit definiertem Laufverhalten, die zudem durch co-chromatographischem Vergleich mit Standardverbindungen bestimmten Veränderungen zugeordnet werden können^[36]. Alternativ können die markierten Nukleotide auch mittels HPLC aufgetrennt und durch on-line Radioaktivitäts-Detektion bestimmt werden^[37].

1.3.3 *In vivo* Verfahren zur Bestimmung von oxidativen Schäden bei Proteinen

Die oxidativen Veränderungen an Proteinen zu bestimmen, ist eine besondere Herausforderung. Bei Oxidation der DNA müssen vier oxidable Basen nachgewiesen werden. Wenn Nucleoside nachgewiesen werden sollen, kommt eine Zuckerkomponente hinzu. Die Anzahl der nachzuweisenden Verbindung bei der Proteinoxidation ist wesentlich höher, da Proteine aus 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind. Zudem ist die Konformation von Proteinstrukturen außerordentlich komplex.

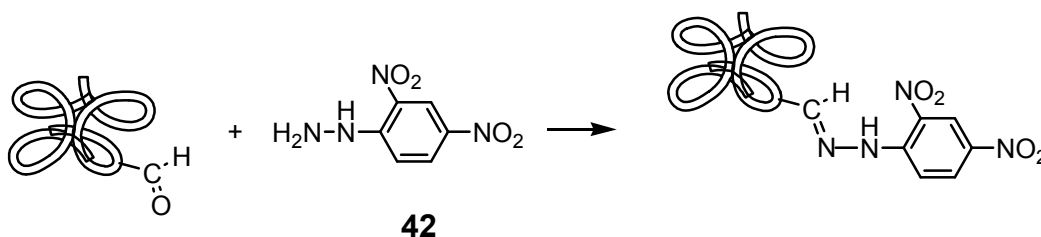
Oxidative Veränderungen werden allgemein durch veränderte spektroskopische Eigenschaften von Proteinen (Aminosäuren) gemessen.

Tabelle 1.1: Spektroskopische Daten intrinsischer Fluoreszenz aromatischer Reste von ausgewählten Aminosäuren

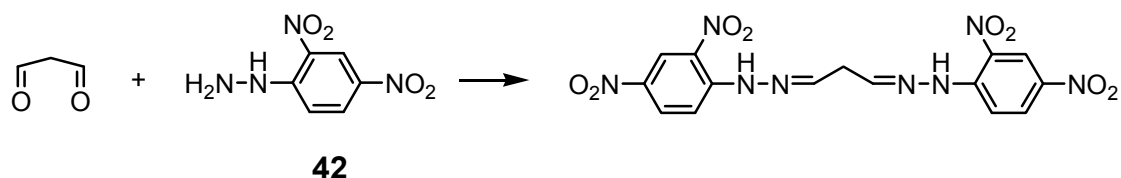
Chromophor (neutral, Lsm. H ₂ O, RT)	$\lambda_{\text{Anregung}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{Emission}} / \text{nm}$	Quanten- ausbeute Φ
Tryptophan ^[38]	280	340	0.20
Phenylalanin ^[39]	257	282	0.14
Tyrosin ^[40]	274	303	0.04

Ein häufig genutzter, aber unspezifischer Nachweis ist die UV-Vis-spektroskopische Detektion von oxidativ gebildeten C=O-Bindungen im Carbonyl-Assay.

Die produzierten Carbonylverbindungen werden direkt über veränderte Fluoreszenzen spektrometrisch (siehe Tabelle 1.1), oder UV-Vis-spektroskopisch durch Zugabe von Dinitrophenylhydrazin **42** nachgewiesen.



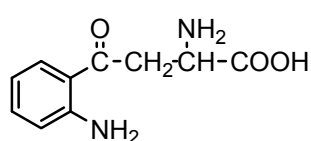
Durch das Dinitrophenylhydrazin **42** entsteht ein Protein-Dinitrophenylhydrazon-Farbstoff, welcher spektroskopisch bei $\lambda = 370$ nm nachgewiesen werden kann. Gestört wird dieser Nachweis jedoch durch Verunreinigungen in Form von kleinen reaktiven Carbonylverbindungen, wie sie auch in der Lipidperoxidation auftreten. Mit Dinitrophenylhydrazin reagieren diese Carbonylverbindungen ebenfalls in einer charakteristischen Farbreaktion mit $\lambda \approx 370$ nm^[41].



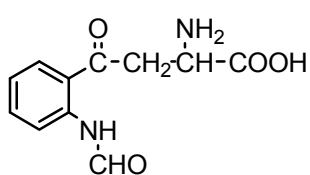
Als weitere Methode zur Detektion von Proteinoxidationen ist die spektroskopische Detektion von glykosylierten Proteinbestandteilen zu nennen^[42]. Der Nachteil dieser „Bräunungsreaktion“, welche auch beim Zubereiten von Speisen auftreten kann, liegt in ihrer geringen Spezifität.

Genauer beschreibt man Proteinoxidationen über die Quantifizierung direkter Oxidationsprodukte („Biomarker“). Nachfolgend sind die wichtigsten Oxidationsprodukte von Aminosäuren aufgelistet. In der Hauptsache sind die ROS Oxidationsprodukte aufgezeigt, für Tyrosin sind auch Nitro- **47** und Halogenaddukte **48** abgebildet.

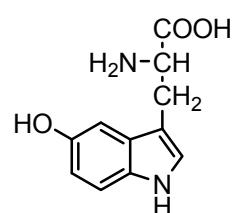
Tryptophan-Oxidationsprodukte



43
Kynurenin



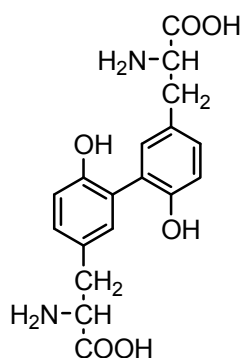
44
N-Formylkynurenin



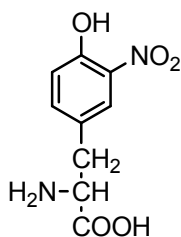
45
5-Hydroxytryptophan

Abbildung 1.12 (Teil1) Aminosäureoxidationsprodukte

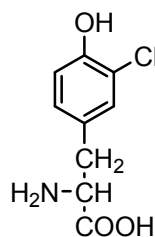
Tyrosin-Oxidationsprodukte



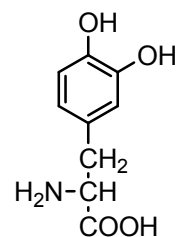
46
Dityrosin



47
3-Nitro-Tyrosin

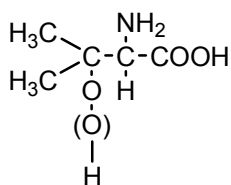


48
3-Chlor-Tyrosin



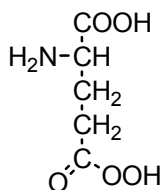
49
3,4-Dihydroxy-phenylalanin

Valin-
Oxidationsprodukt



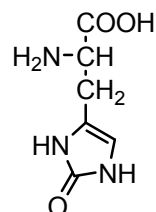
50
3-Hydroxyvalin

Glutaminsäure-
Oxidationsprodukt



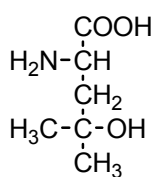
51
Glutaminpersäure

Histidin-
Oxidationsprodukt

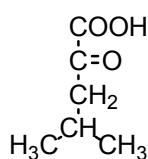


52
2,3-dihydro-2-oxo-1H-imidazol-4-yl-histidin

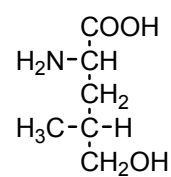
Leucin-Oxidationsprodukte



53
4-Hydroxyleucin



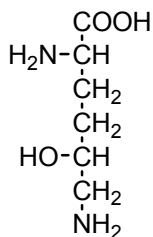
54
4-Methyl-2-oxo-pentansäure



55
5-Hydroxyleucin

Abbildung 1.12 (Teil2) Aminosäureoxidationsprodukte

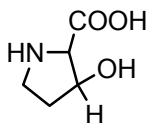
Lysin-Oxidationsprodukt



56

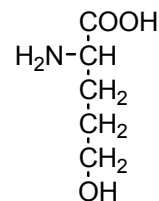
5-Hydroxylysin

Prolin-Oxidationsprodukte



57

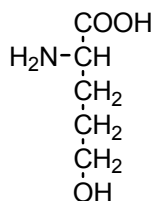
3-Hydroxyprolin



58

2-Amino-5-hydroxy-pentansäure

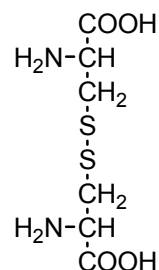
Arginin-Oxidationsprodukt



58

2-Amino-5-hydroxypentansäure

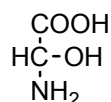
Cystein-Oxidationsprodukt



59

Cystin

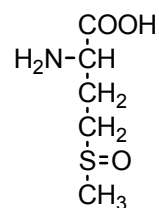
Glycin-Oxidationsprodukt



60

2-Hydroxyglycin

Methionin-Oxidationsprodukt



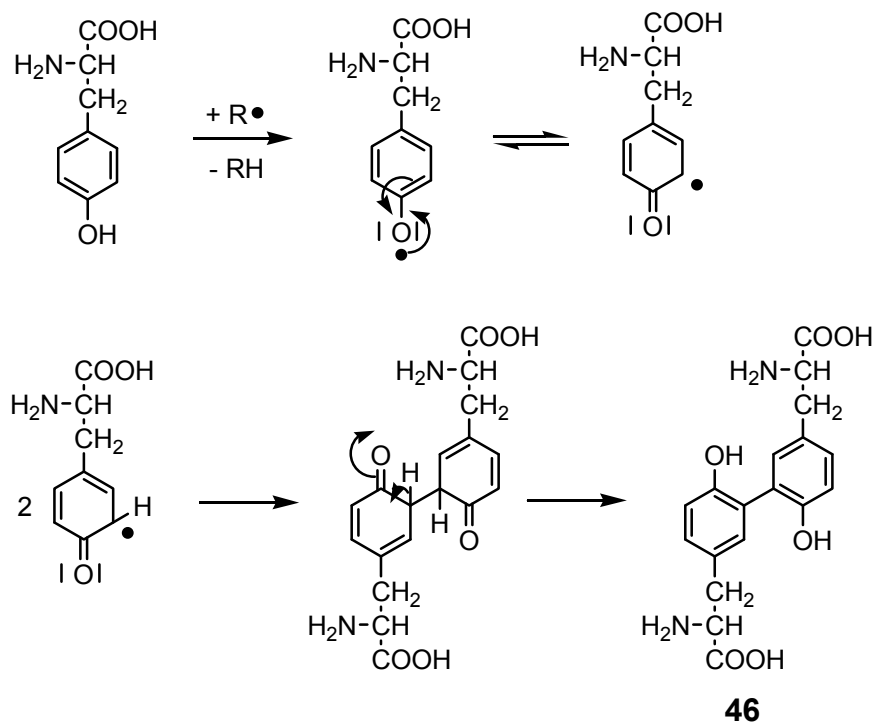
61

Methioninsulfoxid

Abbildung 1.13 Aminosäureoxidationsprodukte

Die Isolierung der Aminosäure-Oxidationsprodukte ist sehr aufwendig. Zuerst muss das Protein hydrolysiert werden. Dabei werden hauptsächlich zwei Verfahren angewendet. Die saure Spaltung in 6 M Salzsäure oder die enzymatische Spaltung mit zum Beispiel Pronase E oder Proteinase K^[36]. Bei der Aufarbeitung und Isolierung der modifizierten Aminosäuren ist das biologische Material vor weitergehender Oxidation zu schützen. Detektiert

werden die Aminosäure-Biomarker hauptsächlich durch HPLC-chromatographische Isolierung und gekoppelter massenspektroskopischer Detektion. Von besonderer Relevanz ist der Nachweis von oxidiertem Tyrosin. Der detektierte Biomarker ist ein Tyrosindimer, das Dityrosin **46**.



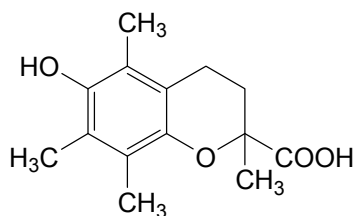
Die Trennung und Quantifizierung des Dityrosins geht auf Zhang^[43] zurück, und wird wie folgt vorgenommen: Tyrosin und Dityrosin werden mittels HPLC-Chromatographie getrennt. Verwendet wird eine C18 Reversed-Phase-Säule (Partisil ODS-3, 250 mm x 4,6 mm) sowie als mobile Phase ein Gemisch aus Methanol und Phosphatpuffer (pH = 3,0; v/v = 4 : 96). Die Konzentration an Tyrosin wird durch die UV-Absorbanz bei 280 nm gemessen, während die Dityrosinkonzentration über die Fluoreszenz des aromatischen Systems bei ($\lambda_{\text{Anregung}} = 284 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 410 \text{ nm}$) gemessen wird.

1.3.4 *In vivo* Verfahren zur Bestimmung von oxidativen Kapazitäten

Abschließend sollen *in vivo* Meßmethoden vorgestellt werden, die zur Bestimmung von antioxidativen Kapazitätsmessungen verwendet werden können. Die drei wichtigsten Meßprinzipien sind:

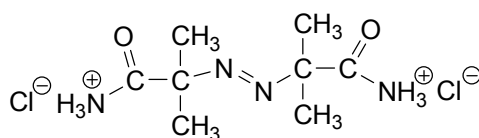
1. Assays in denen Radikale durch thermolytische Spaltung von Azoverbindungen freigesetzt werden, welche in einer Sauerstoffatmosphäre Peroxylradikale bilden. Zugesezte Antioxidantien deaktivieren die freigesetzten Radikale und verringern die Bildung von Peroxylradikalen. Das Maß der Leistungsfähigkeit des Antioxidans ist der verminderte Verbrauch von Sauerstoff. Wichtigster Vertreter ist der TRAP-Assay (total radical-trapping antioxidant parameter) nach Ingold^[44], in aktueller Version nach Wayner^[45].
2. Die zweite Methode basiert auf der radikalisch induzierten Oxidation und Chemolumineszenz von Luminol. Die Grundreaktion ist die Reduktion von Peroxid durch Peroxidase. Die Peroxidase oxidiert dabei das Luminol. Die Chemolumineszenz wird durch die Oxidation von Wasserstoffperoxid mit einem Luminolmolekül erzeugt. Zugegebene Antioxidantien vermindern die Oxidation des Luminols und setzen die Lumineszenz herab. Diese Messanordnung wird nach einer Vorschrift von Whitehead^[46] durchgeführt.
3. Die dritte Methode besteht im Einsatz von Farbstoffen oder Farbstoffradikalen. Bei Verwendung von Farbstoffassays werden die Farbstoffe in einer radikalischen Reaktion entfärbt. Zugesezte Antioxidantien verringern das Ausmaß der Entfärbungsreaktion. In Assays mit Farbstoffradikalen werden diese direkt mit Antioxidantien zur Reaktion gebracht. Antioxidative Kapazitätsmessung erfolgen über die Bestimmung der Absorbanzveränderungen der Farbstoffmoleküle beziehungsweise der Farbstoffradikale. Zu den wichtigsten Verfahren gehören der DPPH• 1,1'-Diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazinyl-Assay^[47] und der ORAC-Assay^[48].

Um ein relatives Maß für das antioxidative Verhalten angeben zu können werden diese Assays auf eine Standardsubstanz referenziert. Häufig wird das Trolox® **62**, ein Vitamin-E-Derivat, eingesetzt und der TEAC-Wert (Trolox equivalent antioxidant capacity)^[49] bestimmt.



62

Im derzeit angewendeten TRAP-Assay, welcher von Wayner^[45] beschrieben wurde, werden aus ABAP **63**,



63

2,2'-Azo-bis-(2-Amidopropan)-dihydrochlorid

Löslichkeit in Wasser 20°C 2.4 g/l, $k = 7.52 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 70°C^[50]

in einer sauerstoffhaltigen Lösung, Peroxylradikale gebildet. Oxidiert werden aus Plasma gewonnene Lipide oder als Standard Linolsäure selbst. Als Meßgröße dient der Sauerstoffpartialdruck, beziehungsweise die Menge an absorbiertem Sauerstoff.

Der TRAP-Assay wird wie folgt durchgeführt: Vorgelegt werden eine Lipidkomponente und eine auf antioxidative Wirksamkeit zu untersuchenden Substanz. Der Ansatz wird auf eine Temperatur von 37°C gebracht. Am Zeitpunkt T=0 min erfolgt die Zugabe des Radikalstarters. Die Lipidperoxidation wird durch die antioxidativ wirksame Substanz gehemmt, indem die gebildeten Radikale abgefangen werden. Durch die geringere Anzahl an Peroxylradikalen resultiert eine geringere Sauerstoffaufnahme. Im Assay nach Wayner^[45] wurden häufig Meßsubstanzen biologischen Ursprungs auf antioxidative Wirksamkeit getestet, wie z.B. Blutplasma. Das Zeitintervall der inhibierten Oxidation der Lipidkomponente, hervorgerufen durch das Blutplasma, wurde daher „T-Plasma“ genannt. T-Plasma beschreibt die verringerte Oxidations-

geschwindigkeit in dem Zeitintervall $T=0$ [min], bis zu einem Zeitpunkt $T = X$ [min], an dem die antioxidative Substanz vollständig verbraucht ist. Die Sauerstoffaufnahme entspricht ab diesem Zeitpunkt der reinen Lipidperoxidation. Dann wird zu diesem Ansatz Trolox gegeben. Das Trolox, als starkes phenolisches Antioxidans, inhibiert erneut die Lipidperoxidation und die Bildung von Peroxylradikalen. Wenn das Trolox quantitativ verbraucht ist (Zeitintervall T -Trolox [min]), wächst die Oxidationsgeschwindigkeit wieder bis auf den Betrag der uninhibierten Lipidperoxidation an. Der schematische Verlauf der Meßkurve ist in Abbildung 1.14 dargestellt.

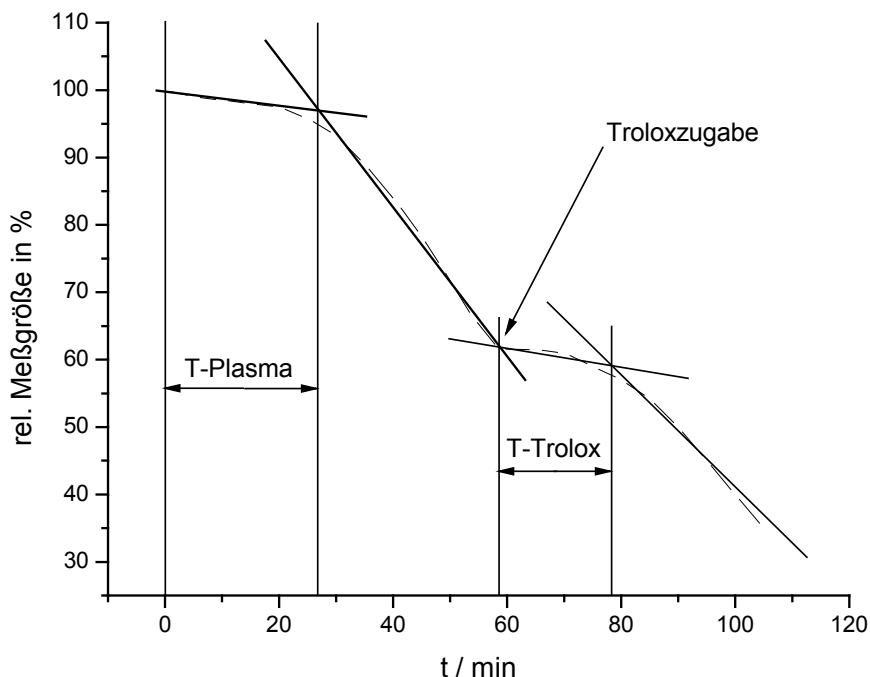


Abbildung 1.14: Schematischer Verlauf der Meßkurve im TRAP-Assay

Die Bestimmung der Kapazität erfolgt durch das Anlegen von Tangenten (Steigungen) im Zeitintervall nach Zugabe des Radikalstarters bis zum vollständigen Verbrauch der antioxidativen Substanz (T -Plasma). Gleiches gilt für die Trolozzugabe für das Zeitintervall der inhibierten Lipidperoxidation bis zur ungehemmten Oxidation (T -Trolox).

Die Auswertung erfolgt dann über den Vergleich der jeweiligen Oxidationsgeschwindigkeiten ausgedrückt durch das Verhältnis der Steigungen der Tangenten in den entsprechenden Zeitintervallen. Das TRAP Ergebnis wird ausgedrückt als $AOA = \text{Antioxidant Activity}^{[45]}$:

AOA: μmol an abgefangenen Peroxylradikalen pro Liter Plasma

$$AOA_{\text{TRAP}} = \frac{2.0 [\text{Trolox}] \times \text{T-Plasma} \times \text{V-Trolox}}{\text{T-Trolox} \times \text{V-Plasma}}$$

[Trolox] = Konzentration an Trolox (Standard 0.4 μM)

2.0 = Faktor 2 weil pro Molekül Trolox zwei Peroxylradikale vernichtet werden

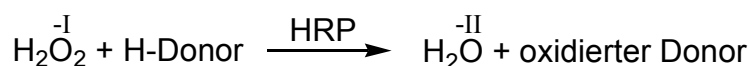
T-Plasma = graphisch bestimmt

T-Trolox = graphisch bestimmt

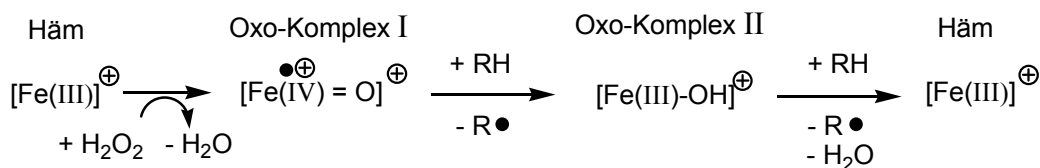
V-Plasma = Volumen der zugegeben Substanz

V-Trolox = Volumen Trolox

Die zweite Assaymethode^[46,51] basiert auf der Zersetzung von Wasserstoffperoxid durch das Eisen-Häm-Protein der Peroxidase (HRP = **H**orse-**R**adish-**P**eroxidase). Formal findet folgende Redox-Reaktion statt:



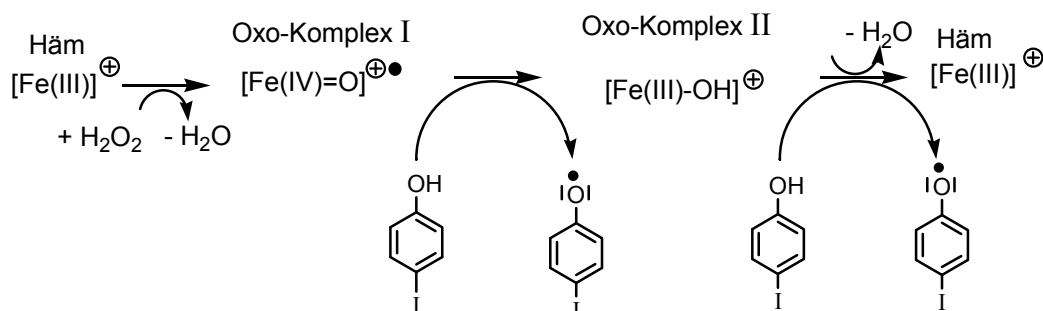
Der ablaufende Mechanismus ist kompliziert und soll kurz erläutert werden. Das reaktive Zentrum der HRP stellt ein Eisen-Porphyrin-Komplex dar. Im Gegensatz zu vielen anderen Eisen-Porphyrin-Komplexen, wie dem Hämoglobin oder den Cytochromen, reagiert das Eisen in der Peroxidase aus der Oxidationsstufe +III. Die Reduktion von Wasserstoffperoxid erfolgt durch Bildung des Oxo-Komplexes I der Peroxidase. Wasserstoffdonoren (RH) reduzieren den Oxo-Komplex II und bilden die Peroxidase zurück.



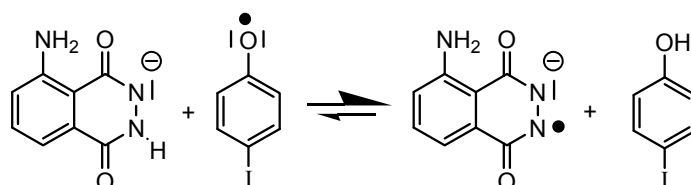
Als Wasserstoffdonor fungiert das Luminol. Der Wasserstofftransfer von Luminol auf die Oxo-Komplexe der Peroxidase ist jedoch kinetisch gehemmt. Die resultierenden Lumineszenzausbeuten sind gering. Um die Empfindlichkeit der Chemolumineszenzreaktion zu erhöhen werden im Assay nach Whitehead Lumineszenzverstärker^[52] zugesetzt.

Bei den Lumineszenzverstärkern (Enhancern) handelt es sich um Halogenphenole, wie zum Beispiel p-Jodphenol. Die Lumineszenzverstärker müssen folgende Eigenschaften erfüllen:

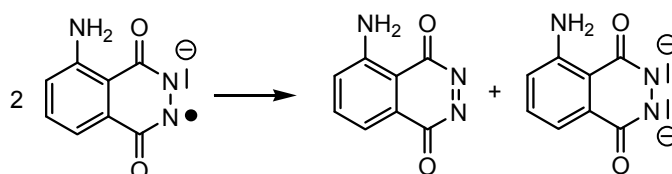
(a) Sie müssen leicht von der Peroxidase oxidiert werden. Der Wasserstofftransfer auf die Oxo-Komplexe darf nicht gehemmt sein.



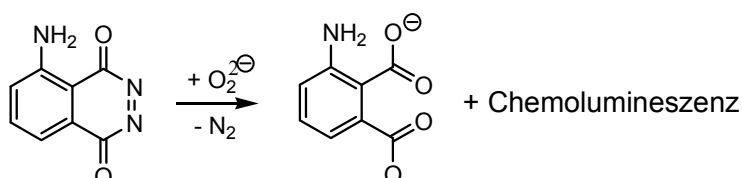
(b) Das Reduktionspotential der Halogenphenole muss so niedrig sein, dass Luminol quantitativ zu Luminyl-Radikalen oxidiert wird.



In einer anschließenden Disproportionierungsreaktion aus zwei Luminyl-Radikalen wird ein Molekül Luminol und ein Molekül Phthal-Diazachinon gebildet.



Erst die gebildete Diazachinonverbindung zeigt bei der Oxidation mit Wasserstoffperoxid die charakteristische Lumineszenz bei $\lambda = 420 \text{ nm}$.



Das Meßprinzip der Kapazitätsbestimmung durch zugesetzte Antioxidantien besteht in der Deaktivierung von radikalischen Verstärkermolekülen, gemessen über eine verringerte Chemolumineszenz-Ausbeute.

Der Lumineszenzassay wird wie folgt durchgeführt und ausgewertet: Zunächst erfolgt die Aufnahme einer Eichgeraden des Systems mit Trolox **62** als Antioxidans. Es wird die Signalunterdrückungszeit (T-Trolox) bestimmt, bis die Lumineszenzemission nach Zugabe von Trolox, auf ihren ursprünglichen Emissionswert vor Troloxzugabe wieder angewachsen ist. In gleicher Weise werden die Signalunterdrückungszeiten (T-Plasma) verschiedener Antioxidantien bestimmt. Die T-Plasmazeit ist die Zeit bis das Lumineszenzsignal wieder auf die ursprüngliche Lumineszenzemission vor Zugabe des Antioxidans angewachsen ist. Die Kapazitätsberechnung wird durchgeführt, indem die Signalunterdrückungszeiten für das Antioxidans und das Trolox ins Verhältnis gesetzt.

$$AOA_{ECL} = \frac{T\text{-Plasma} \times [\text{Trolox}] \times 10}{T\text{-Trolox}}$$

[Trolox] = Konzentration an Trolox (Standard 0.08 mM)

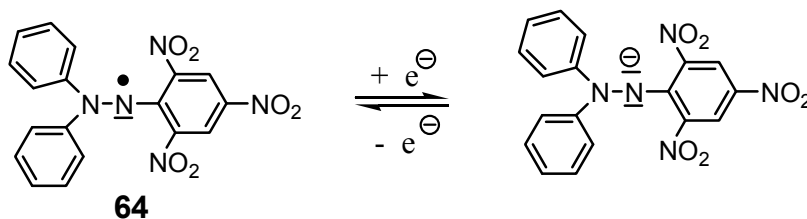
10 = Faktor der Verdünnung

T-Plasma = gemessen

T-Trolox = aus der Eichgerade

Die dritte Methode der Kapazitätsbestimmung basiert auf der spektroskopischen Verfolgung der Reaktion von Farbstoffen oder Farbstoffradikalen.

Als wichtigster Vertreter der Entfärbungsreaktion mit stabilen Farbstoffradikalen durch Antioxidantien gilt der DPPH **64** Assay^[47,53] (siehe auch ABTS^{•+}-Assay Kapitel 4). Das DPPH[•]-Radikal besitzt außerordentliche Stabilität und ist in Radikalform kommerziell erhältlich. Eine methanolische Lösung wird mit dem Antioxidans versetzt. Durch die leichte Reduzierbarkeit des Farbstoffradikals kann dessen Absorbanzabnahme bei $\lambda=515$ nm verfolgt werden. (E° DPPH[•]/DPPH⁻ 0.35 V pH = 7.0^[54])



DPPH = 1,1'-Diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazinyl

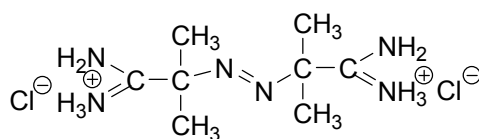
Als Standardreferenzsubstanz in den DPPH-Untersuchungen dient erneut Trolox **62**. Die Kapazitätsstärke eines Antioxidans im DPPH-Assay wird ausgedrückt als Quotient antioxidativer Aktivität des Antioxidans gegenüber Trolox und wird als TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) angegeben^[49].

$$\text{Antioxidative Kapazität} = \frac{(A_{\text{Antioxidans} + \text{DPPH}^{\cdot}})}{(A_{\text{Trolox} + \text{DPPH}^{\cdot}})}$$

$A_{\text{Antioxidans} + \text{DPPH}}$ = Absorbanz von DPPH[·] nach Zugabe von Antioxidans zum
Zeitpunkt T = x min

$A_{\text{Trolox} + \text{DPPH}}$ = Absorbanz DPPH[·] nach Zugabe von Trolox zum
Zeitpunkt T = x min

Der wichtigste Vertreter der Entfärbungsreaktion mit einem nichtradikalischen Farbstoff ist der ORAC-Test^[55] (oxygen radical absorption capacity). In diesem Assay werden Radikale über Thermolyse von AAPH **65** dargestellt.

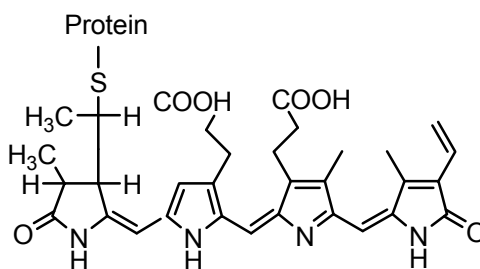


65

2,2'-Azo-bis-(2-Amidinopropan)-dihydrochlorid AAPH

Löslichkeit in Wasser 20°C 23.2 g/l, $k = 9.25 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 50°C^[50]

Als Farbstoff dient im Assay das R-Phycoerythrin. R-Phycoerythrin ist ein Photosynthese-Protein der Cyanobakterien und trägt als chromophore Gruppe eine Tetrapyrroleinheit **66** (Abbildung 1.15).



66

Abbildung 1.15: Teilausschnitt des Phycoerythrinchromophors

Die aus der Azoverbindung freiwerdenden Radikale werden in einer sauerstoffhaltigen Lösung in Peroxylradikale überführt und zerstören das R-Phycoerythrin oxidativ. Zugesezte Antioxidantien vernichten die entstandenen Radikale und verringern die R-Phycoerythrinoxidation. Am intakten Apoprotein fluoresziert die Tetrapyrrolgruppe bei $\lambda = 565 \text{ nm}$. Als Messgröße dient die Abnahme der Fluoreszenz bei λ_{565} .

Der ORAC-Wert wird angegeben als:

$$\text{ORAC-Wert/ml} = k \frac{\text{AUC}_{(S1)} - \text{AUC}_{(S2)}}{\text{AUC}_{(S3)} - \text{AUC}_{(S2)}}$$

k = Verdünnungsfaktor

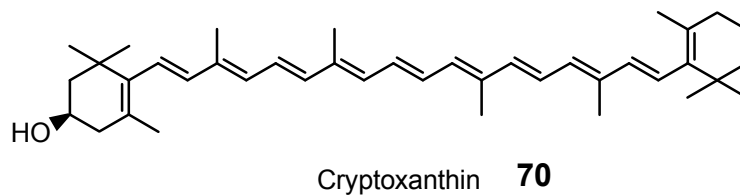
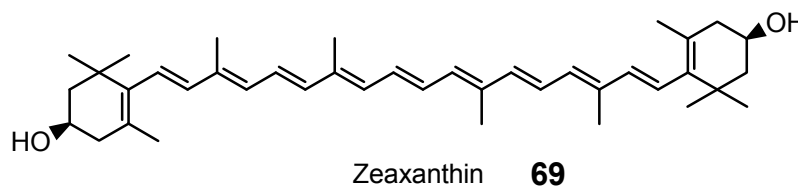
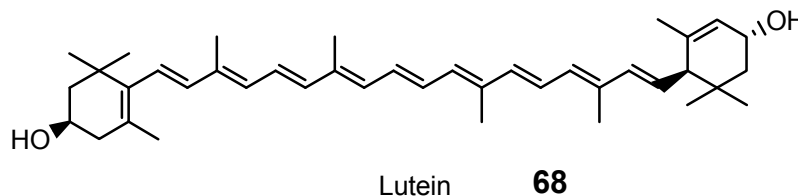
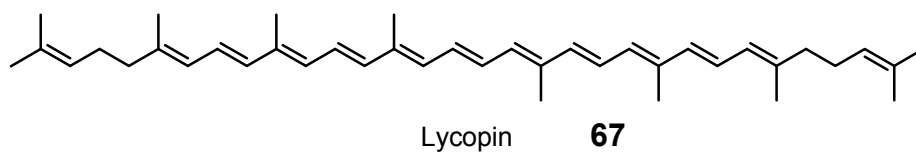
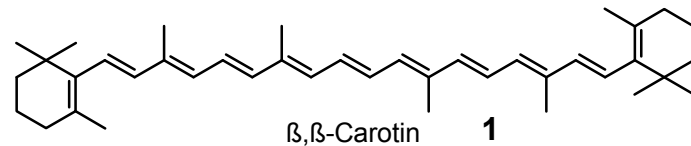
$\text{AUC}_{(S1)}$ = Fläche unter der Kurve (Fluoreszenzabnahme/Zeit mit Antioxidans)

$\text{AUC}_{(S2)}$ = Fläche unter der Kurve (Fluoreszenzabnahme/Zeit ohne Substanz)

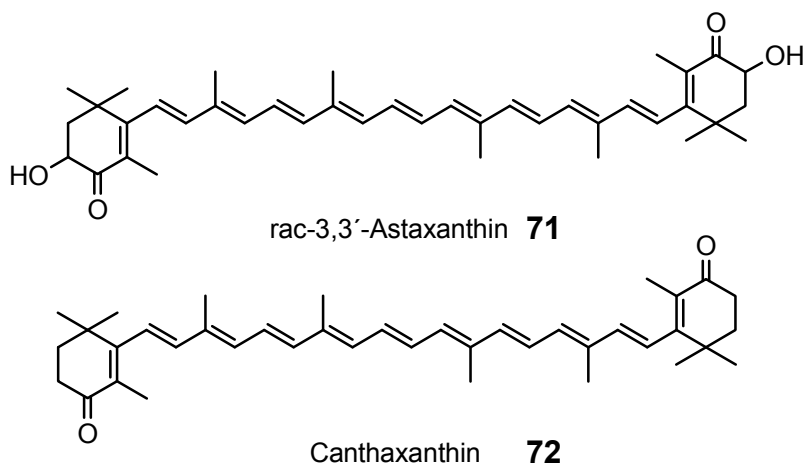
$\text{AUC}_{(S3)}$ = Fläche unter der Kurve (Fluoreszenzabnahme/Zeit mit Trolox)

2. Problemstellung

Dass Carotinoide antioxidative Eigenschaften besitzen, ist allgemein akzeptiert. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an verschiedenen Untersuchungsmethoden zur antioxidativen Aktivität von Carotinoiden entwickelt. Es sollte aufgeklärt werden, worin genau die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide begründet liegen und welche Testverfahren sich am besten zur quantitativen Beschreibung dieser Eigenschaften eignen. Dazu sollen sieben strukturell verschiedene Carotinoide (Carotine und Xantophylle) in drei verschiedenen Antioxidans-Messungen auf ihre unterschiedlichen Wirkungen untersucht werden. Es werden die folgenden fünf Serumcarotinoide eingesetzt:



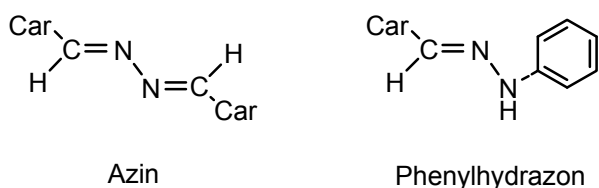
Um die antioxidative Wirkungsweise der Carotinoide möglichst umfassend zu beschreiben, werden die folgenden zwei Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin, welche in marinen Tieren, in Pilzen, in Bakterien und in Algen häufig auftreten, in die Untersuchungen einbezogen. Astaxanthin wird als racemisches Gemisch eingesetzt:



Als Assaymethoden werden verwendet:

- Sauerstoffverbrauchsmethode
- HPLC chromatographisch bestimmte Peroxidinhibition
- ABTS-Assay

Im synthetischen Teil wird die Synthese neuartiger stickstoffhaltiger Carotinoide vorgestellt. Dargestellt werden Carotinoidazine und Carotinoidphenylhydrazone der folgenden Struktur:



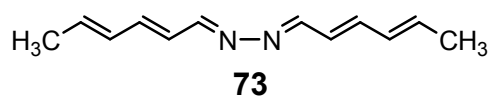
Neben der Synthese der Verbindungen wird der Einfluß der frei drehbaren zentralen Stickstoffbindung auf mögliche konformative und elektronische Eigenschaften in stickstoffhaltigen Carotinoidmolekülen bestimmt. Experimentelle und spektroskopische Messergebnisse werden mit theoretischen Ergebnissen, anhand von semiempirischen Berechnungen, verglichen.

3. Hauptteil

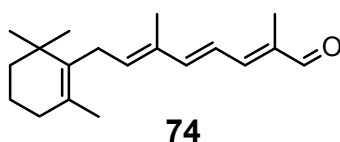
3.1 Stickstoffhaltige Carotinoide

Bei den Versuchen, zwei Stickstoffatome in ein Carotinoid einzubauen, wurde eine neuartige Stoffklasse zugänglich, die Carotinoidazine. Diese Verbindungen besitzen ungewöhnliche Eigenschaften. Von Interesse ist das Konformationsverhalten dieser konjugiert ungesättigten Verbindungen. Der Ersatz von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen durch sp^2 -hybridisierte Stickstoffatome könnte konformative Veränderungen bedingen und spektroskopische Unterschiede gegenüber „reinen“ Carotinoiden zeigen. Zudem könnte die Einführung von nichtbindenden n-Orbitalen der Stickstoffatome zusätzlichen Einfluß auf das konjugierte π -Elektronensystem der Carotinoidazine zeigen.

Die grundlegenden Arbeiten zur Azinen gehen auf Curtius^[56] Ende des vorletzten Jahrhunderts zurück. Von der Verbindungsklasse der Azine sind sehr häufig aromatische Derivate, wie zum Beispiel die des Acetophenons dargestellt worden^[57]. Bekannt sind auch die relativ unbeständigen Formaldazine^[58] und zahlreiche Alkylazine^[59]. Selten dargestellt und untersucht worden sind N, N'-ungesättigte Azine. 1930 wurde von Kuhn und Hoffer^[60] das instabile Hexadienalazin **73** (1,2-Di(hexa-2,4-dien-1-yliden)hydrazin) beschrieben.

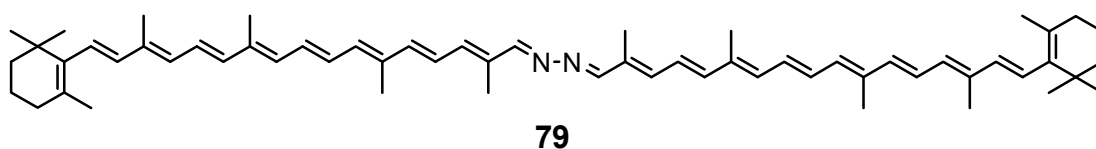
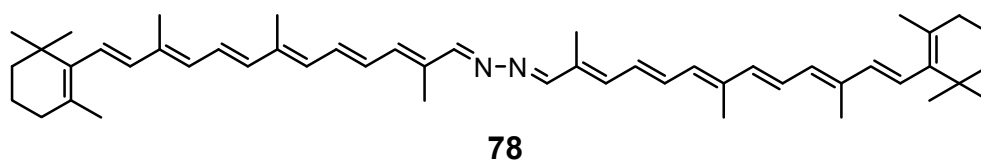
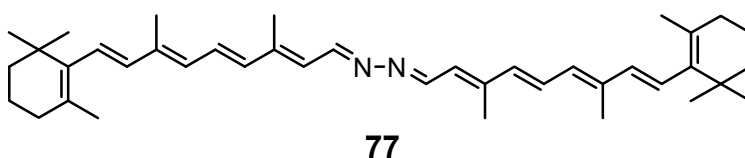
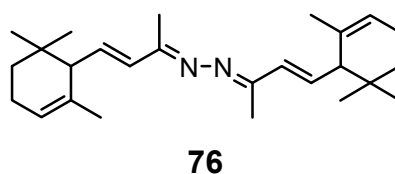
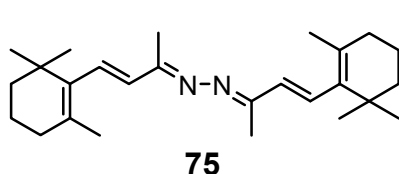


Im Bereich der Carotinoide wurde 1952 von Inhoffen^[61] das C₁₉-Aldehydazin, aus dem C₁₉-Aldehyd **74**, dargestellt. In der Originalliteratur fehlt jedoch eine Charakterisierung des Azins, angegeben ist lediglich die Elementaranalyse.



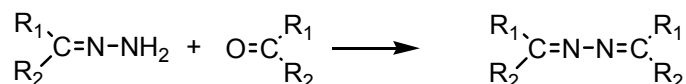
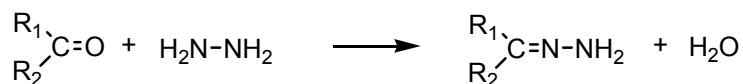
3.2 Darstellungen der Carotinoidazine

Um den konformativen Einfluß der n-Orbitale der zentralen Stickstoffbindung auf Carotinoidazine zu beschreiben, werden UV-Vis spektroskopische Untersuchungen mit den folgenden synthetisierten Carotinoidazinen unterschiedlicher Polykettenlänge gemacht:

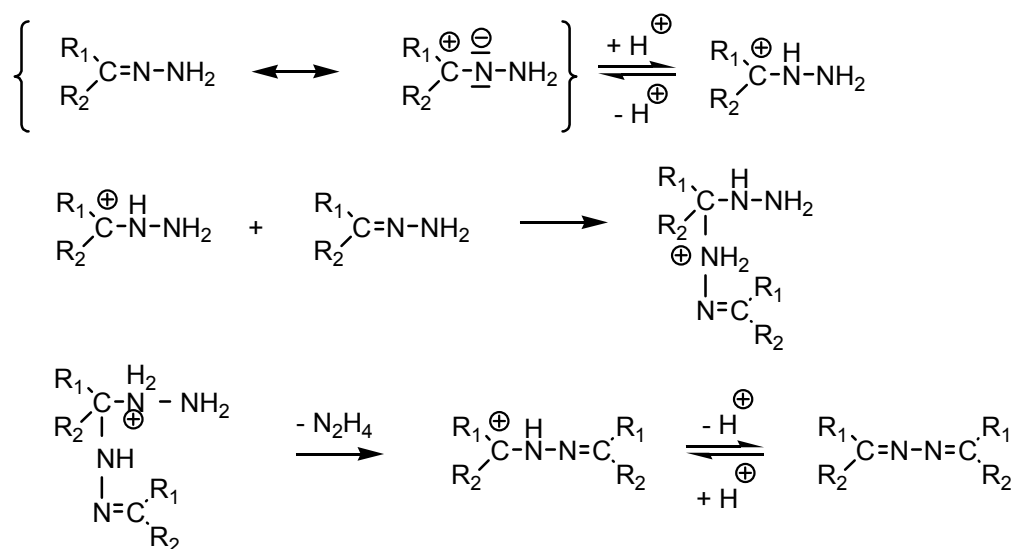


Prinzipiell können die Synthesen der Carotinoidazine sowohl mit 100%igem Hydrazinhydrat, wie auch mit Hydrazinsulfat durchgeführt werden. Für beide Synthesewege erhält man durchweg gute Ausbeuten. Die Verwendung von Hydrazinsulfat macht den Einsatz einer Base erforderlich, welche zum freisetzen des Hydrazins notwendig ist. Um diesem Umstand zu umgehen, und möglichst alle Nebenreaktionen bei stark ungesättigten Carotinoidaldehyden zu vermeiden, wird bei der Azinsynthese besser 100%iges Hydrazinhydrat eingesetzt.

Das allgemeine Reaktionsschema der Azinherstellung mit Hydrazin ist im folgenden dargestellt:



Die genaue Analyse des Reaktionsschemas der Azindarstellung zeigt zwei aufeinander folgende Reaktionssequenzen. Zunächst bildet sich ein intermediäres Hydrazon, welches unter Säurekatalyse ein zweites Hydrazonmolekül addiert. Unter Freisetzung eines Moleküls Hydrazin reagiert das Intermediat zum Azin ab^[62]:

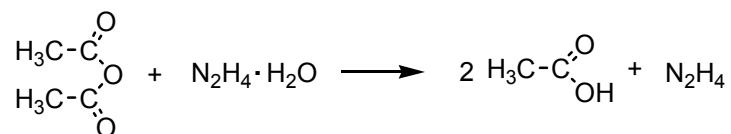


Für Aldehyde beziehungsweise Hydrazone mit gesättigten oder aromatischen Resten R_1 und R_2 ist diese Reaktion unter sauren Bedingungen leicht durchführbar. Beim Einsatz von Carotinoidaldehyden, als stark ungesättigte Moleküle, sind bei der Synthese mehrere Dinge zu beachten:

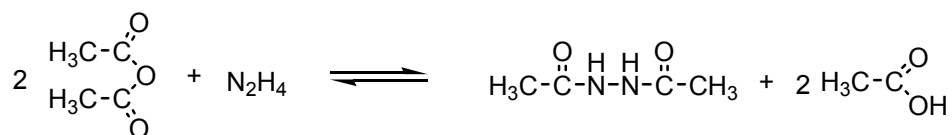
- 1.) Die Reaktion sollte nicht in Gegenwart starker Mineralsäuren durchgeführt werden, da dies bei der hohen Doppelbindungsanzahl zu verschiedensten Nebenreaktionen führt.
- 2.) Aus dem molaren Reaktionverhältnis von 2 mol Carotinoidaldehyd mit 1 mol Hydrazin, und dem sehr viel höheren Molekulargewicht des Carotinoidaldehyds resultiert, dass sehr geringe Substanzmengen an Hydrazinhydrat eingesetzt werden müssen. Diese geringe Hydrazinmenge ist bei der Zugabe zur Reaktionsmischung schlecht zu dosieren. Erfolgt die Zugabe des Hydrazins

über eine Spritze, so kann die Reaktionstemperatur im Bereich des Einspritzpunktes stark ansteigen. Dieser Bereich zeigt durch Schwarzfärbung die Bildung von unerwünschten Carotinoidabbauprodukten an. Ein Carotinoidazin wird dann nur in sehr geringer Ausbeute erhalten. Eine größere Verdünnung der Reaktionsmischung ist nicht praktikabel, da die Reaktionsdauer für die geringen Mengen an Hydrazin ansteigt, und die Ausbeute an Azin gering bleibt. Um den Einsatz starker Säuren, und einen zu hohen Überschuss an Hydrazin zu vermeiden, wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

Es wird eine ethanolische Lösung mit 20 Vol% Essigsäureanhydrid vorgelegt und Hydrazin zugegeben. Dabei bietet die Verwendung von Essigsäureanhydrid mehrere Vorteile. Zur Steigerung der Reaktivität wird dem eingesetzten Hydrazinhydrat das Wasser über das Anhydrid entzogen, es bildet sich reines Hydrazin. Die Protonen der gebildeten Essigsäure dienen gleichzeitig als -Katalysator- der Azinbildung.

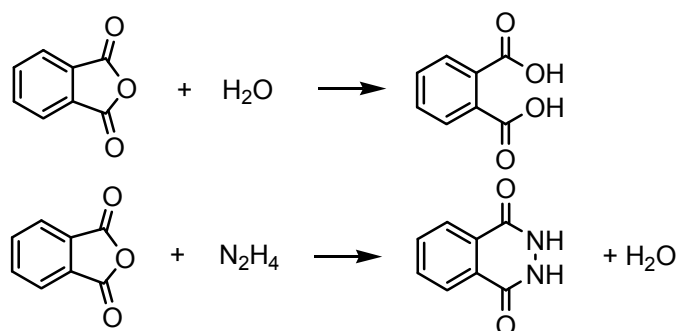


Mit dem eingesetzten molaren Verhältnis von Carotinoidaldehyd, Essigsäureanhydrid und Hydrazin 0.2 : 1.6 : 1 lassen sich die besten Ausbeuten erzielen. Ein Überschuß an Anhydrid stellt sicher, dass an der Reaktion nicht beteiligtes Hydrazin aus der Reaktionsmischung entfernt wird. Bei dieser Reaktion entstehen zwei weitere Mole der benötigten Essigsäure.

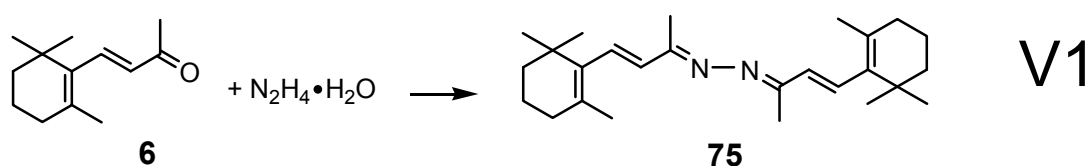


Ein weiterer Vorteil dieser Reaktionsführung ist, dass sich die Carotinoidazine in einer einstufigen Synthese darstellen lassen.

Für sehr säurelabile Carotinoidaldehyde, wie dem C₃₀-Aldehyd, wird die Reaktion in Ethanol mit Phthalsäureanhydrid durchgeführt. Hier muss zu dem Ethanol sehr wenig Wasser (einige Tropfen) zugesetzt werden, um das Phthalsäureanhydrid zu lösen und Protonen freizusetzen.

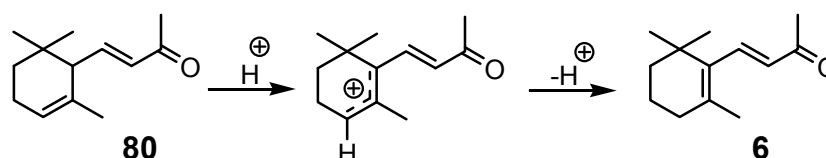


Die Synthese des β -lononazins **75** gelingt mit Hilfe der oben angeführten Reaktionsbedingungen. Reines β -lononazin lässt sich aber nur als ölige Substanz isolieren. Auch mehrmalige Versuche der Kristallisation aus Ethanol, sowie aus Toluol/Ethanol ergeben erneut ein gelbliches zähflüssiges Öl. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel, mit n-Hexan als Laufmittel, erhält man wieder nur eine ölige Substanz. Das Massenspektrum zeigt den korrekten Molekülionenpeak von $[\text{M}^+ - 1] = 379 \text{ m/z}$.



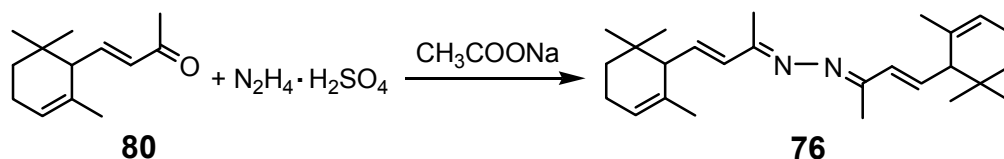
Wider Erwarten lässt sich β -lononazin nur als Flüssigkeit isolieren. Pasha^[63] beschreibt ähnliche Probleme bei der Synthese und Isolierung von ungesättigten Azinen. Als Lösung schlägt Pasha für die Synthese von mehrfach ungesättigten Azinen, wie zum Beispiel dem 1,2-di(3,3-dimethylbutan-2-yliden)hydrazin, eine lösungsmittelfreie Syntheseroute vor.

Bei der Synthese des α -lononazins **76** ergeben sich zusätzliche Schwierigkeiten. Die Cyclohexendoppelbindung des α -lonons **80** ist extrem säurelabil. Das α -lonon lagert sich, sauer katalysiert, in β -lonon **6** um.

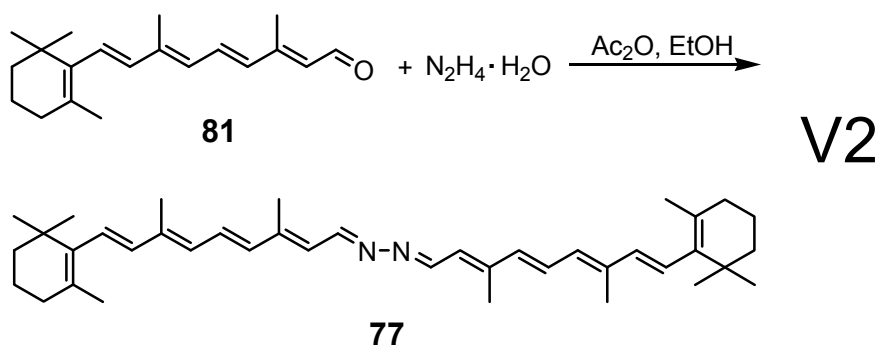


Die unter sauren Bedingungen durchgeführte α -lononazinsynthese erzeugt wahrscheinlich ein Gemisch aus α -lononazin, α,β -lononazin und β -lononazin.

Die Syntheseroute über Hydrazinsulfat und Natriumacetat liefert α -Iononazin als ölige Substanz mit einer Ausbeute von 8% der Theorie.



Die Synthese von Retinalazin **77** aus Retinal **81** verläuft dagegen glatt. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man orangerote Kristalle mit einem konstanten Schmelzpunkt. Nur für die spektroskopischen Untersuchungen wird das Retinalazin säulenchromatographisch an Kieselgel, mit n-Hexan als Eluens, gereinigt.



In Abbildung 3.1 und 3.2 ist das ^1H -NMR-Spektrum von Retinalazin wiedergegeben. Die Zuordnung der Signale ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Abbildung 3.4 zeigt das ^{13}C -NMR von Retinalazin. Es gilt folgende, aus der Carotinoidnomenklatur abgeleitete Nummerierung der Atome, wie für Retinalazin gezeigt (Abb. 3.3):

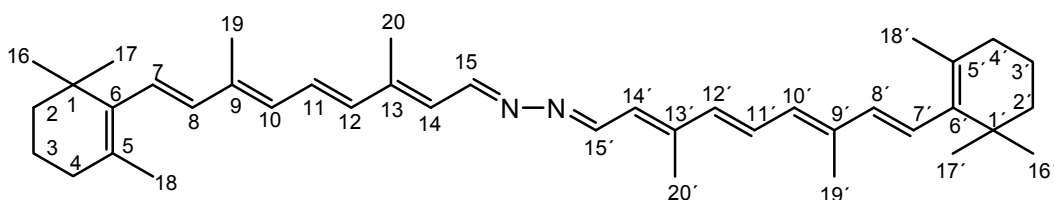


Abbildung 3.3: Bezifferung des Carotinoidazins **77** für die NMR-Zuordnung

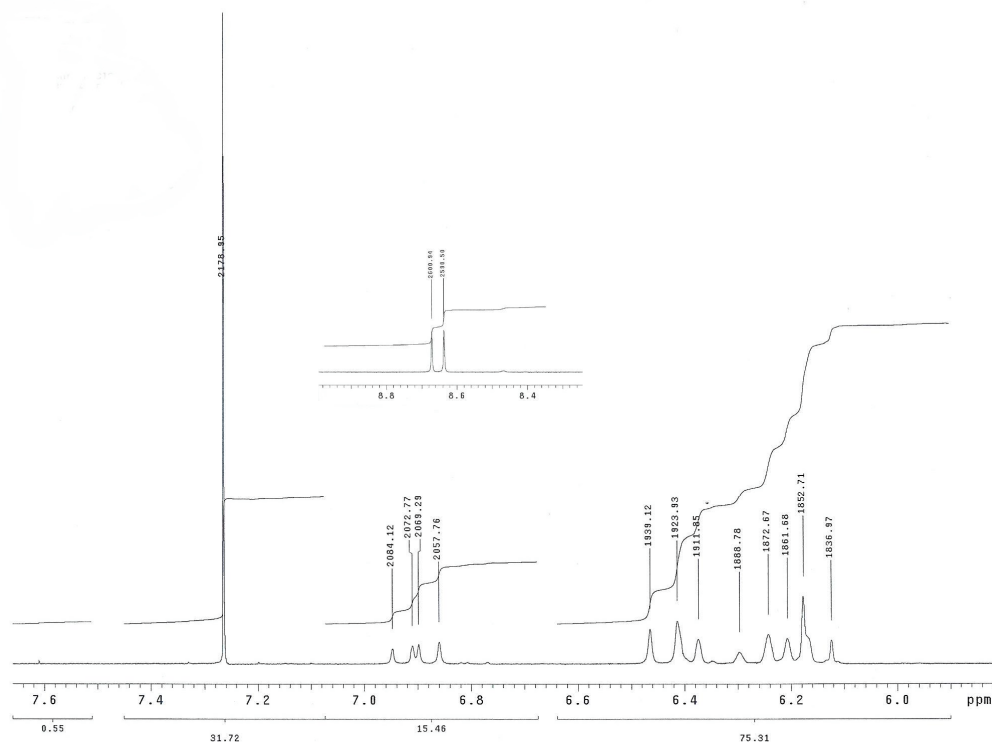


Abbildung 3.1: olefinischer Teil des ^1H -NMR Spektrum von **77** Retinalazin (300 MHz, Lsm. CDCl_3):

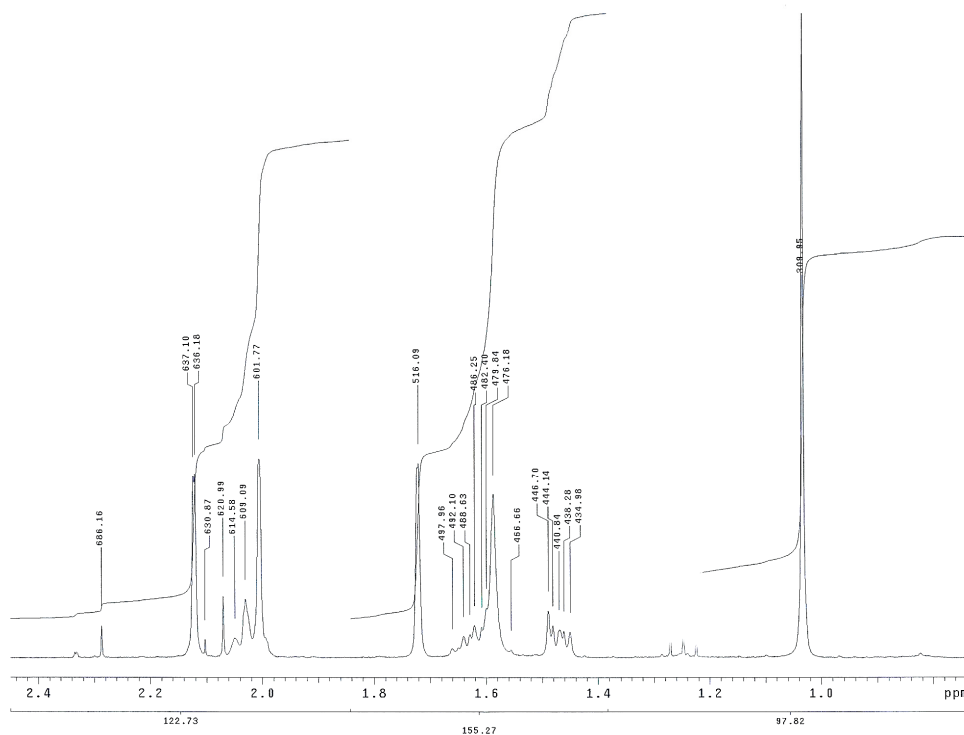


Abbildung 3.2: Methylenteil des ^1H -NMR Spektrum von **77** Retinalazin (300 MHz, Lsm. CDCl_3).

Tabelle 3.1: Zuordnungen ^1H -NMR Signale von Retinalazin **77**

H-Atom	ppm	Intensität	Multiplizität	Kopplung [Hz]
H-16,16' 17,17'	1.03	12 H	s	-
H- 2,2'	1.44-1.49	4 H	m	-
H- 3,3'	1.59-1.62	4 H	m	-
H-18,18'	1.72	6 H	s	-
H-20,20'	2.00	6 H	s	-
H-4,4'	2.03-2.12	4 H	m	-
H-19,19'	2.12	6 H	s	-
H-8,8'	6.18	2 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 15.7$
H-10,10'	6.21	2 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 12.2$
H-7,7'	6.29	2 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 16.1$
H-12,12'	6.35	2 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 14.9$
H-14,14'	6.38	2 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 11.1$
H-11,11'	6.90	2 H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 11.5$ $^3J_{\text{HH}} = 15.0$
H-15,15'	8,65	2 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 10.4$

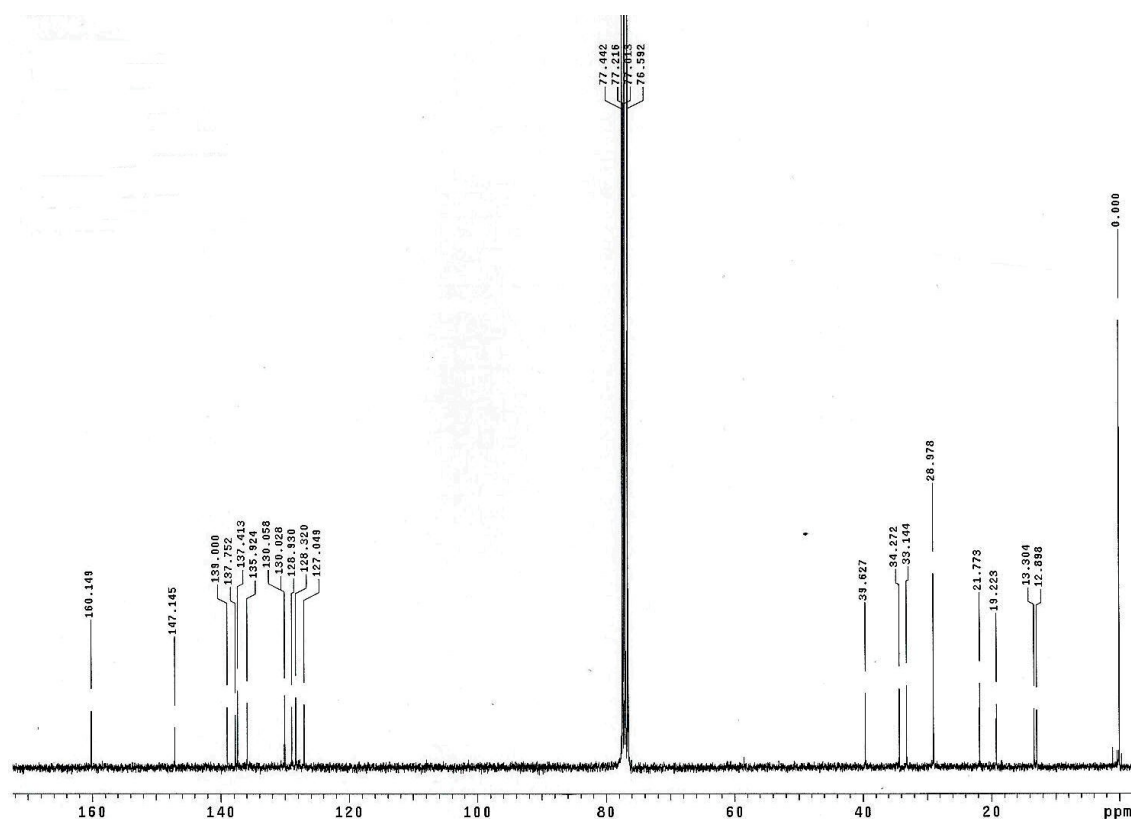
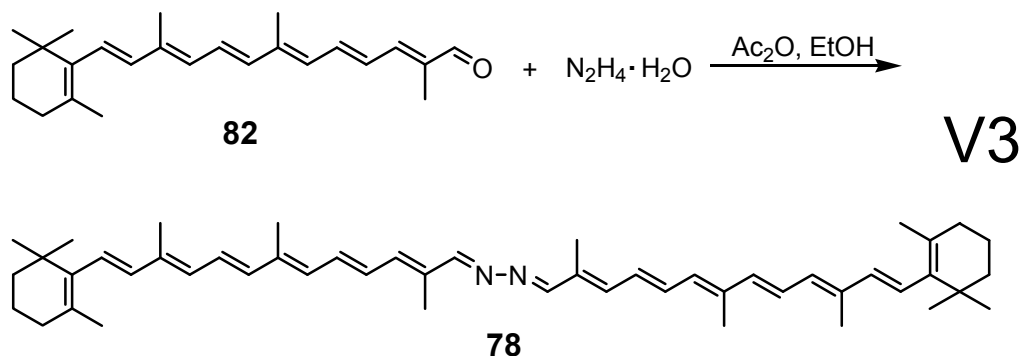


Abbildung 3.4: ^{13}C -NMR Spektrum von **77** Retinalazin (75 MHz, Lsm. CDCl_3):

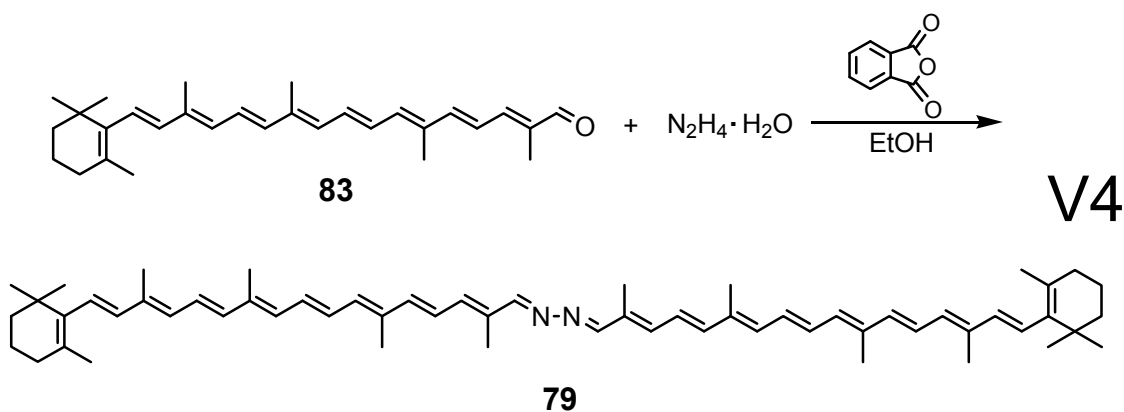
Tabelle 3.2: Zuordnungen ^{13}C -NMR Signale von Retinalazin **77**:

C-Atom	ppm	C-Atom	ppm
20,20'	12.89	10,10'	128.32
19,19'	13.30	11,11'	128.93
3,3'	19.22	7,7'	130.03
18,18'	21.77	5,5'	130.06
16,16'	28.98	14,14'	135.92
17,17'	28.98	8,8'	137.41
4,4'	33.14	9,9'	137.75
1,1'	34.27	6,6'	139.00
2,2'	39.63	13,13'	147.15
12,12'	127.05	15,15'	160.15

Die Synthese von C₂₅-Aldehydazin **78** aus dem C₂₅-Aldehyd **82** verläuft glatt. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man rot-violett schimmernde Kristalle. Auch hier wird die Substanz für spektroskopische Untersuchungen säulenchromatographisch an Kieselgel, mit n-Hexan als Eluens, gereinigt.



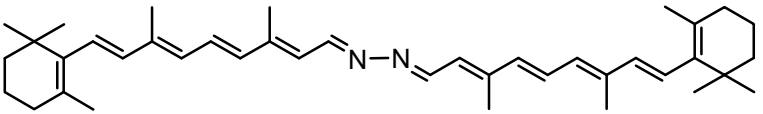
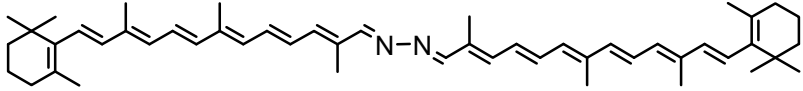
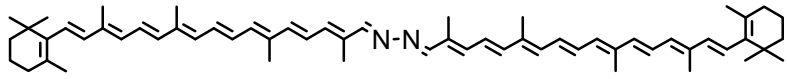
Das C₃₀-Aldehydazin **79** wird durch Umsetzung mit Phthalsäureanhydrid in Ethanol erhalten. Die Ausbeute dieser Reaktion ist jedoch schlechter als bei der Essigsäureanhydridmethode. Erst die Verlängerung der Reaktionszeit auf 96 Stunden ergibt eine Ausbeute von 30% der Theorie. Es ist zu berücksichtigen, dass die Reaktivität des eingesetzten C₃₀-Aldehyds **83** deutlich geringer ist, als die Reaktivität des Retinals **81** und des C₂₅-Aldehyds **82**. Um sehr lange Reaktionszeiten zu vermeiden, wird die Reaktion bei leicht erhöhter Reaktionstemperatur von 45°C durchgeführt. Dann ergibt eine Reaktionszeit von 48 Stunden die besten Ausbeuten. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man dunkelrote, metallisch schimmernde Kristalle. Auch hier wird das Azin für die spektroskopischen Untersuchungen säulenchromatographisch an Kieselgel, mit n-Hexan als Eluens, gereinigt.



3.3 UV-Vis- Spektroskopie der Carotinoidazine

Die Absorptionsmaxima der dargestellten Carotinoidazine zeigen, dass mit vinyloger Verlängerung der Azine die langwelligen Absorptionen bathochrom verschoben werden.

Tabelle 3.3: Absorptionsmaxima der dargestellten Carotinoidazine

Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm] (Ethanol)
77	 $C_{40}H_{56}N_2$	460.4
78	 $C_{50}H_{68}N_2$	490.0
79	 $C_{60}H_{80}N_2$	518.6

Vergleicht man die Absorptionsmaxima der Azine mit den Carotinoiden, besitzen beide Substanzklassen ähnliche Absorptionsmaxima.

Tabelle 3.4: Absorptionen kettenverlängerter Carotinoide

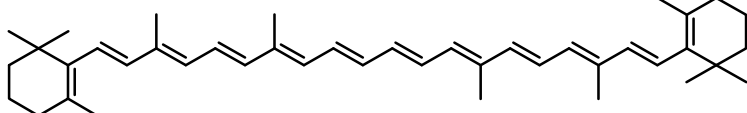
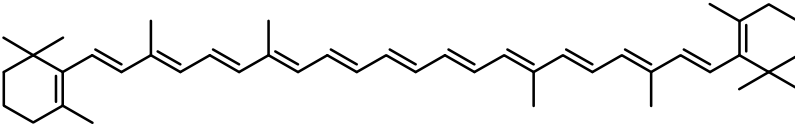
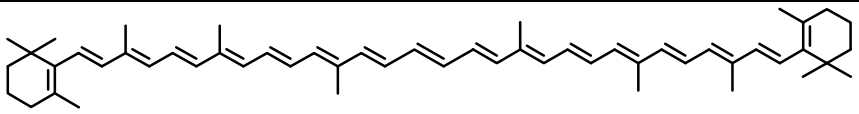
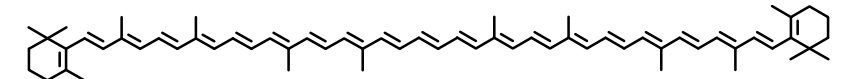
Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm]
84	 $C_{42}H_{58}$	466 ^[64] (Ether)
85	 $C_{44}H_{60}$	477 ^[65] (Hexan- CHCl ₃)

Tabelle 3.5.: Absorptionen kettenverlängerter Carotinoide

Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm]
86	 $C_{54}H_{72}$	513 ^[65] (Hexan- CHCl ₃)
87	 $C_{64}H_{84}$	528 ^[65] (Hexan- CHCl ₃)

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung Absorptionen der Carotinoidazine **77-79** und der Absorptionen der Carotinoide **84-87**. Bei dem Vergleich der Absorptionsmaxima ist zu berücksichtigen, dass die Verbindungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln vermessen wurden. Für die Carotinoidazine muss in Ethanol positive Solvatochromie berücksichtigt werden.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Azin- und Carotinoidabsorptionsmaxima

Nr.	Carotinoidazin	π -Bindungen	$\lambda_{\max}$ [nm]
77	$C_{40}H_{56}N_2$	12	460 (Ethanol)
78	$C_{50}H_{68}N_2$	16	490 (Ethanol)
79	$C_{60}H_{80}N_2$	20	518 (Ethanol)
Nr.	Carotinoid	π -Bindungen	$\lambda_{\max}$ [nm]
84	$C_{42}H_{58}$	12	466 (Diethylether)
85	$C_{44}H_{60}$	13	477 (Hexan-CHCl ₃)
86	$C_{54}H_{72}$	17	513 (Hexan-CHCl ₃)
87	$C_{64}H_{84}$	21	528 (Hexan-CHCl ₃)

Die Abbildung 3.5 zeigt die Auftragung der Absorptionsmaxima der Azine und Carotinoide, mit polyentypischen Verhalten:

Beide Substanzklassen streben auf einen Grenzwert der maximalen Absorption.

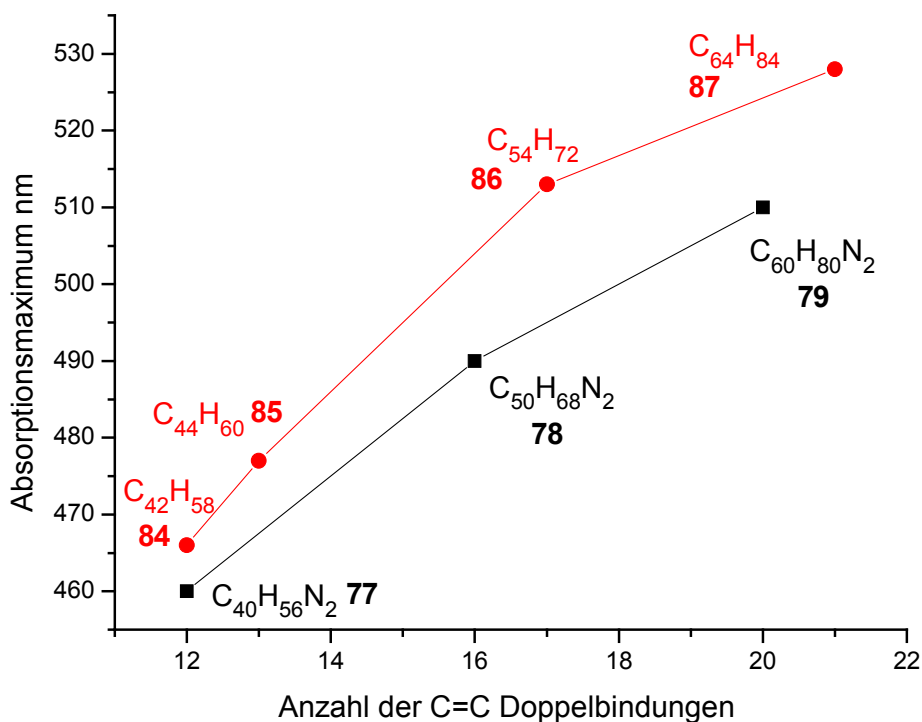


Abbildung 3.5: Absorptionsmaxima der Carotinoide **84-87** und der Azine **77-79**

Ein genauer Vergleich der Absorptionen ist nur für das Retinalazin möglich. Da von Retinalazin ein entsprechendes isoelektronisches Carotinoid **84**^[64] synthetisiert wurde. Nachfolgende Tabelle zeigt die Absorptionen von Retinalazin **77** und C₄₂-β-Carotin **84** in verschiedenen Lösungsmitteln:

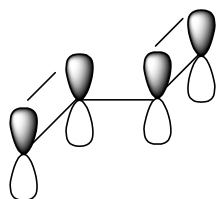
Tabelle 3.7: Absorption von Retinalazin **77** und dem isoelektronischen Carotinoid **84**.

Nr.	Verbindung	C=C	$\lambda_{\max}$ nm
77		12	460 (Ethanol)
84		12	466 (Ether)

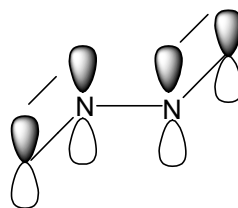
Ob die geringfügig verschiedenen Absorptionen nur aus solvatochromen oder auch durch elektronischen Eigenschaften beeinflusst werden, soll durch semiempirische Rechnungen untersucht werden. Dabei soll der Einfluß der n,n-Repulsion auf die Konformation der zentralen N-N-Bindung im Retinalazin **77** untersucht werden.

3.4 Semiempirische Berechnungen der Carotinoidazine

Um das π -System eines Polyens (Carotinoids) generell zu beschreiben verwendet man am zweckmäßig die Stammverbindung, das Butadien. Die entsprechenden Carotinoidazine leiten sich dann aus der Stammverbindung 2,3-Diaza-butadien ab.



Butadien



2,3-Diaza-butadien

Um zunächst die Wechselwirkungen, hervorgerufen durch n/n-Wechselwirkungen in symmetrischen Azinen, zu beschreiben, werden Linearkombinationen zweier nichtbindender Stickstoffatomorbitale gewählt. Es resultieren die symmetriegerechten Kombinationen n_+ und n_- ^[66]:

$$n_- = \frac{(n_1 - n_2)}{\sqrt{2}} \qquad n_+ = \frac{(n_1 + n_2)}{\sqrt{2}}$$

Die Orbitalenergien $\varepsilon(n_+)$ und $\varepsilon(n_-)$ zeigen, bei der Rotation um die zentrale Bindung, den in Abbildung 3.6 schematisch dargestellten Verlauf. Die geringste Energieaufspaltung besitzt die orthogonale Anordnung von n_- und n_+ , bei einem Torsionswinkel von $\Theta = 90^\circ$. Es ist die Konformation der geringfügigsten Überlappung beider n-Orbitale. Für Torsionswinkel von $\Theta = 180^\circ$ und $\Theta = 0^\circ$ wird die energetische Aufspaltung beider Orbitale maximal. Für den Torsionswinkel von $\Theta = 180^\circ$ ist zudem die elektronische Abstossung von n_- und n_+ am geringsten (Abbildung 3.6).

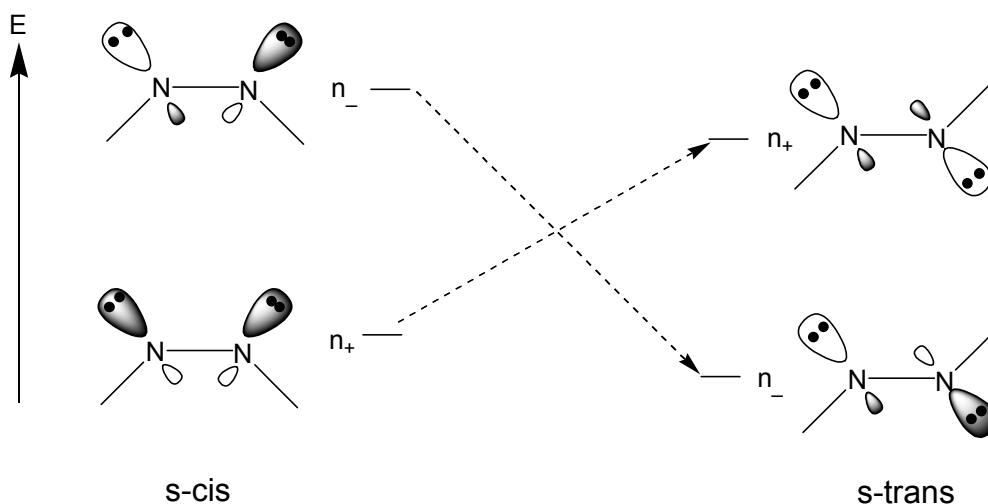


Abbildung 3.6: Änderung der Orbitalenergien $E(n_+)$ und $E(n_-)$ für Torsionswinkel von $\Theta = 180^\circ$ und $\Theta = 0^\circ$

Wegen der häufig wechselnden und nicht IUPAC-konformen Konfigurationsbezeichnungen in Azinmolekülen sind nachfolgend die wichtigsten Konfigurationen und deren Nomenklaturen aufgelistet. In dieser Arbeit werden die Begriffe antiperiplanar („anti“), synperiplanar („syn“) und für $\Theta = 60^\circ$ gauche verwendet. Abweichend von der Literatur werden Konfigurationen mit einem Winkel $\Theta > 60^\circ$ als verdreht bezeichnet.

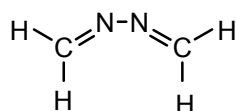
Tabelle 3.8: Bezeichnung der möglichen Azinkonfigurationen

$\Theta = 180^\circ$	$\Theta = 0^\circ$	$\Theta = 60^\circ$
antiperiplanar	synperiplanar	synclinal
s-trans	s-cis	gauche

Um die Einflüsse der jeweiligen Molekülkonformation auf die Orbitalenergien und die Orbital-Wechselwirkungen zu erhalten, wurden semiempirische MNDO- (**M**odified **N**eglect of of **D**ifferential **O**verlap) Rechnungen durchgeführt^[67,68].

Diese Methode eignet sich gut zur Berechnung von Molekülkonformationen, Bildungswärmen und Rotationsbarrieren. Um generelle Wechselwirkungen zu beschreiben werden zunächst die Konformationen anti, syn und die um etwa $\Theta = 90^\circ$ verdrehte Form des einfachsten Azins, dem Formaldazin, berechnet.

Die Struktur der Formaldazinkonformere wurden mit einer MM2 Kraftfeldrechnung voroptimiert (Allinger)^[69], und dann mit Hilfe einer MNDO-Rechnung berechnet.



syn

Tabelle 3.9: MNDO-Rechnung Formaldazin $\Theta=0^\circ$ (syn) $\Delta H_f = 234.19$ kJ/mol

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.333	C(1)-N(2)-N(3)= 127.1	C(1)-N(2)-N(3)-C(4)= 0.0
C(1)-N(2)= 1.299	C(4)-N(3)-N(2)= 127.1	-
C(4)-N(3)= 1.299	-	-

Tabelle 3.10: Ergebnis der MNDO-Rechnung für Formaldazin $\Theta=0^\circ$ (syn)

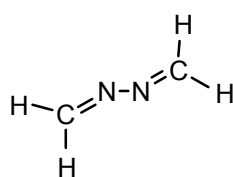
MO	E [eV]	Orbital
HOMO (11)	-10.65	π_1 π -Orbital $\pi(\text{C-N})$
HOMO -1 (10)	-10.83	n_1 lone-pair n-Orbital
HOMO -2 (9)	-11.68	n_2 lone-pair n-Orbital
HOMO -3 (8)	-14.32	π_2 π -Orbital $\pi(\text{C-N})$

Das synperiplanare Konformer besitzt die höchste Bildungswärme der drei Formaldazinkonformere. Bei der energetischen Lage des Konformers ist zu berücksichtigen, dass im synperiplanaren Molekül der Einfluss der sterischen Abstoßung beider endo-Wasserstoffatome einen hohen Beitrag zum Energieinhalt leistet. Die Wechselwirkung mit π^* -Orbitalen und σ^* -Orbitalen bedingen in dieser Formaldazinkonformation einen großen Beitrag zum Gesamtenergieinhalt. Dies wird durch eine Aufweitung der C-N-N-Bindungswinkel bestätigt. Die Bindungslänge der N-N-Einfachbindung von 133.3 pm ist sehr kurz bestimmt. Sie liegt im Bereich einer N-N-Doppelbindung und zeigt Delokalisierung und hohe π -Konjugation im synperiplanaren Formaldazinkonformer an.

Die beiden nichtbindenden n-Orbitale besitzen fast reinen Lonepaircharakter und sind nahezu vollständig an den Stickstoffatomen lokalisiert. Es gibt keine

π -Beimischungen. Die synpriplanare Konformation wird über elektronische Abstoßung der nichtbindenden n-Orbitale destabilisiert. Die π -Orbitale im syn-Formaldazin zeigen reinen π -Charakter.

Allgemein wird die energetische Lage von π -Orbitalen auch über Substituenteneinflüsse beeinflusst. Da im Formaldazin nur Wasserstoffatome als Substituenten vorhanden sind, welche weder mesomere noch induktive Effekte ausüben, ist die energetische Lage der π -Orbitale relativ unbeeinflusst.



anti

Tabelle 3.11: MNDO-Rechnung Formaldazin $\Theta=180^\circ$ (anti) $\Delta H_f=193.06$ kJ/mol:

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.350	C(1)-N(2)-N(3)= 116.4	C(1)-N(2)-N(3)-C(4)= 180.0
C(1)-N(2)= 1.299	C(4)-N(3)-N(2)= 116.4	-
C(4)-N(3)= 1.299	-	-

Tabelle 3.12: Ergebnis der MNDO-Rechnung für Formaldazin $\Theta=180^\circ$ (anti)

MO	E [eV]	Orbital
HOMO (11)	-10.16	n_1 lone-pair n-Orbital
HOMO -1 (10)	-10.38	π_1 π -Orbital $\pi(C-N)$
HOMO -2 (9)	-13.36	n_2 lone-pair n-Orbital
HOMO -3 (8)	-14.11	π_2 π -Orbital $\pi(C-N)$

Das antiperiplanare Konformer besitzt die geringste Bildungswärme aller Formaldazin-Konformere und ist damit die stabilste Konformation. Dies wurde auch experimentell durch Elektronenbeugungs- und Röntgenstrukturuntersuchungen bestätigt^[70,71]. Auch anhand von DFT-Rechnungen^[72] sowie Ab initio-Berechnungen^[73,74] konnte gezeigt werden, dass das antiperiplanare Konformer das stabilste Formaldazinkonformer ist.

Tabelle 3.13: Ergebnis Elektronenbeugungsexperiment für Formaldazin $\Theta=180^\circ$

Hedberg ^[70]	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°
Messbedingungen - 30°C, 0.5 μ A, $6 \cdot 10^6$ Torr	N(2)-N(3)= 1.418	C(1)-N(2)-N(3)= 111.4
	C(1)-N(2)= 1.277	H -C(1)-N(2)= 120.7
	C(4)-N(3)= 1.277	-

Tabelle 3.14: Literaturergebnisse DFT-Rechnung für Formaldazin $\Theta=180^\circ$

Mannfors ^[72] , B3-LYP	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°
-188.04806 Hartree	N(2)-N(3)= 1.422	C(1)-N(2)-N(3)= 111.13
	C(1)-N(2)= 1.276	C(4)-N(3)-N(2)= 111.13
	C(4)-N(3)= 1.276	-

Tabelle 3.15: Literaturergebnisse Ab initio-Rechnung für Formaldazin $\Theta=180^\circ$

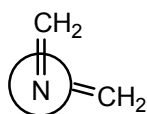
Euler ^[73] , MP2/6-31G*	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°
-	N(2)-N(3)= 1.418	C(1)-N(2)-N(3)= 111.4
	C(1)-N(2)= 1.277	C(4)-N(3)-N(2)= 111.4
	C(4)-N(3)= 1.277	-

Tabelle 3.16: Literaturergebnisse Ab initio-Rechnung für Formaldazin $\Theta=180^\circ$

Bock ^[74] , MP3/6-31G*	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°
-187.46738 a.u.	N(2)-N(3)= 1.411	C(1)-N(2)-N(3)= 122.3
	C(1)-N(2)= 1.251	C(4)-N(3)-N(2)= 122.3
	C(4)-N(3)= 1.251	-

In der antiperiplanaren Konformation entfällt die sterische Abstoßung der endo-Wasserstoffatome. Der Energiegehalt des Moleküls wird noch weiter durch eine transoide Anordnung beider Lonepairs abgesenkt. Die transoide Anordnung stellt gleichzeitig die elektronisch günstigste Anordnung dar. Die beiden nichtbindenden n-Orbitale besitzen fast reinen Lonepaircharakter und sind vollständig an den Stickstoffatomen lokalisiert. Im antiperiplanaren Konformer gibt es keine π -Beimischungen in die n-Orbitale. Das π -System der beiden -C=N-Doppelbindungen ist über beide Doppelbindungen delokalisiert. Die hohe

Delokalisierung wird auch im antiperiplanaren Konformer durch eine kurze N-N-Einfachbindung (135.0 pm) angezeigt, was eher einer N=N-Doppelbindung entspricht.



$$\Theta = 100^\circ$$

Tabelle 3.17: MNDO-Rechnung Formaldazin $\Theta = 100^\circ$ (verdrillt) $\Delta H_f = 202.92$ kJ/mol:

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.337	C(3)-N(1)-N(2)= 121.2	C(4)-N(2)-N(1)-C(3)= 100.0
C(1)-N(2)= 1.296	C(4)-N(2)-N(1)= 121.2	-
C(4)-N(3)= 1.296	-	-

Tabelle 3.18: Ergebnis der MNDO-Rechnung Formaldazin $\Theta = 100^\circ$ (verdrillt)

MO	E [eV]	Orbital
HOMO (11)	-10.34	π_1 (Mischform)
HOMO-1 (10)	-10.71	π_2 (Mischform)
HOMO-2 (9)	-12.58	n_1 (starke Mischform)
HOMO-3 (8)	-13.81	n_2 (starke Mischform)

Das verdrillte Formaldazinkonformer besitzt eine geringfügig höhere Bildungswärme als das antiperiplanare Konformer. Hedberg^[70] hat experimentell die Existenz eines verdrillten Konformers bei 225°C nachgewiesen. Bis heute wird versucht die Stabilität eines verdrillten Konformers mit quantenchemischen Methoden nachzuvollziehen^[72,75]. Ab initio Berechnungen (MP2/6-31G*) der Literatur zeigen ein verdrilltes Konformer mit einem Dihedralwinkel von 101.7°.

Tabelle 3.19: Literaturergebnisse Ab initio-Berechnung Formaldazin $\Theta = 101.7^\circ$:

Kwon ^[75] , MP2/6-31G*	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°
-	N(2)-N(3)= 1.358	C(1)-N(2)-N(3)= 118.8
	C(1)-N(2)= 1.267	H(5)-N(3)-N(2)= 123.0
	C(4)-N(3)= 1.267	H(6)-N(3)-N(2)= 117.8

Interessanterweise liegt auch bei den MNDO-Berechnungen die Bildungswärme des verdrehten Konformers nur um 9.86 kJ/mol höher verglichen mit dem antiperiplanaren Konformer und um 31.27 kJ/mol tiefer verglichen mit dem synperiplanaren Konformer.

Die Stabilität des verdrehten Konformers resultiert aus einem besonderen Orbital-Mischzustand. Das MO 11 stellte eine Mischung zwischen dem -C=N- π -System und dem „gegenüberliegenden“ Stickstoff-Lonepair dar. Die Verdrehung um die N-N-Bindung zeigt, dass die n/π -Konjugation hier offenbar in Lage ist, das Molekül mit dieser Konformation stark zu stabilisieren. n/n -Wechselwirkungen sind hier insgesamt von geringerem Ausmaß als die n/π -Wechselwirkungen. Die Stabilisierung ist so beträchtlich, dass in Abhängigkeit des Torsionswinkels sogar ein Wechsel in der Orbitalenergie-Hierarchie (bzw. der Mischformen) resultiert. Bei 0° und 180° ist die Aufspaltung der beiden obersten Orbitale (n_2 und π_2 bzw. Mischform) minimal. Im verdrehten Konformer besitzt sie dort ein Maximum. Entgegengesetzt verhalten sich die Orbitale (n_1 und π_1 bzw. Mischformen) ihre Aufspaltung ist für 0° und 180° maximal^[76]. Die Ergebnisse der Formaldazin Rechnung und die Aufspaltungen der Orbitalenergien sind in der Abbildung 3.7 zusammengefasst.

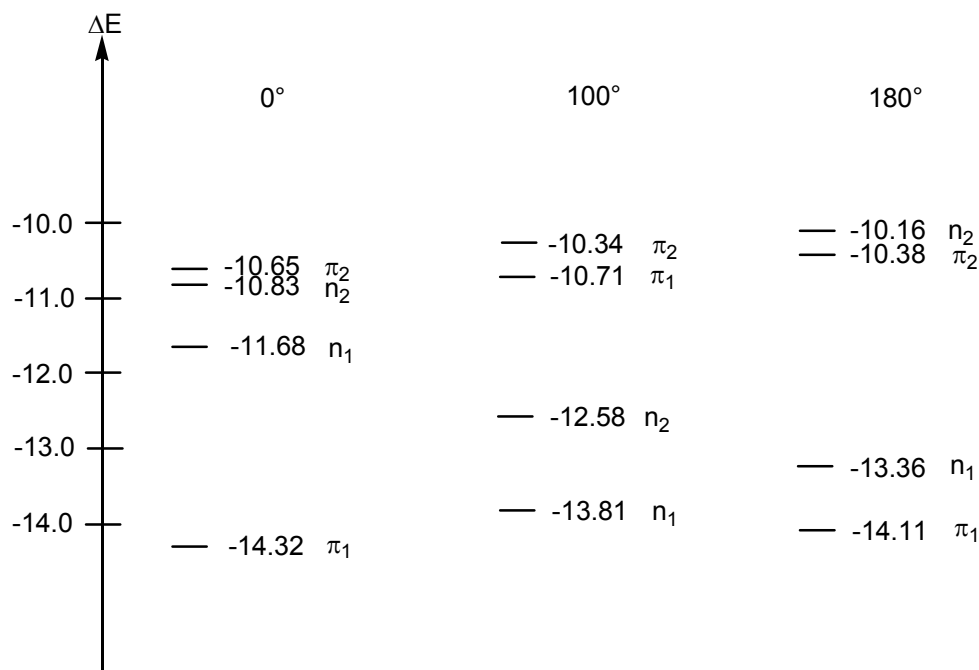


Abbildung 3.7: Variation der Energie der vier obersten Orbitale im Formaldazin

Das Ergebnis der semiempirischen Rechnungen zeigt, dass bei Azinen starke n/π -Wechselwirkungen zu berücksichtigen sind, welche in verdrehten (gauche) Konformeren auch Auswirkungen auf die energetische Lage des HOMO's haben. Die energetische Lage der HOMO's ist entscheidend für spektroskopische Verhalten von Azinen. Um die Absorptionen im UV-Vis-Spektrum und die Eigenschaften des Retinalazins besser interpretieren zu können, wurden auch semiempirische MNDO-Berechnungen für Retinalazin durchgeführt. Dabei wird die gezeigte Atom-Nomenklatur verwendet (Abb. 3.8). Diese entspricht nicht der IUPAC-Carotinoid-Nomenklatur, bietet aber Vorteile beim Erstellen und Berechnen der Z-Matrix. Gezeigt werden nur die für die Diskussion bedeutsamen Atome und Bindungen des π -Systems. Vor der Berechnung wurden die Carotinoidazine mit einer MM2 Kraftfeldrechnung^[69] geometrisch voroptimiert.

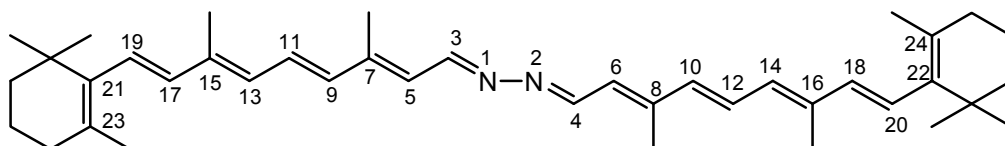


Abbildung 3.8: Atomnummerierung von **77** für die semiempirische Rechnung

Tabelle 3.20: Molekülparameter für Retinalazin **77** aus der MNDO-Berechnung

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ °	Dihedralwinkel Θ °
N(1)-N(2)= 1.389	C(3)-N(1)-N(2)= 117.5	C(3)-N(1)-N(2)-C(4)= 182.7
N(1)-C(3)= 1.304	C(4)-N(2)-N(1) = 117.2	C(5)-C(3)-N(1)-N(2) = 180.1
N(2)-C(4)= 1.304	C(5)-C(3)-N(1)= 118.4	C(6)-C(4)-N(2)-N(1) = 180.1
C(3)-C(5)= 1.457	C(6)-C(4)-N(2) = 118.6	C(7)-C(5)-C(3)-N(1)= 181.4
C(4)-C(6)= 1.456	C(7)-C(5)-C(3)= 123.0	C(8)-C(6)-C(4)-N(2)= 181.2
C(5)-C(7)= 1.351	C(8)-C(6)-C(4)= 122.9	C(9)-C(7)-C(5)-C(3)= 179.9
C(6)-C(8)= 1.351	C(9)-C(7)-C(5)= 118.8	C(4)-C(6)-C(8)-C(10)= 180.0
C(7)-C(9)= 1.459	C(6)-C(8)-C(10)= 118.5	C(13)-C(11)-C(9)-C(7)= 182.7
C(8)-C(10)= 1.459	C(11)-C(9)-C(7)= 124.6	C(14)-C(12)-C(10)-C(8)= 182.5
C(9)-C(11)= 1.342	C(12)-C(10)-C(8)= 124.5	-
C(10)-C(12)= 1.342	-	-

Als stabilstes Konformer des Retinalazins erhält man das antiperiplanare Konformer mit einem Dihedralwinkel von $\Theta=182.73^\circ$. Interessant ist nun ein Vergleich der Bildungswärmen der drei Konformationen anti-, syn- und verdreht im Retinalazin bezogen auf die C=N-N=C-Bindung.

Einzeln optimierte Bildungswärmen für folgende Konformationen:

$\Delta H_f \Theta = 182.73^\circ$	$\Delta H_f \Theta = 0^\circ$	$\Delta H_f \Theta = 256^\circ$
397.91 kJ/mol	428.99 kJ/mol	404.55 kJ/mol

Man erkennt, dass der berechnete Unterschied der Grundzustandsenergien zwischen der anti- und gauche Form lediglich 6.64 kJ/mol beträgt. Dies ist eine außergewöhnlich niedrige Energiedifferenz der beiden Formen. Trägt man die Bildungswärmen der jeweilig berechneten Retinalazinkonformere für verschiedene Dihedralwinkel bei Torsion um die zentrale C=N-N=C-Bindung auf, erhält man die folgende Abbildung 3.9.

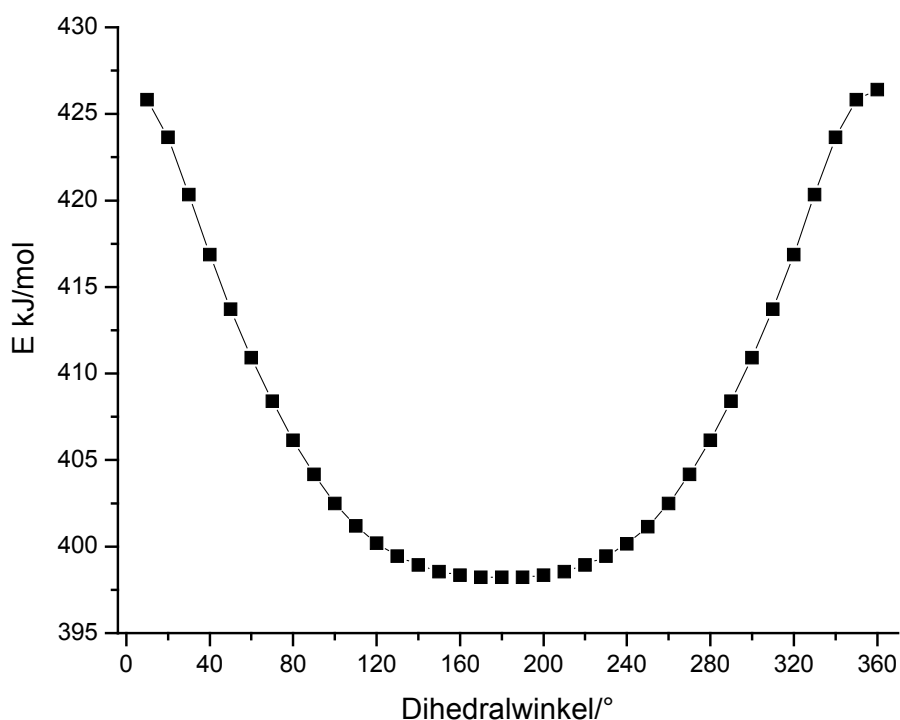


Abbildung 3.9: Variation der optimierten Bildungswärmen verschiedener Retinalazinkonformere als Funktion des Dihedralwinkels

Man erkennt, dass das antiperiplanare Konformer mit Θ ($\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{C}$)= 180° das stabilste Konformer ist. Bis zu einem Dihedralwinkel von etwa 120° (240°) sind die Anstiege der Energiekurve sehr flach. Erst ab einem Winkel von 120° steigen die Bildungswärmen stärker verdrehter Retinalazinkonformationen deutlich an.

Durch die geringen Energieunterschiede von anti- zu verdrehten Konformeren (bis zu Θ ($\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{C}$) $\approx 120^\circ$) wäre eine Torsion um die N-N-Einfachbindung beider Carotinoidhälften energetisch denkbar. Dabei würde in verdrehten Konformationen geringere Delokalisation über das π -System herrschen, als im antiperiplanaren Konformer. Die N-N-Einfachbindung wirkt dabei nicht als reiner Konjugationsunterbrecher. Das π -System wird nicht in zwei „Carotinoidhälften“ geteilt. Stattdessen wirken in der Konformation mit $\Theta = 256^\circ$, über die N-N-Einfachbindung hinweg, n/π -Wechselwirkungen und n/π^* -Wechselwirkungen.

Die entsprechenden n/π -Orbitalwechselwirkungen der verdrehten Konformation (gauche), sind in der nachfolgenden Abbildung 3.10 (Newman-Projektion) gezeigt.

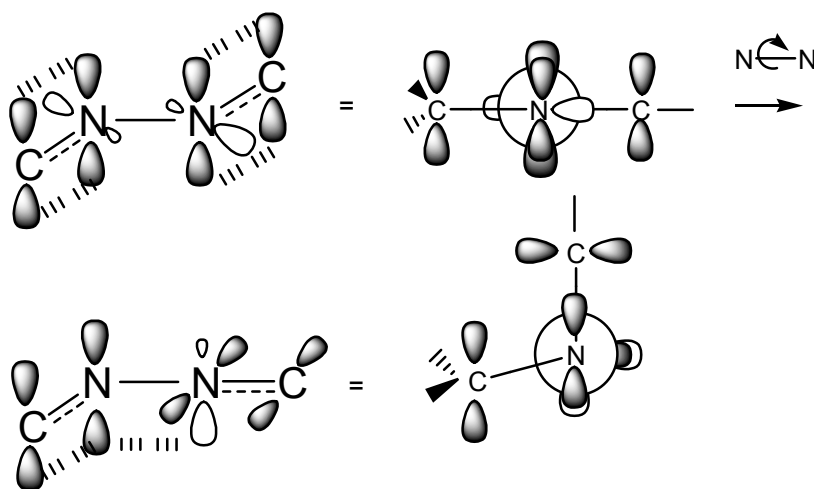


Abbildung 3.10: Orbitalanordnungen in verdrehten Azinmolekülen

Die Abbildung 3.10 macht die koplanare Anordnung der π -Bindungen mit dem nichtbindenden Elektronenpaar des benachbarten Stickstoffatoms deutlich, wobei auf eine schematisierte Darstellung der Orbitale hingewiesen werden soll. In verdrehten Konformation müssten Carotinoidazine, im Vergleich zu Carotinoiden, ein weniger ausgedehntes delokalisiertes π -System besitzen. Entsprechende UV-Vis-Absorptionen könnten somit hypschrom verschoben

sein. Betrachtet man das UV-Vis-Spektrum von Retinalazin zeigt sich eine hypsochrom verschobene Bande bei etwa 290 nm (Abbildung 3.11).

Wahrscheinlich aber weist diese Bande bei 290 nm nicht auf ein weniger stabiles Konformer hin. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Bande zu einem höher angeregten Zustand gehört. Einen Hinweis auf einen $n \rightarrow \pi^*$ Übergang in der Bande bei 290 nm kann man im Verschwinden der Bande bei Protonierung (siehe Kapitel 3.8) vermuten.

Die Bande bei 460 nm in Abbildung 3.11 beschreibt einen langwelligen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang. Das π -Elektronensystem der Carotinoidazine sollte ohne Verdrillungen um die N-N-Bindung eine ähnliche Ausdehnung besitzen, wie das π -Elektronensystem der Carotinoide mit gleicher Anzahl an Doppelbindungen.

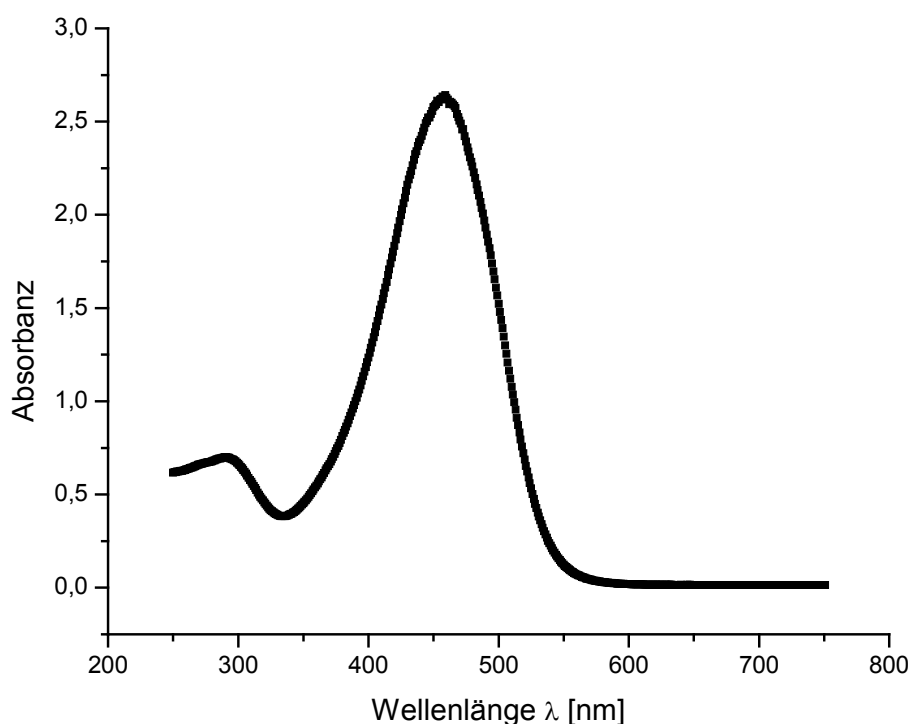


Abbildung 3.11: UV-Vis Spektrum des Retinalazins **77** ($2,9 \cdot 10^{-5}$ mol/l in Ethanol)

Neben dem Retinalazin wurden auch die stabilsten Konformationen des C₂₅-Azins **78** und des C₃₀-Azins **79** durch MNDO-Berechnungen bestimmt.

Tabelle 3.21: MNDO-Rechnung C₂₅-Azin **78** $\Theta=180^\circ$ (anti) $\Delta H_f = 577.07$ kJ/mol:

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(1)-N(2)= 1.390	C(3)-N(1)-N(2)= 117.5	C(3)-N(1)-N(2)-C(4)= 182.2
C(3)-N(1)= 1.301	C(4)-N(2)-N(1)= 117.1	-
C(4)-N(2)= 1.302	-	-

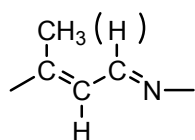
Für das C₂₅-Azin wurde das antiperiplanare Konformer mit einem Dihedralwinkel zwischen C(3)-N(1)-N(2)-C(4) von $\Theta=182.18^\circ$ gefunden ($\Delta H_f=577.07$ kJ/mol).

Tabelle 3.22: MNDO-Rechnung C₃₀-Azin **79** $\Theta=180^\circ$ (anti) $\Delta H_f = 746.84$ kJ/mol:

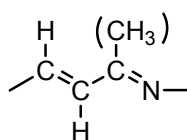
Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(1)-N(2)= 1.391	C(3)-N(1)-N(2)= 117.5	C(3)-N(1)-N(2)-C(4)= 180.6
C(3)-N(1)= 1.302	C(4)-N(2)-N(1)= 117.5	-
C(4)-N(2)= 1.303	-	-

Das C₃₀-Azin besitzt ebenfalls eine antiperiplanare Konformation mit einem Dihedralwinkel zwischen C(3)-N(1)-N(2)-C(4) von $\Theta=180.58^\circ$ ($\Delta H_f=746.84$ kJ/mol).

In der Betrachtung der Bildungswärmen der C₂₅- und C₃₀-Azinkonformere muss beachtet werden, dass diese Azinmoleküle sterisch anspruchsvollere Methylgruppen in 2-Position (bezogen auf die Azingruppierung) besitzen.



Retinalazin

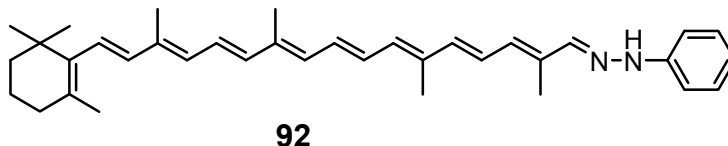
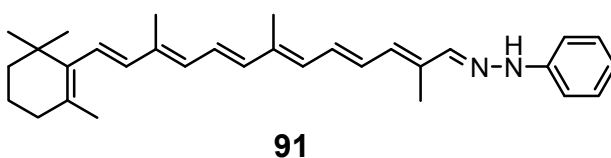
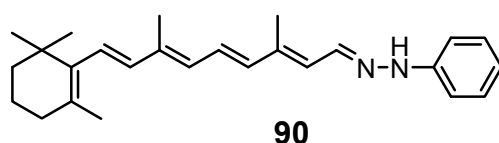
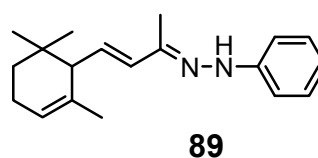
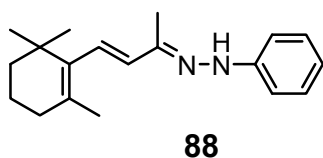


C₂₅-Azin und C₃₀-Azin

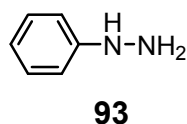
Das Retinalazin besitzt in dieser 2-Position nur Wasserstoffatome. Die MNDO-Rechnungen zeigen bei C₂₅- und C₃₀-Azin, dass die Methylgruppensubstituenten und ihre sterische Hinderung deutlich größeren Einfluss auf freie Drehbarkeit der zentralen N-N-Bindung besitzen.

3.5 Darstellungen der Carotinoidphenylhydrazone

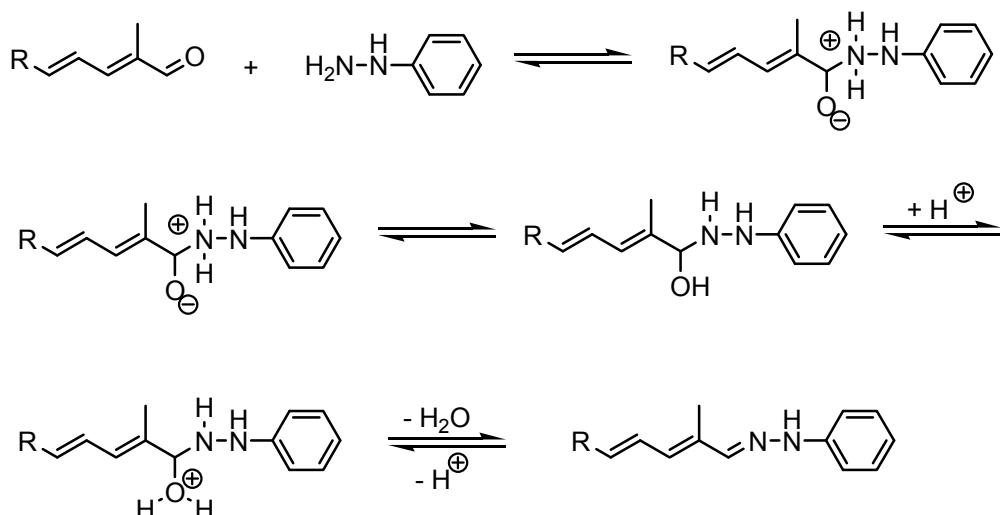
Um die Ergebnisse der konformativen Untersuchungen zu Carotinoidazinen zu vertiefen wurden folgende „unsymmetrische“ stickstoffhaltige Carotinoidhydrazone dargestellt.



Allgemein reagieren Carbonylverbindungen leicht mit verschiedenen Stickstoffbasen. Die Reaktion erfolgt um so leichter, je stärker nucleophil die Stickstoffbasen sind, dies gilt insbesondere für primäre Amine ($pK_S \approx 9 - 11$)^[77], welche sich mitunter direkt und ohne saure Katalyse umsetzen lassen. So gelingt der Umsatz mit Phenylhydrazin **93** und Carbonylverbindungen leicht.

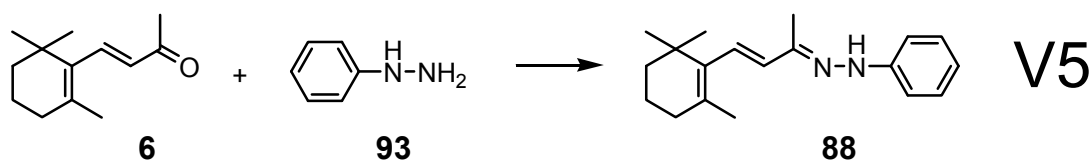


Die Umsetzung mit Phenylhydrazinen verläuft häufig mit sehr guten Ausbeuten, so dass die Substanz in der chemischen Analytik von Carbonylverbindungen eingesetzt wurde^[78]. Die Reaktion lässt sich über das allgemeine Reaktionsschema beschreiben:

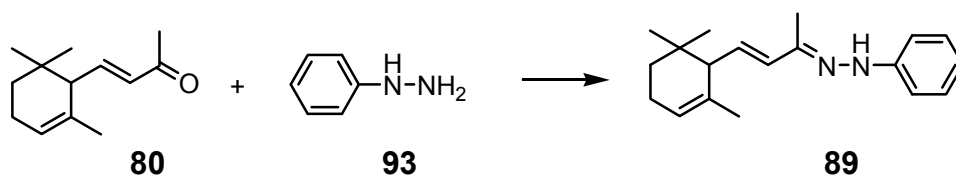


Um so erstaunlicher ist es, dass in der Literatur kaum Carotinoidphenylhydrazonverbindungen beschrieben sind. Der Grund für die schlechte Dokumentation der Carotinoidphenylhydrazone lässt sich verstehen, wenn man die Synthese von β -Iononphenylhydrazon **88** und α -Iononphenylhydrazon **89** näher betrachtet:

Synthese von β -Iononphenylhydrazon **88**:



Synthese von α -Iononphenylhydrazon **89**:

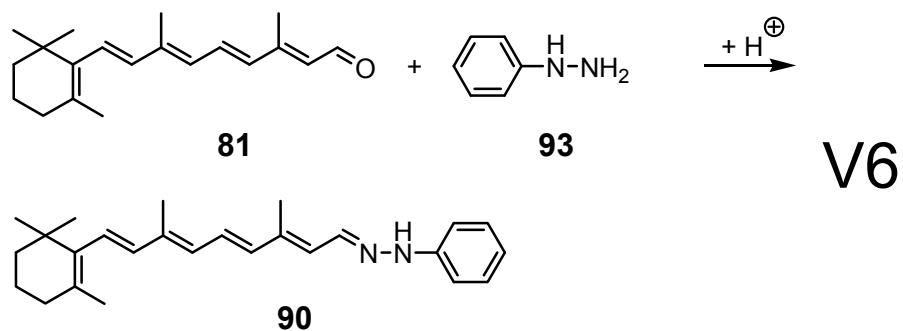


Beide Verbindungen lassen sich nur als Öle isolieren. Um die Verbindungen dennoch kristallin zu erhalten wurden mehrere verschiedene Aufarbeitungswege getestet.

Zunächst wurde in verschiedenen Lösungsmitteln gearbeitet, in denen die Hydrazone schlecht löslich sein sollten, um sich direkt kristallin aus dem Reaktionsgemisch abzuscheiden. Es wurde mit verschiedenen Ethanol/Toluol-Gemischen gearbeitet. Aus keiner dieser Lösungsmittelzusammensetzung ließ sich ein kristallines Produkt erhalten. Die Reaktion wird aufgrund der

Hydrolyseempfindlichkeit der Hydrazone am besten wasserfrei durchgeführt. Desweiteren wurde die Reaktion in verschiedenen Säuren, und bei verschiedenen Säurekonzentrationen durchgeführt. Weder die Verwendung katalytischer Mengen an konzentrierter Salzsäure, noch die Verwendung reiner Essigsäure als Lösungsmittel führte zu einem kristallinen Produkt. Auch die säulenchromatographische Aufarbeitung der erhaltenen Hydrazon-Öle an Kieselgel, mit dem Eluens Hexan : Chloroform : Essigsäureethylester / 88 : 9 : 3 v/v/v, brachte nur eine gelbliche zähe Flüssigkeit, welche nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Auch die säulenchromatographische Reinigung an Aluminiumoxid mit dem Eluens Ethanol : Hexan 98 : 2 v/v ergab auch nur ein gelbes Öl. Mit diesem Befund und der Feststellung, dass in der Literatur kein Hinweis auf eine kristalline Struktur (Schmelzpunkt) zu finden ist, sollte es sich bei den Iononphenylhydrazonen **88** und **89** um Öle handeln. Die massenspektroskopische Analyse liefert den korrekten Molmassenpeak $[M-1]^+$ 380 m/z. Wichtig anzumerken ist, dass die erhaltenen Produkte sehr labil sind. Dies gilt insbesondere für das α -Iononphenylhydrazon, welches trotz Lichtausschluss, Schutzgasatmosphäre und Trockeneiskühlung nach 8 Stunden fast vollständig in ein schwarz-braunes Harz zerfallen ist. Auf das Problem der Säureempfindlichkeit von α -Ionon und der resultierenden sauer katalysierten Umlagerung von α - in β -Ionon, wurde schon bei der α -Iononazinsynthese hingewiesen. Die Haltbarkeit von β -Iononphenylhydrazon ist dagegen deutlich größer. Aber auch hier gibt es eine hohe Tendenz des Produktes sich zu einem braunen Harz zu zersetzen. Daher stehen α - und β -Iononphenylhydrazon nicht für fundierte UV-Vis-Spektroskopie zu Verfügung.

Die Darstellungen der anderen Phenylhydrazone wie dem Retinalphenylhydrazon **90** gelingen dagegen glatt. Dabei fällt das Retinalphenylhydrazon in gelben Kristallen an.



In Abbildung 3.13 ist das ^1H -NMR-Spektren des Retinalphenylhydrazons **90** wiedergegeben. Die Zuordnungen der Signale sind in Tabelle 3.19 aufgeführt. Folgende, aus der Carotinoidnomenklatur abgeleitete Bezifferung der Atome für Retinalphenylhydrazone **90** wird verwendet:

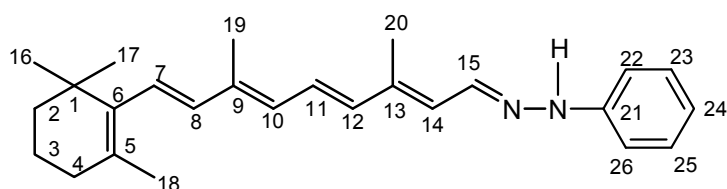


Abbildung 3.12: Bezifferung von **90** für die NMR-Zuordnung

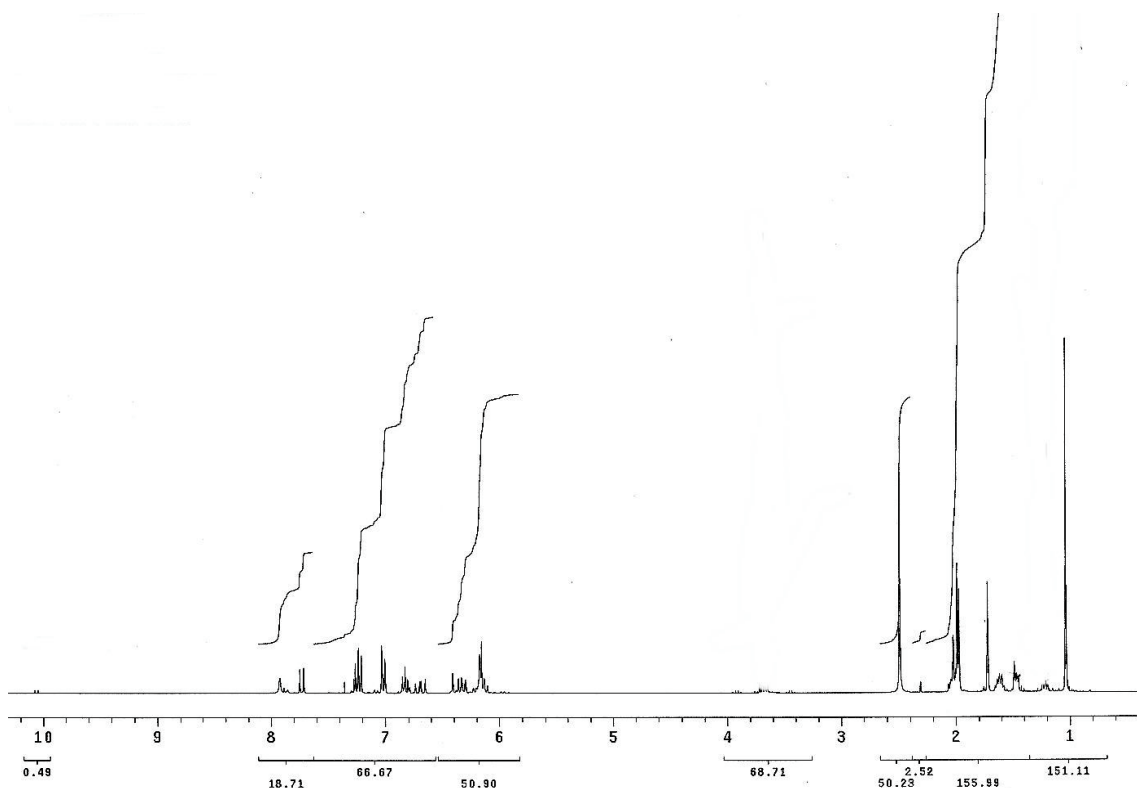


Abbildung 3.13: ^1H -NMR Spektrum von Retinalphenylhydrazon **90**
(500 MHz, Lsm. CDCl_3)

Tabelle 3.23: Zuordnung der ^1H -NMR Signale von Retinalphenylhydrazon **90**:

H-Atom	ppm	Intensität	Multiplizität	Kopplung [Hz]
H-16,17	1.03	6H	s	-
H- 2	1.45-1.49	2 H	m	-
H- 3	1.60-1.64	2 H	m	-
H-18	1.72	3 H	s	-
H-19	1.97	3 H	s	-
H-20	1.99	3 H	s	-
H-4	2.02-2.07	2 H	m	-
H-8	6.13	1 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 15.9$
H-10	6.16	1 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 13.0$
H-7	6.20	1 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 16.6$
H-12	6.36	1 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 14.9$
H-11	6.69	1 H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 11.3$ $^3J_{\text{HH}} = 14.8$
H-24	6.80-6.86	1 H	m	-
H-23,25	7.00-7.09	2 H	m	-
H-22,26	7.23-7.27	2 H	m	-
H-14	7.73	1 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 10,1$
H-15	7.90	1 H	d	$^3J_{\text{HH}} = 11,1$
N-H	7.93	1H	br	-

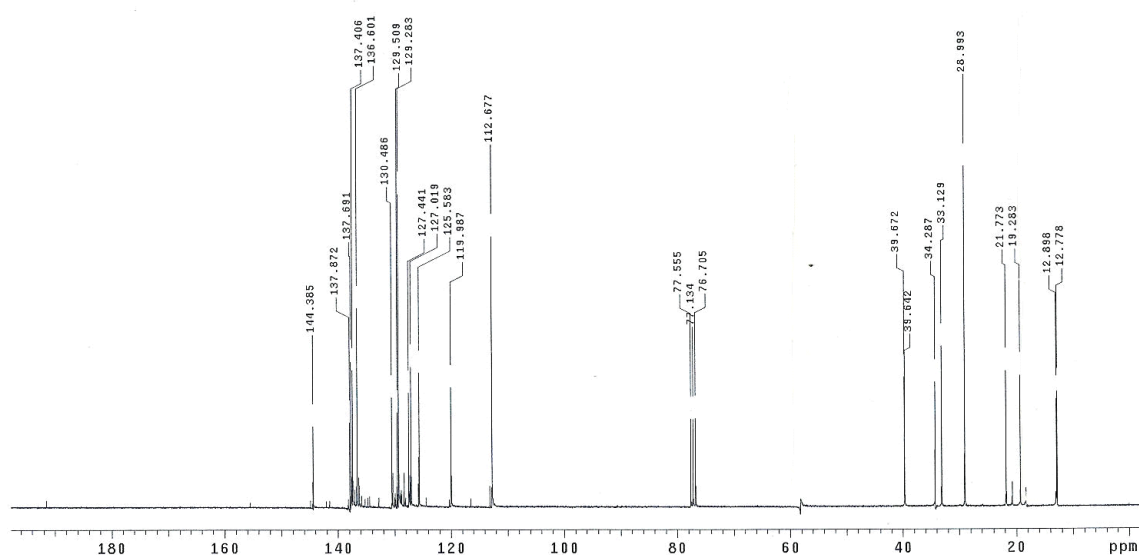
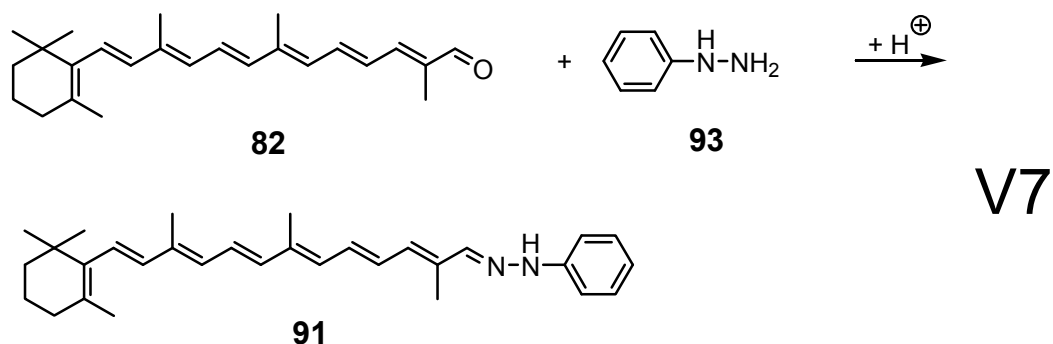


Abbildung 3.14: ^{13}C -NMR Spektrum von Retinalphenylhydrazon **90**
(125 MHz, Lsm. CDCl_3)

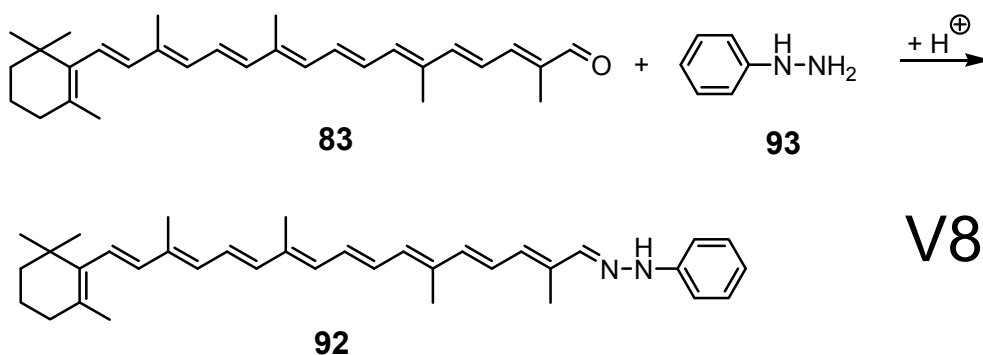
Tabelle 3.24: Zuordnungen der ^{13}C -NMR Verschiebungen von **90**:

C-Atom	ppm	C-Atom	ppm
19	12.78	23	129.28
20	12.89	25	129.28
3	19.28	12	129.51
18	21.77	11	129.59
16	28.99	5	130.49
17	28.99	8	134.77
4	33.13	10	135.88
1	33.29	14	137.08
2	39.64	9	137.41
22	112.67	13	137.69
26	112.67	6	137.87
24	119.99	21	144.39
7	125.58	15	144.50

Die Umsetzung von C₂₅-Aldehyd mit Phenylhydrazon liefert das C₂₅-Aldehydphenylhydrazon **91**, welches orange Kristalle bildet:



Bei der Umsetzung des C₃₀-Aldehydes mit Phenylhydrazin erhält man rötliche Kristalle, das C₃₀-Aldehydphenylhydrazon **92**.

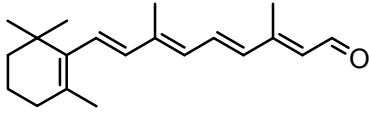
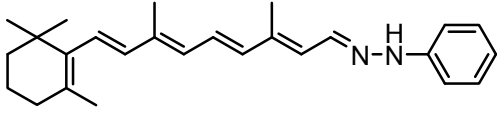
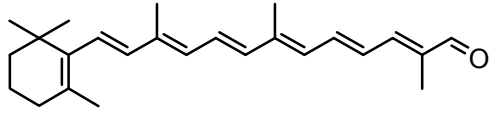
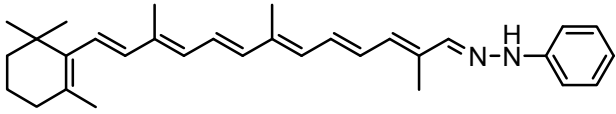
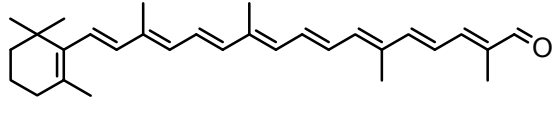
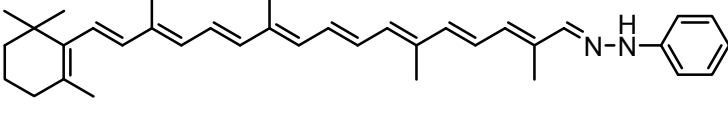


Nach einmaliger Umkristallisation in Ethanol liefern alle Hydrazone einen konstanten Schmelzpunkt. Für spektrale Analysen werden die Hydrazone säulenchromatographisch an Kieselgel, mit n-Hexan als Eluens, von anhaftendem Aldehyd gereinigt.

3.6 UV-Vis- Spektroskopie der Carotinoidphenylhydrazone

Die Absorptionsmaxima der dargestellten Carotinoidphenylhydrazone zeigen, dass mit vinyloger Verlängerung der Hydrazone die langwelligen Absorptionen bathochrom verschoben werden.

Tabelle 3.25: Absorptionsmaxima der dargestellten Carotinoidphenylhydrazone

Nr.	Verbindung	λ_{max} (Hexan)	λ_{max} (CHCl ₃)
81		368.4	-
90		396.8	418.4
82		412.4	-
91		435.6	446.8
83		454.2	-
92		464.4	478.8

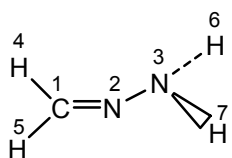
Bei dem Vergleich der UV-Vis-Absorptionen der Carotinoidphenylhydrazone mit den entsprechenden Polyenaldehyden stellt man für alle Verbindungen eine bathochrome Farbvertiefung fest. Aus dieser Reihe ist die bathochrome Verschiebung von Retinal zu Retinalphenylhydrazon mit 28.4 nm am größten. Für den C₂₅-Aldehyd und das C₂₅-Phenylhydrazon beträgt sie noch 23.2 nm. Die Verschiebung von 10.2 nm ist für das C₃₀-Phenylhydrazon, verglichen mit dem C₃₀-Aldehyd, am geringsten. Die Ursache der geringeren bathochromen Verschiebung ist der immer stärker wirkende Einfluß des carotinoidischen π -Elektronensystems gegenüber der Phenylhydrazongruppierung. Diesen Effekt

findet man auch beim Vergleich der carotinoidischen Phenylhydrazone untereinander. So absorbiert das Retinalphenylhydrazon in Hexan mit 6 π -Bindungen bei 396.8 nm. Das C₂₅-Phenylhydrazon mit 8 π -Bindungen absorbiert bei 435.6 nm. Dies entspricht einer Differenz von 36.8 nm. Die Differenz von C₂₅- zu C₃₀-Phenylhydrazon, mit 8 π -Bindungen zu 10 π -Bindungen, beträgt nur noch 28.8 nm. Alle dargestellten Phenylhydrazone zeigen beim Lösungsmittelwechsel von Hexan nach Chloroform ausgeprägte positive Solvatochromie. Die bathochrome Verschiebung gegenüber den Polyenaldehyden lässt sich dadurch deuten, dass Wechselwirkungen des carotinoidischen Polyensystems mit der Hydrazongruppe bestehen. Dabei wird die Delokalisation des π -Polyensystems wahrscheinlich über n/ π -Wechselwirkung ausgeweitet, und die π -Elektronen des Phenylrings werden in die gesamte Konjugation des π -System einbezogen. Um diese Einflüsse genau zu quantifizieren wurden semiempirische Berechnungen durchgeführt.

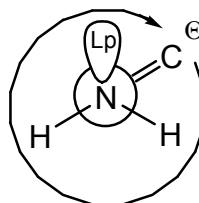
3.7 Semiempirische Berechnungen der Carotinoidhydrazone

Um den Einfluss von nichtbindenden Stickstofforbitalen und Torsionen um die N-N-Bindung auf die elektronische Struktur und damit auf die Absorptionsspektren von Carotinoidphenylhydrazonen zu beschreiben, wurden semiempirische MNDO-(**M**odified **N**eglect of **D**ifferential **O**verlap) Rechnungen durchgeführt^[67,68].

Um generelle Wechselwirkungen zu beschreiben werden zunächst die Konformationen im einfachsten Hydrazon, dem Formaldehydhydrazon, berechnet. Die Struktur der Formaldehydhydrazonmoleküle wurden mit einer MM2 Kraftfeldrechnung voroptimiert (Allinger)^[69], und dann mit Hilfe einer MNDO-Rechnung berechnet.



Formaldehydhydrazon



Für das Formaldehydhydrazon wurden verschiedene Verdrillungswinkel Θ Lone-pair (Lp)-N(3)-N(2)=C(1) voreingestellt und dann die Restgeometrie berechnet. Um ein Maß der Planarisierung beziehungsweise den pyramidalen Bau des Hydrazon-Restes anzugeben, wird der Winkel τ bestimmt. τ beschreibt den Winkel des Schnittpunktes der gedachten Verlängerung der Bindungsachse N(2)-N(3) mit der Ebene, aufgespannt aus den Atomen H(7)-N(3)-H(6).

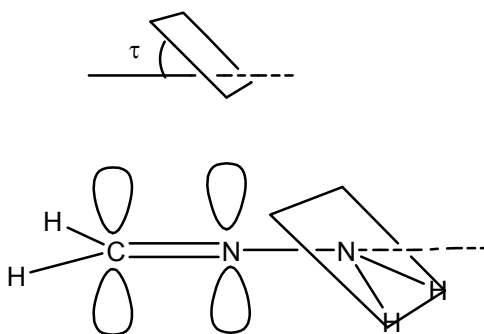


Tabelle 3.26: MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=0^\circ$ $\Delta H_f=135.32$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau=55.6^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2 = 327.7^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.376	C(1)-N(2)-N(3)= 116.5	Lp-N(3)-N(2)-C(1)= 0.0
C(1)-N(2)= 1.296	N(2)-N(3)-H(6)= 108.8	H(7)-N(3)-N(2)-C(1)= 241.0
C(1)-H(5)= 1.098	N(2)-C(1)-H(5)= 128.2	H(7)-N(3)-N(2)-C(1)= 120.1
-	N(2)-C(1)-H(4)= 117.5	-
-	H(6)-N(3)-H(7)= 110.1	-

Folgende energetische Parameter wurden für das Formaldehydhydrazon $\Theta=0^\circ$ erhalten:

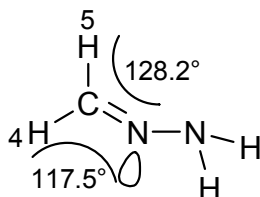
Tabelle 3.27: Ergebnis der MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=0^\circ$

E	E [eV]	Orbital
HOMO (9)	-9.85	n_1
HOMO-1 (8)	-11.63	π_1
HOMO-2 (7)	-13.00	n_2

Das Formaldehydhydrazon mit dem Verdrillungswinkel $\Theta=0^\circ$ besitzt die Bildungswärme von $\Delta H_f=135.32$ kJ/mol. Es stellt nicht die stabilste Konformation dar. Der Winkel τ von 55.6° zeigt an, dass der Hydrazonrest $=\text{N}-\text{NH}_2$ eine pyramidale Anordnung hat. Damit besitzt das Stickstoffatom in der Aminogruppe $-\text{NH}_2$ hohen sp^3 -Hybridcharakter. Durch die Form des sp^3 -hybridisierten nichtbindenden Elektronenpaars und der nicht parallelen räumlichen Anordnung zum π -System der Iminogruppe existieren in dieser Konformation keine n/π -Wechselwirkungen und auch keine n/n -Wechselwirkungen. Die Länge der N-N-Bindung von 137.6 nm zeigt ebenfalls geringe n/π -Konjugation zwischen Iminogruppe dem freien Elektronenpaar der Aminogruppe an. Auch die Summe der Bindungswinkel in der Aminogruppe von 327.7° zeigt eine pyramidale (328.5°) statt einer planaren Anordnung (360°) an.

Eine Besonderheit wird für die Bindungswinkel der Wasserstoffatome H(4) und H(5) der Iminogruppe gefunden. Für beide Wasserstoffatome wird ein

Bindungswinkel (sp^2) von 120° erwartet. Der Bindungswinkel von N(2)-C(1)-H(5) beträgt 128.2° . Der Bindungswinkel zwischen N(2)-C(1)-H(4) beträgt 117.5° .



Diese Abweichungen vom idealen Bindungswinkel 120° der Wasserstoffatome H(4) und H(5) werden für alle Formaldehydhydrazonkonformere gefunden.

Tabelle 3.28: MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=60^\circ$ (gauche) $\Delta H_f=130.82$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau=50.5^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2=330.0^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.375	C(1)-N(2)-N(3)= 119.6	Lp-N(3)-N(2)-C(1)= 60.0
C(1)-N(2)= 1.297	N(2)-N(3)-H(6)= 108.1	-
C(1)-H(5)= 1.095	N(2)-C(1)-H(5)= 128.1	-
-	N(2)-C(1)-H(4)= 117.4	-
-	H(6)-N(3)-H(7)= 108.0	-

Tabelle 3.29: Ergebnis der MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=60^\circ$

MO	E [eV]	Orbital
HOMO (9)	-9.90	π_1
HOMO-1 (8)	-11.40	n_1 (Mischform)
HOMO-2 (7)	-13.89	n_2

Das Formaldehydhydrazon mit dem Verdrehungswinkel $\Theta=60^\circ$ stellt mit einer Bildungswärme von $\Delta H_f=130.82$ kJ/mol die stabilste Konformation dar. Die Aminogruppe im Hydrazonrest $-\text{NH}_2$ zeigt einen geringeren pyramidalen Winkel von $\tau=50.5^\circ$. Trotz möglicher Wechselwirkung des π -Systems mit dem nichtbindenden Elektronenpaar zeigt sich im Molekül keine n/π -Konjugation. Die energetische Lage der obersten besetzten Orbitale wird wahrscheinlich durch die sterisch günstigste Anordnung von Imingruppe ($-\text{C}=\text{N}-$) zu Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) bedingt.

Tabelle 3.30: MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=90^\circ$ (verdrillt) $\Delta H_f=135.51$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau = 47.9^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2 = 331.2^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.351	C(1)-N(2)-N(3)= 122.0	Lp-N(3)-N(2)-C(1)= 90.0
C(1)-N(2)= 1.298	N(2)-N(3)-H(6)= 108.8	-
C(1)-H(5)= 1.095	N(2)-C(1)-H(5)= 128.0	-
-	N(2)-C(1)-H(4)= 117.5	-
-	H(6)-N(3)-H(7)= 106.6	-

Tabelle 3.31: Ergebnis der MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=90^\circ$

MO	E [eV]	Orbital
HOMO (9)	-10.03	π_1
HOMO-1 (8)	-11.43	n_1 (Mischform)
HOMO-2 (7)	-13.61	n_2 (Mischform)

Überraschenderweise stellt das Formaldehydhydrazon mit dem Verdrillungswinkel $\Theta=90^\circ$ und der Bildungswärme von $\Delta H_f=135.51$ kJ/mol nicht die stabilste Konformation für Formaldehydhydrazone dar. Die Aminogruppe im Hydrazonrest besitzt pyramidale Anordnung ($\tau = 47.9^\circ$). Trotz paralleler Anordnung von π -System mit dem nichtbindenden Elektronenpaar, zeigt sich im Formaldehydhydrazon wenig n/π^* -Konjugation. Die konformationsabhängige Aufspaltung der obersten besetzten π - und n -Orbitale wird über komplexe $-\text{NH}_2/\text{H}_2\text{C}=\text{N}$ - Wechselwirkungen bedingt.

Abschließend sind die Berechnungen der Formaldehydhydrazonkonformationen mit $\Theta=120^\circ$ und $\Theta=180^\circ$ gezeigt. Die Bildungswärme der $\Theta=120^\circ$ Konformation ($\Delta H_f=143.40$ kJ/mol) liegt deutlich über der $\Theta=60^\circ$ gauche-Konformation, was auf sterische Abstoßungen der Imingruppe mit den Wasserstoffatomen der Aminogruppe zurückzuführen ist.

Die höchste Bildungswärme besitzt die Konformation mit $\Theta=180^\circ$ ($\Delta H_f= 164.40$ kJ/mol). Auch hier überwiegen stereoelektronische n/n -, σ/π - und σ/σ -Abstoßungen über mögliche stabilisierende n/π^* -Wechselwirkungen.

Tabelle 3.32: MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=120^\circ$ (verdrillt) $\Delta H_f=143.40$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau=50.3^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2=331.3^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.353	C(1)-N(2)-N(3)= 122.7	Lp-N(3)-N(2)-C(1)= 120.0
C(1)-N(2)= 1.298	N(2)-N(3)-H(6)= 109.3	-
C(1)-H(5)= 1.096	N(2)-C(1)-H(5)= 128.0	-
	N(2)-C(1)-H(5)= 117.6	
-	H(6)-N(3)-H(7)= 106.4	-

Tabelle 3.33: Ergebnis der MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=120^\circ$

MO	E [eV]	Orbital
HOMO (9)	-10.14	π_1
HOMO-1 (8)	-11.47	n_1 (starke Mischform)
HOMO-2 (7)	-13.16	n_2 (starke Mischform)

Tabelle 3.34: MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=180^\circ$ $\Delta H_f=164.40$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau=49.5^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2=331.0^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(2)-N(3)= 1.368	C(1)-N(2)-N(3)= 123.1	Lp-N(3)-N(2)-C(1)= 180.0
C(1)-N(2)= 1.298	N(2)-N(3)-H(6)= 112.2	-
C(1)-H(5)= 1.097	N(2)-C(1)-H(5)= 128.2	-
-	H(6)-N(3)-H(7)= 106.6	-

Tabelle 3.35: Ergebnis der MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon $\Theta=180^\circ$

MO	E [eV]	Orbital
HOMO (9)	-10.36	n_1
HOMO-1 (8)	-11.47	π_1
HOMO-2 (7)	-13.16	n_2 (starke Mischform)

Ein Vergleich der eigenen Formaldehydhydrazon-Berechnungen mit Berechnungen von Pacansky^[79] zeigt einige Unterschiede. Pacansky führte Ab-initio Berechnungen mit Formaldehydhydrazon durch. Als stabilste Konformation wird eine verdrehte Konformation mit $\text{Lp-N(3)-N(2)-C(1)} \angle = 98.1^\circ$ gefunden. Die Aminogruppe des Hydrazonrestes ist pyramidal angeordnet und als reines sp^3 -Hybrid ausgebildet. Aufgrund der so berechneten Anordnung überlappt das n-Orbital des sp^3 -hybridisierten Stickstoffs nicht mit dem π -System. Für das Formaldehydhydrazonmolekül beschreibt Pacansky keine n/π -Wechselwirkung.

Tabelle 3.36: Literaturergebnisse Pacansky Ab initio-Rechnung für pyramidales Formaldehydhydrazon mit einem Dihedralwinkel $\angle \text{C(1)-N(2)-N(3)-H(6)} = 157.8^\circ$

Pacansky ^[79] , STO-3G	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°
-147.1341 Hartree	N(2)-N(3)= 1.440	H(4)-C(1)-N(2)= 118.7
	C(1)-N(2)= 1.278	H(5)-C(1)-N(2)= 124.4
	C(1)-H(4)= 1.088	C(1)-N(2)-N(3)= 114.8
	C(1)-H(5)= 1.085	N(2)-N(3)-H(6)= 110.3
	N(3)-H(6)= 1.034	N(2)-N(3)-H(7)= 106.2
	N(3)-H(7)= 1.037	-

Auch Benassi^[80] hat Ab-initio Berechnungen (MP2/6-31G*) an Formaldehydhydrazonen durchgeführt. Als stabilste Konformation wird eine verdrehte Konformation mit $\text{Lp-N(3)-N(2)-C(1)} \angle = 99.1^\circ$ gefunden. Benassi beschreibt jedoch für die Aminogruppe in der Hydrazongruppierung eine planare Anordnung. Der Amino-Stickstoff wird als $\text{sp}^2(\text{p})$ -hybridisiert beschrieben. Das einzelne p-Orbital kann nun aufgrund seiner Geometrie und seiner parallelen Anordnung zum C=N- π -System sehr gut wechselwirken. Allerdings sollte nicht unberücksichtigt bleiben, dass eine planare Anordnung für eine Aminogruppe im Formaldehydhydrazon recht unwahrscheinlich erscheint. Die pyramidale sp^3 -Anordnung, wie bei Pacansky oder auch Pople^[81] beschrieben, sollte die deutlich bevorzugte Anordnung sein, insbesondere wenn stark elektronenziehende Substituenten an der Aminogruppe fehlen.

Tabelle 3.37: Literaturergebnisse Benassi^[80] Ab initio-Rechnung für planares Formaldehydhydrazon mit einem Dihedralwinkel Θ C(1)-N(2)-N(3)-H(6)= 172.8°

Benassi ^[80] , MP2/6-31G*	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ °
-149.5107 a.u.	N(2)-N(3)= 1.351	H(4)-C(1)-N(2)= 118.4
	C(1)-N(2)= 1.260	H(5)-C(1)-N(2)= 123.3
	C(1)-H(4)= 1.068	C(1)-N(2)-N(3)= 121.0
	C(1)-H(5)= 1.078	N(2)-N(3)-H(6)= 115.9
	N(3)-H(6)= 0.985	N(2)-N(3)-H(7)= 121.6
	N(3)-H(7)= 0.993	-

Die Ergebnisse der MNDO-Berechnungen zu Formaldehydhydrazonen von Rademacher^[82] sind sehr ähnlich zu den eigenen Ergebnissen. Rademacher beschreibt die Konformation mit Lp-N(3)-N(2)-C(1) Θ = 0° als stabilste Form, die berechneten Energieunterschiede zu stärker verdrehten (gauche) Konformationen sind sehr gering. So besitzt das Formaldehydhydrazon mit der Konformation Lp-N(3)-N(2)-C(1) von Θ = 60° lediglich eine um 0.08 kJ/mol höhere Bildungsenthalpie als die Konformation mit Θ = 0°. Erst ab einem Verdrehungswinkel größer 90° steigen die Bildungswärmen der jeweiligen Konformationen deutlich an. Die Aminogruppe wird als pyramidal und sp³-hybridisiert angegeben.

Tabelle 3.38: Literaturergebnisse Rademacher^[82] MNDO-Rechnung Formaldehydhydrazon mit einem Dihedralwinkel Θ C(1)-N(2)-N(3)-Lp= 0°

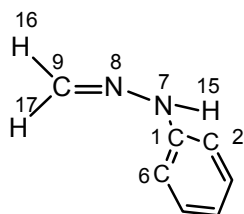
Rademacher ^[82] , MNDO	Bindungslänge A	Bindungswinkel φ °
ΔH_f = 130.88 kJ/mol	N(2)-N(3)= 1.379	H(4)-C(1)-N(2)= 128.2
	C(1)-N(2)= 1.294	H(5)-C(1)-N(2)= 117.5
	C(1)-H(4)= 1.096	C(1)-N(2)-N(3)= 116.8
	C(1)-H(5)= 1.097	N(2)-N(3)-H(6)= 106.8
	N(3)-H(6)= 0.985	H(6)-N(3)-H(7)= 103.2
	N(3)-H(7)= 0.993	-

Erweitert man die Untersuchungen zu Strukturparametern und Stabilitäten bei Verdrillung der Formaldehydhydrazonen auf die Formaldehydphenylhydrazone so zeigt sich, dass die Interpretation deutlich erschwert wird. Es wird durch die unsymmetrische Substitution der Aminogruppe, von -NH_2 zu -N(H)-Phenyl , die Anzahl der möglichen Wechselwirkungen erhöht.

Der stabilisierende Einfluss der n/π^* -Konjugation zwischen Amino(-NH_2) und Imingruppe(-C=N-) ist auch in Phenylhydrazonen von geringer Bedeutung. Der Phenylring besitzt jedoch einen starken elektronenziehenden und mesomeren Effekt. Dadurch erhält die Amino(-NH_2)- $n/$ (Phenyl)- π -Konjugation größere Bedeutung. Um diese Konjugation zu maximieren, reagieren die Phenylgruppen, bei Torsion um die N-N-Bindung, mit Verdrillung um die N-Phenyl-Bindung. Die Aminogruppe reagiert bei Amino(-NH_2)- $n/$ (Phenyl)- π -Wechselwirkung mit Planarisierung. Die Ebenenwinkel τ sind um etwa $10\text{-}15^\circ$ flacher als in den entsprechenden Formaldehydhydrazonen. Die Aminogruppe besitzt deutlichen schwächeren sp^3 -Charakter.

Diese komplexen Einflüsse erschweren die Interpretation, da bei der Diskussion von Phenylhydrazonen zusätzlich tordierte „Zwischen“-Konformationen des Phenylring berücksichtigt werden müssen. Bei Formaldehydphenylhydrazonen haben n/n - und (Amino) n/π (C=N)-Wechselwirkungen geringen Einfluss auf die Stabilität der Konformationen. Die stabilste Konformation wird durch Amino (-NH_2) $n/$ (Phenyl)- π -Konjugation, sowie den sterischen σ/σ -Wechselwirkungen zwischen Aminogruppe (-NH_2) und Imingruppe (-C=N-) bedingt.

Unter den Formaldehydphenylhydrazonen mit den Verdrillungswinkeln von $\text{C(9)-N(8)-N(7)-Lp(7)} \ \Theta = 0^\circ$, $\Theta = 90^\circ$ und $\Theta = 180^\circ$ wurde das Konformer mit dem Verdrillungswinkel $\Theta = 0^\circ$ als das stabilste bestimmt.



Formaldehydphenylhydrazon

Formaldehydphenylhydrazon $\Theta = 0^\circ$:

Tabelle 3.39: Geometrieparameter Formaldehydphenylhydrazon $\Theta = 0^\circ$ $\Delta H_f = 259.02$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau = 45.0^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2 = 324.5^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(7)-N(8)= 1.383	N(7)-N(8)-C(9)= 116.6	Lp N(7)-N(8)-C(9)= 0
-	H(17)-C(9)-N(8)= 128.3	N(8)-N(7)-C(1)-C(6)= 259.6

Formaldehydphenylhydrazon $\Theta = 90^\circ$:

Tabelle 3.40: Geometrieparameter Formaldehydphenylhydrazon $\Theta = 90^\circ$ $\Delta H_f = 262.64$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau = 38.6^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2 = 335.8^\circ$):

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(7)-N(8)= 1.299	N(7)-N(8)-C(9)= 112.2	Lp N(7)-N(8)-C(9)= 90
-	H(17)-C(9)-N(8)= 128.2	N(8)-N(7)-C(1)-C(6)= 286.5

Formaldehydphenylhydrazon $\Theta = 180^\circ$:

Tabelle 3.41: Geometrieparameter Formaldehydphenylhydrazon $\Theta = 180^\circ$ $\Delta H_f = 289.17$ kJ/mol (Ebenenwinkel $\tau = 43.5^\circ$, Σ Bindungswinkel $-\text{NH}_2 = 336.9^\circ$):

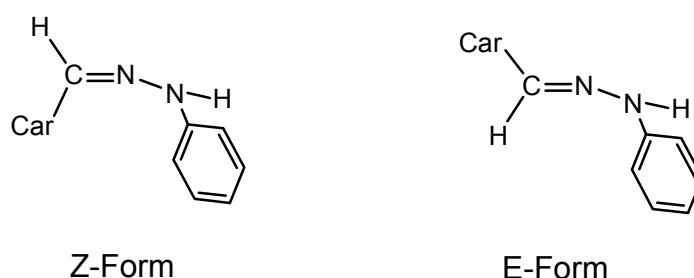
Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(7)-N(8)= 1.373	N(7)-N(8)-C(9)= 123.7	Lp N(7)-N(8)-C(9)= 180
-	H(17)-C(9)-N(8)= 128.7	N(8)-N(7)-C(1)-C(6)= 295.6

Berechnungen von Formaldehydphenylhydrazonen sind in der Literatur nur sehr selten durchgeführt worden. Salem^[83] hat AM1 Berechnungen an Formaldehydphenylhydrazonen publiziert, diese sind mit Bindungslängen und einer nicht planare Aminogruppe mit dem Ebenenwinkel $\tau = 46.9^\circ$ beschrieben.

Tabelle 3.42: Berechnete Bindungslängen Formaldehydphenylhydrazon aus^[83]

Salem ^[83] , AM1	Bindungslänge A
—	N(7)-N(8)= 1.338
	C(9)-N(8)= 1.320
	C(9)-H(16)= 1.104
	N(7)-C(1)= 1.427

Im folgenden ist die Untersuchung der n/π -Wechselwirkungen bei Verdrillung um die N-N-Bindung im Retinalphenylhydrazon gezeigt. Im Retinalphenylhydrazon ist bei der Bestimmung der stabilsten Konformation zu beachten, dass neben der unsymmetrischen Substitution an der Aminogruppe ($R_1=H$, $R_2=Phenyl$) eine zusätzliche unsymmetrische Substitution der Imingruppe ($R_1=H$, $R_2=Carotinoid$) existiert. Somit müssen die Konfigurationsisomere der E- und Z-Form unterschieden werden.



Wegen des hohen sterischen Anspruch des Carotinoidsubstituenten ist jedoch die E-Konfiguration die weitaus stabilere Form. Um die Wechselwirkungen im Retinalphenylhydrazon zu beschreiben, wurde die stabilste Konformation im Retinalphenylhydrazon durch eine semiempirische Rechnung bestimmt. Dabei wird die in Abbildung 3.15 gezeigte Zählweise verwendet, welche nicht der IUPAC-Nomenklatur von Carotinoiden entspricht. Die Struktur des Retinalphenylhydrazonmoleküls **90** wurde mit einer MM2 Kraftfeldrechnung voroptimiert (Allinger)^[69], und dann mit einer MNDO-Rechnung berechnet^[67,68].

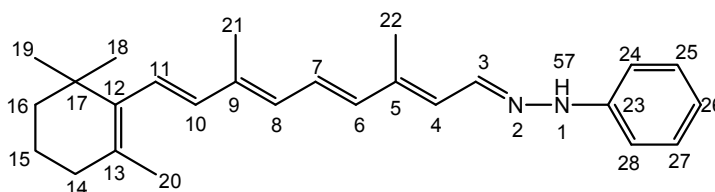


Abb. 3.15: Bezifferung für semiempirische Berechnungen

Als stabilstes Retinalphenylhydrazonkonformer wurde die um $C(3)-N(2)-N(1)-C(23) = 168.1^\circ$ verdrehte E-Form gefunden, welche in Abbildung 3.16 gezeigt ist.

Tabelle 3.43: Geometrieparameter Retinalphenylhydrazon **90** $\Theta = 168.1^\circ$ $\Delta H_f = 355.29$ kJ/mol

Bindungslänge A	Bindungswinkel φ°	Dihedralwinkel Θ°
N(1)-N(2)= 1.390	C(3)-N(2)-N(1)= 120.7	C(3)-N(2)-N(1)-C(23)= 168.1
N(2)-C(3)= 1.303	C(4)-C(3)-N(2) = 118.5	C(3)-N(2)-N(1)-H(57) = 37.7
C(3)-C(4)= 1.456	C(5)-C(4)-C(3)= 123.0	N(2)-N(1)-C(23)-C(24) = 37.2
C(4)-C(5)= 1.352	C(6)-C(5)-C(4) = 118.5	N(2)-N(1)-C(23)-C(28)= 212.2
C(5)-C(6)= 1.461	C(7)-C(6)-C(5)= 124.6	C(4)-C(3)-N(2)-N(1)= 176.2
C(6)-C(7)= 1.344	C(8)-C(7)-C(6)= 121.8	C(5)-C(4)-C(3)-N(2)= 179.8
C(7)-C(8)= 1.449	C(9)-C(8)-C(7)= 123.8	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)= 180.0
C(8)-C(9)= 1.351	C(10)-C(9)-C(8)= 118.7	C(7)-C(6)-C(5)-C(4)= 180.1
C(9)-C(10)= 1.462	C(11)-C(10)-C(9)=124.5	C(8)-C(7)-C(6)-C(5)= 181.0
C(10)-C(11)= 1.341	N(2)-N(1)-C(23)= 114.5	C(9)-C(8)-C(7)-C(6)= 180.2
C(11)-C(12)= 1.466	-	C(10)-C(9)-C(8)-C(7)= 181.0
N(1)-C(23)= 1.449	-	C(11)-C(10)-C(9)-C(8)= 182.1

Darstellung des stabilsten Retinalphenylhydrazonkonformers:

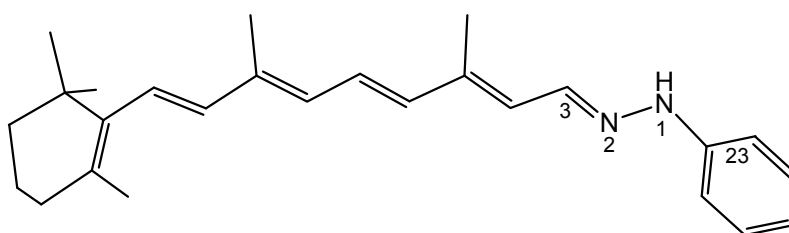


Abbildung 3.16: Torsionswinkel $\Theta = C(3)-N(2)-N(1)-C(23) = 168.1$

In dieser Konformation herrscht die größtmögliche π -Konjugation $\pi(\text{Car})/n(\text{N})/\pi(\text{Phenyl})$ über das gesamte Molekül. Die Delokalisation reicht unter Einbeziehung des nichtbindenden Elektronenpaares der Aminogruppe N(1) vom Carotinoid über die Aminogruppe in die Phenylgruppe.

Für die Konformation (Abb. 3.16) mit hoher π -Delokalisation, beschreibt die Bande bei 315 nm in Abbildung 3.17 eher einen $nN(2) \rightarrow \pi^*$ Übergang und nicht einen höher angeregten hypsochrom verschobenen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang. Dafür spricht, dass der Übergang weniger intensiv ist und bei Protonierung (siehe Kapitel 3.8) verschwindet.

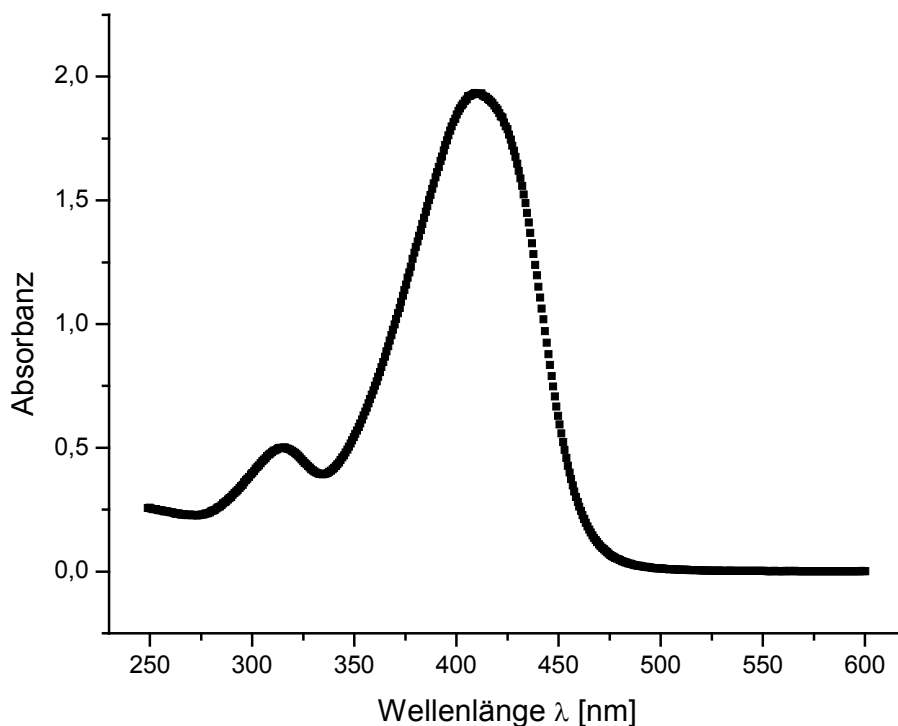
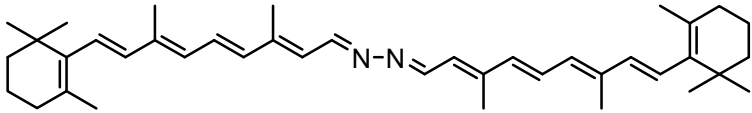
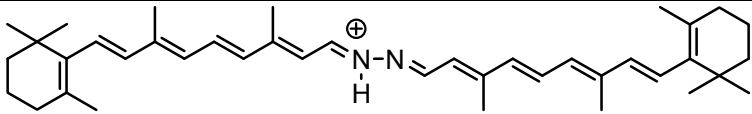
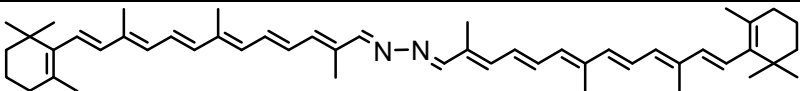
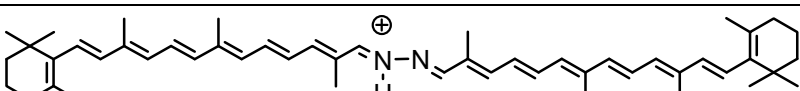
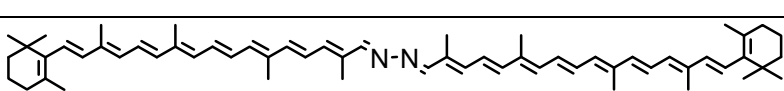
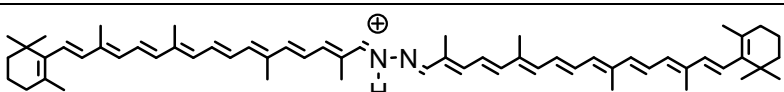


Abbildung 3.17: UV-Vis-Spektrum des Retinalphenylhydrazons **90**
($1,4 \cdot 10^{-5}$ mol/l CHCl_3)

3.8 Monoprotonierte stickstoffhaltige Carotinoidspezies

Eine weitere spektrale Besonderheit sowohl der Carotinoidazine wie auch der Carotinoidphenylhydrazone, ist ihre ausgeprägte Acidochromie. In den folgenden Tabellen sind die Absorptionsmaxima aller dargestellten Verbindungen und der monoprotonierten Formen mit ihren Absorptionsdifferenzen und Wellenzahldifferenzen aufgelistet:

Tabelle 3.44: Absorptionsmaxima der Azine und der monoprotonierten Formen in konzentrierter Salzsäure:

Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm] (Ethanol/HCl)
77		460.4
94		559.9
78		490.0
95		617.8
79		518.6
96		638 *

*= sehr schlecht löslich, daher nicht genau bestimmbar

Tabelle 3.45: Absorptionsmaxima- und Wellenzahldifferenz der Carotinoid-azine und der monoprotonierten Form

Nr.	$\lambda_{\max}$ [nm] (Ethanol)	ν [cm ⁻¹]	Differenz ν [cm ⁻¹]
77	460.4	21720	3860
94	559.9	17860	
78	490.0	20408	4222
95	617.8	16186	
79	518.6	19282	3610
96	638 *	15672	

*= sehr schlecht löslich, daher nicht genau bestimmbar

Tabelle 3.46: Absorptionsmaxima der Carotinoidphenylhydrazone und der monoprotonierten Formen

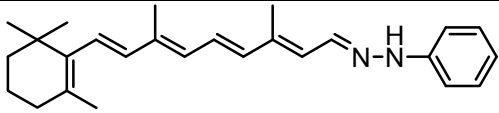
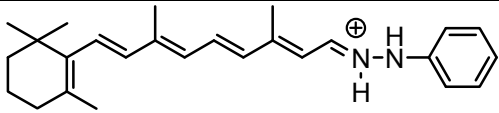
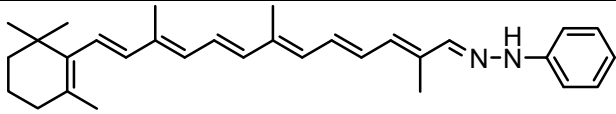
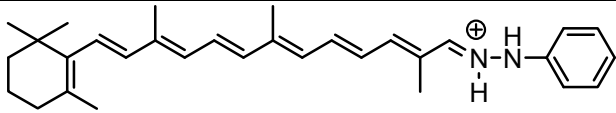
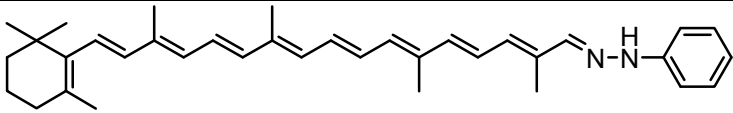
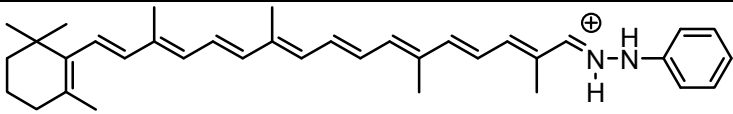
Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ (Ethanol/HCl)
90		396.8
97		458.4
91		435.6
98		506.0
92		464.4
99		516.7

Tabelle 3.47: Absorptionsmaxima- und Wellenzahldifferenz der Carotinoid-phenylhydrazone und der protonierten Form

Nr.	λ_{max} [nm] (Ethanol)	ν [cm ⁻¹]	Differenz ν [cm ⁻¹]
90	396.8	25202	3387
97	458.4	21815	
91	435.6	22957	3194
98	506.0	19763	
92	464.4	21533	2179
99	516.7	19354	

Bei Vergleich mit den Azinen zeigt sich eine deutlichere bathochrome Verschiebung der längstwelligsten Absorptionen bei Protonierung für die Azine. Die Verschiebung von Retinalazin, mit zwei Carotinoidsubstituenten, zum protonierten Derivat beträgt 3860 cm⁻¹. Die bathochrome Verschiebung für Retinalphenylhydrazon, mit nur einem Carotinoidsubstituenten, beträgt nur etwa 3390 cm⁻¹. Allgemein werden die bathochromen Verschiebungen für Carotinoidazine und Carotinoidphenylhydrazone für steigende Polykettenlängen kleiner. Dazu muss bemerkt werden, dass die Absorptionen insbesondere der C₃₀-Verbindungen extrem breite Absorptionsbanden mit geringer Intensität liefern. Dies könnte durch einen geringeren Extinktionskoeffizienten der langkettigen protonierten Spezies hervorgerufen werden, möglich ist jedoch auch, dass die langkettigen Derivate aufgrund der Schwerlöslichkeit geringere Absorbanzen hervorrufen. Daher wurde das gut lösliche Retinalazin genauer untersucht.

Die UV-Vis spektroskopischen Titrationskurven der Monoprotonierungsreaktion von Retinalazin zeigt nachfolgende Abbildung 3.18.

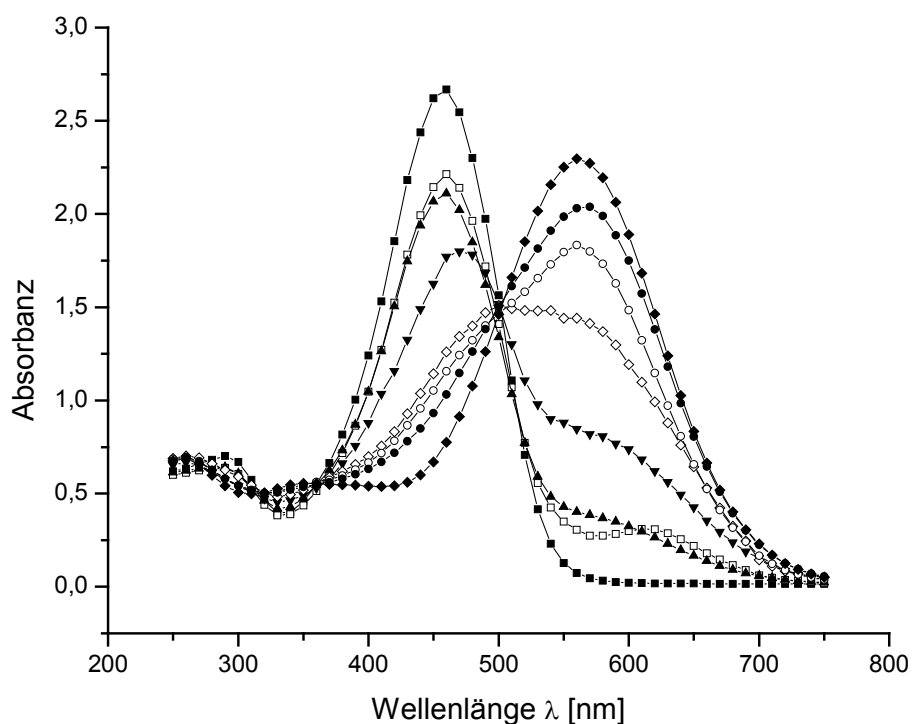


Abbildung 3.18: Titrationskurven der Monoprotonierungsreaktion von Retinalazin **77** (siehe Tabelle 3.48 für Details)

Tabelle 3.48: Säurezugaben für die Monoprotonierungsreaktion in Abb. 3.18

Symbol	Titrationsskurve
■	reines Retinalazin in Ethanol
□	95 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 5 Vol.% HCl (konz.)
▲	90 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 10 Vol.% HCl (konz.)
▼	85 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 15 Vol.% HCl (konz.)
◇	80 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 20 Vol.% HCl (konz.)
○	75 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 25 Vol.% HCl (konz.)
●	70 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 30 Vol.% HCl (konz.)
◆	65 Vol.% Retinalazin in Ethanol + 35 Vol.% HCl (konz.)

Man kann der Abbildung 3.18 entnehmen, dass mit steigender H^+ -Ionenkonzentration die Absorption bei 460 nm abnimmt und gleichzeitig die Absorption der monoprotonierten Retinalspezies bei der Wellenlänge 560 nm zunimmt. Um die Reaktion auf ihre Einheitlichkeit zu prüfen wurden Extinktionsdifferenzen für verschiedene Absorbanzen (Extinktionen) bei der Wellenlänge 450 nm gebildet. Das nachfolgend berechnete Extinktionsdifferenzendiagramm (Abbildung 3.19) deutet auf eine einheitliche Reaktion hin. Man erhält Geraden, welche die Extinktionsveränderungen beschreiben.

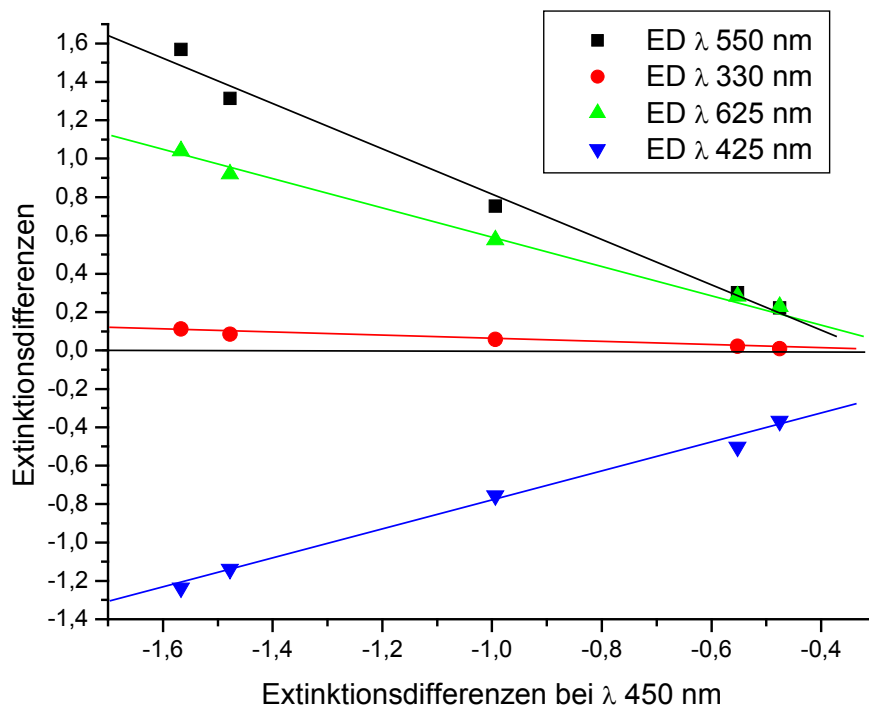
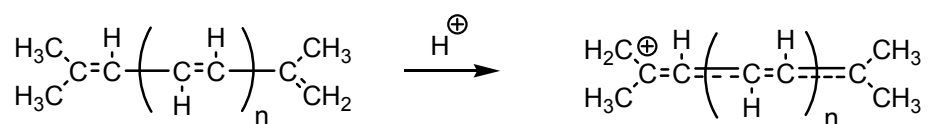


Abbildung 3.19: Extinktionsdifferenzendiagramm mit $E(\lambda_m)$ für $\lambda = 450$ nm gegen $E(\lambda_n)$ für $\lambda = 330, 425, 550$ und 625 nm

Die Abweichungen von einem ideal geraden Verlauf in den Extinktionsdifferenzendiagrammen sind durch veränderte Konzentrationsbedingungen in der Messküvette bedingt. Als Säure wurde konzentrierte Salzsäure verwendet. Durch die Zugabe von konzentrierter Salzsäure (37%) erhöht sich die Konzentration von Wasser und damit die Zusammensetzung des Lösungsmittels in der Messküvette. Dieser Verdünnungsfehler ist bei der Auswertung nicht berücksichtigt, sodass sich Abweichungen von einem linearen

Verlauf im Extinktionsdifferenzendiagramm leicht erklären lassen. Experimente zur Protonierung der Carotinoidspezies, welche in einem wässrigen Puffersystem durchgeführt wurden, um konstante Lösungsumgebung und Konzentrationen zu gewährleisten, brachten aufgrund der Schwerlöslichkeit der Carotinoidazine keinen Erfolg.

Das Phänomen der Acidochromie der stickstoffhaltigen Carotinoide kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein. Die wahrscheinlichste Erklärung für die stark bathochromen Absorptionen ist die Ausbildung von ausgedehnten delokalisierten Polyenkationen. Damit sollte es sich bei protonierten Carotinoidazinen und Carotinoidphenylhydrazonen nicht mehr um reine Polyene handeln, sondern um delokalisierte Polyenkationen. Schon Sorensen^[84] hat 1965 die Protonierung von verschiedenen Polyenen untersucht.



Bei diesen Verbindungen zeigt sich, dass diese aliphatischen Systeme nach Protonierung mit Schwefelsäure starke Acidochromie aufweisen. Es soll jedoch angemerkt werden, dass es sich bei den von Sorensen untersuchten Spezies um reine und ideal delokalisierte Polyenkationen handelt. Ein Vergleich der protonierten Spezies des Retinalazinkations (6π -Bindungen) mit dem Tridecahexaen ($n=4$, 6π -Bindungen) zeigt, dass das Tridecahexaen ein Absorptionsmaximum von 625 nm besitzt. Das Retinalazinkation besitzt dagegen nur ein Absorptionsmaximum von 560 nm. In den nachfolgenden Tabellen sind die Absorptionen der aliphatischen Polysysteme und der entsprechenden monoprotinierten Polyenkationen nach Sorensen gezeigt.

Tabelle 3.49: Polyenabsorbanzen nach Sorensen^[84]

Polyen	$\lambda_{\max}$
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \left(\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}=\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} \right)_n \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array}$	
n = 1 (2,6-Dimethyl-1,3,5-heptatrien)	282
n = 2 (2,8-Dimethylnona-1,3,5,7-tetraen)	315
n = 3 (2,10-Dimethylundeca-1,3,5,7,9-pentaen)	348
n = 4 (2,12-Dimethyltrideca-1,3,5,7,9,11-hexaen)	376
n = 5 (2,14-Dimethylpentadeca-1,3,5,7,9,11,13-heptaen)	402

Tabelle 3.50: Polyenkationabsorbanzen nach Sorensen^[84]

Polyenkation	$\lambda_{\max}$
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \left(\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}=\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} \right)_n \begin{array}{c} \oplus \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$	
für n = 1 (Heptatrien-Monokation)	396
für n = 2 (Nonatetraen-Monokation)	472
für n = 3 (Undecapentaen-Monokation)	549
für n = 4 (Tridecahexaen-Monokation)	625
für n = 5 (Pentadecaheptaen-Monokation)	702

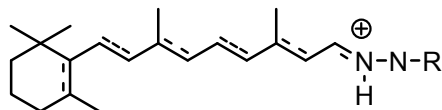
Demnach müsste das Retinalazinmonokation, mit einer Absorption von 560 nm, eine wesentlich geringere Delokalisation der Ladung über das gesamte Carotinoidmolekül besitzen, als das von Sorensen beschriebene Kohlenstoff-Polyenkation. Nachfolgende Tabelle zeigt, dass dieser Befund für alle protonierten Azine gilt.

Tabelle 3.51: Übersicht der Absorbanzen in protonierten Carotinoidazinen.

Azin	$\lambda_{\max}[\text{nm}]$	Mono-protoniertes Azin	$\lambda_{\max}[\text{nm}]$
Retinalazin 77	460.4	Retinalazin-Monokation 94	559.9
C ₂₅ -Azin 78	490.0	C ₂₅ -Azin-Monokation 95	617.8
C ₃₀ -Azin 79	518.6	C ₃₀ -Azin-Monokation 96	638*

*= sehr schlecht löslich, daher nicht genau bestimmbar

Um zu klären wie groß die Ausdehnung der Ladungsdelokalisation in protonierten Polyenazinen ist, und welche elektronischen Eigenschaften sie besitzen, wurden an diesen Systemen AM1 Rechnungen durchgeführt^[67,68].



Polyene sind durch alternierende Doppel- und Einfachbindungen charakterisiert. In polymethinartigen Strukturen, wie den protonierten Carotinoidstickstoffverbindungen kommt es jedoch zu einem mehr oder weniger vollständigen Bindungsausgleich. Das heißt, dass am Sitz der positiven Ladung die Bindungswinkel in der Polyenkette den ähnlichen Wert annehmen, und auch Bindungslängen mehr oder weniger ausgeglichen sind. Um einen ersten Hinweis auf polymethinartige Strukturen zu erhalten wurden mit Hilfe einer AM1-Berechnung die Bindungslängen im protonierten Retinalazin und Retinalphenylhydrazon bestimmt. Wie die nachfolgenden Abbildung 3.20 und 3.21 zeigen, nivellieren sich die Bindungslängen in der Nähe des protonierten Stickstoffatoms.

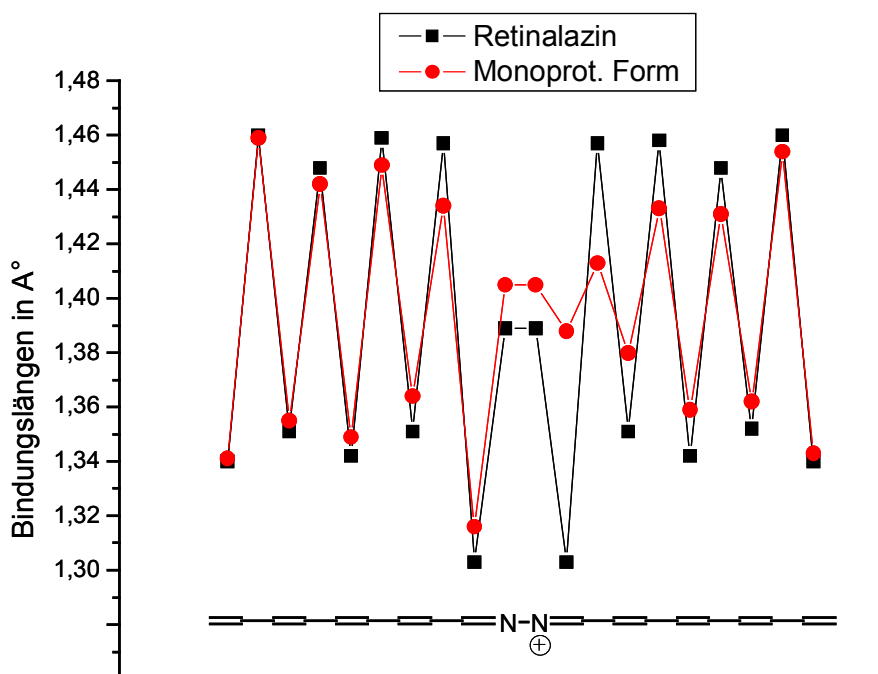


Abbildung 3.20: Bindungslängen im Retinalazin und der Monoprotonierten Form

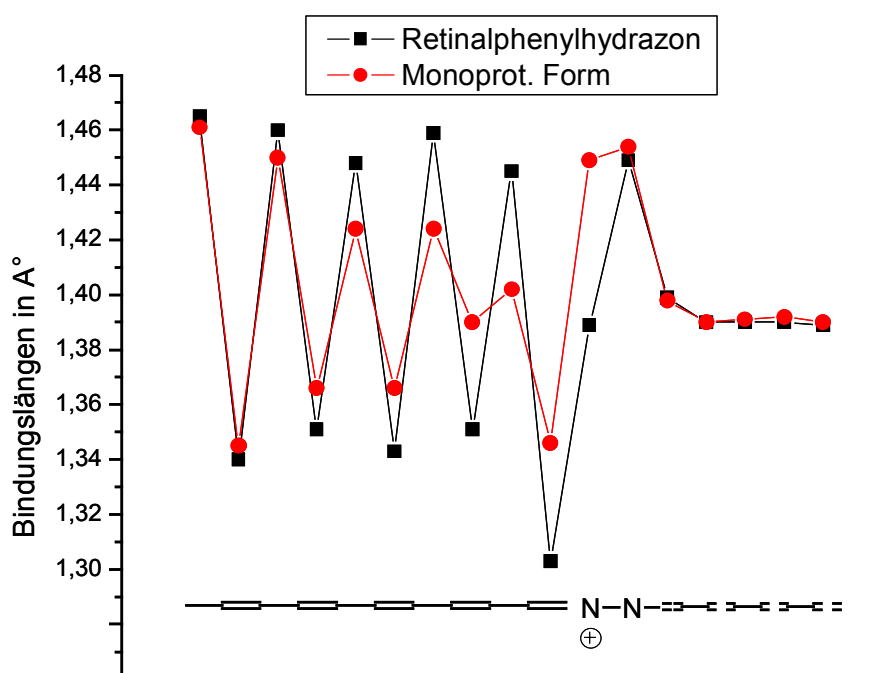


Abbildung 3.21: Bindungslängen Retinalphenylhydrazon und der Monoprotonierten Form

Die alternierenden Bindungslängen im Retinalazin, wie auch im Retinalphenylhydrazon, zeigen polyenischen Charakter. Alle Bindungslängen variieren zwischen 132 pm für eine C=C-Doppelbindung und 146 pm für eine -C-C-Einfachbindung. Nach der Protonierungsreaktion kommt es am jeweiligen Stickstoffatom zu einem Ausgleich der Bindungslängen. Es resultiert jedoch kein vollständiger Bindungslängenausgleich über das gesamte π -System. Besonders am Zentrum der eingebrachten positiven Ladung wird die Alternanz aber deutlich abgeschwächt und die Bindungslängen variieren hier um einen mittleren Bindungslängenwert von 140 pm.

Die Elektronenverteilung pro Kern im Retinalazin und Retinalphenylhydrazon im Grundzustand zeigen gleiche Verteilung der berechneten Elektronenzahl für jedes Kohlenstoffatom, was auf polyenischen Charakter hindeutet. Der Vergleich mit den berechneten Zahl der Elektronen in den protonierten Spezies (Abb. 3.22 und 3.23) zeigen deutlich alternierende Elektronenverteilung. Damit besitzen die Kohlenstoffatome in der Nähe des protonierten Stickstoffatoms eher polymethinischen Charakter.

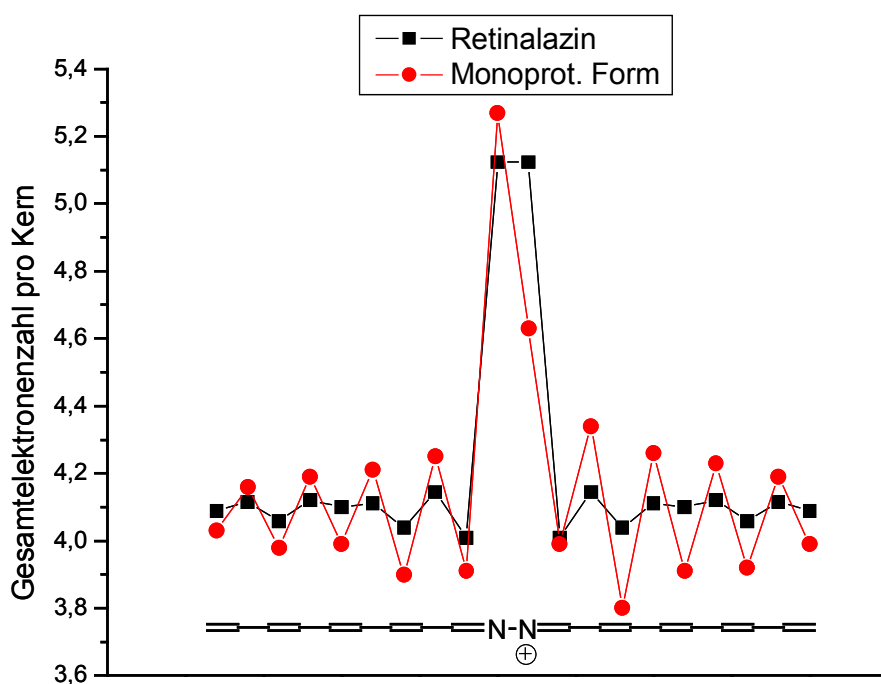


Abbildung 3.22: Elektronenverteilung im Retinalazin und der Monoprotinierten Form

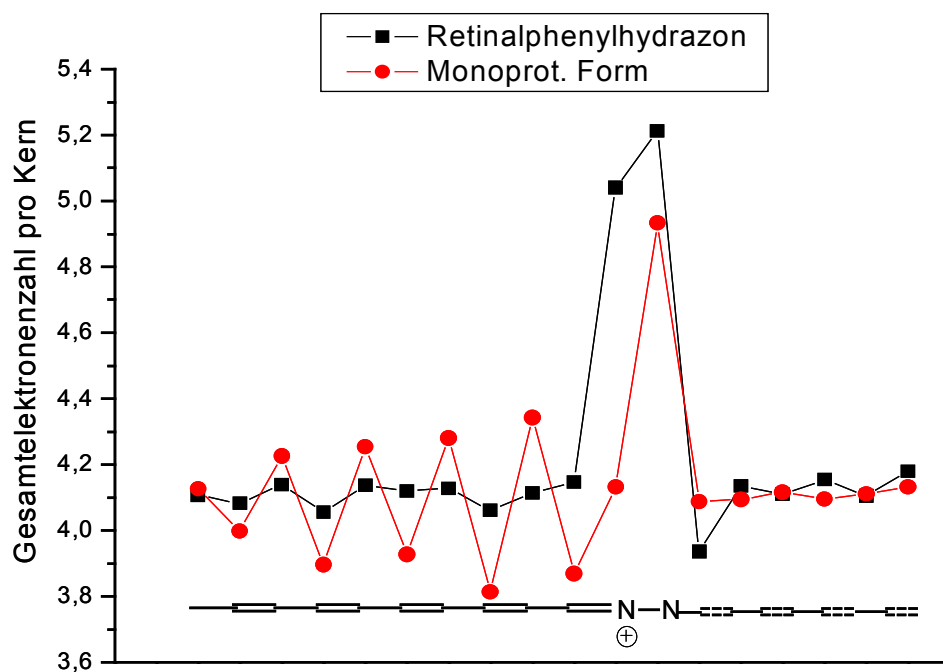


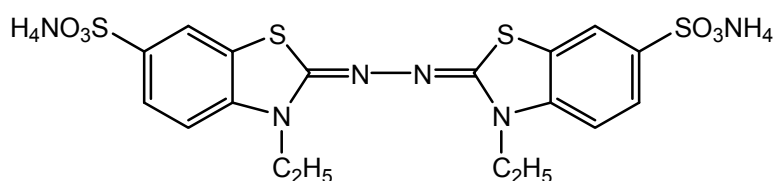
Abbildung 3.23: Elektronenverteilung im Retinalphenylhydrazon und der monoprotinierten Form

Der Vergleich der durch Protonierung hervorgerufen Bathochromie in Carotinoidazinen und Carotinoidphenylhydrazonen zeigt, dass die Bathochromie von Retinalazin etwa 3860 cm^{-1} beträgt. Bei Retinalphenylhydrazon beträgt die Bathochromie etwa 3390 cm^{-1} . Die Differenz von 470 Wellenzahlen ist mit $\sim 0.06\text{ eV}$ (oder $\sim 5.6\text{ kJ/mol}$) recht klein. Sie ist ein Indiz für die Ähnlichkeit der Bathochromie in beiden Systemen. Damit sollten sich in azinischen und phenylhydrazonischen protonierten Spezies, energetisch und strukturell sehr ähnliche Iminiumkationen ausbilden. Abschließend sei angemerkt, dass beim oxidativen Abbau von Carotinoiden häufig sehr instabile Carotinoidpolyenkationen beobachtet wurden^[85]. Diese werden als wichtige Intermediate von radikalischen Carotinoidabbaureaktionen angesehen^[86]. Die sehr kurze Lebensdauer von reinen Kohlenstoff-Carotinoidpolyenkationen erschwert deren Beobachtung und die mechanistischen Interpretationen. Stickstoffhaltige Carotinoidazine und deren monoprotionierte Formen besitzen eine sehr viel höhere Lebensdauer und können wichtige Beiträge für die Untersuchung von Carotinoidpolyenkationen und Abbaureaktionen liefern.

4.0 Antioxidative Messverfahren

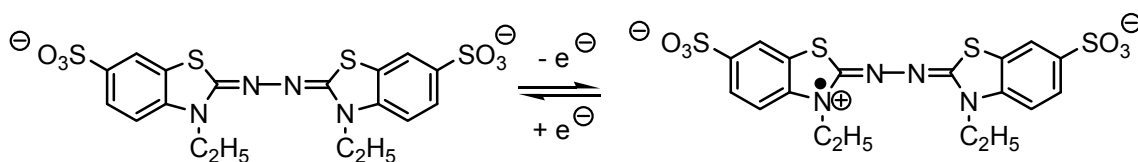
4.1 ABTS-Assay

Um die antioxidative Wirksamkeit von Carotinoiden zu erfassen, stehen mehrere verschiedenartige Meßverfahren zur Verfügung. Beim ABTS-Assay handelt es sich um ein Testverfahren, welches ein Maß für einen Elektronenübergang der Carotinoide auf ein Redoxfarbstoffradikalkation darstellt. Als Redoxfarbstoff wird das Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-disulfonsäure **100** (ABTS) eingesetzt.



100

Das schon 1969 von Hünig^[87] dargestellte 2,2'-Benzothiazolinderivat **100** kann bei seiner Oxidation ein reversibles Redoxsystem ausbilden. Dabei können aus **100** zwei Verbindungen in höheren Oxidationsstufen entstehen. Der nichtradikalische Farbstoff **100** soll mit „Red“, für die reduzierte Stufe abgekürzt werden. „Sem“ bedeutet die Semioxydierte Stufe **101** und „Ox“ steht für die zweifach oxydierte Stufe **102**. Diese Terminologie geschieht in Anlehnung an das Oxidationsverhalten von Phenylendiaminen und Hydrochinonen^[88].

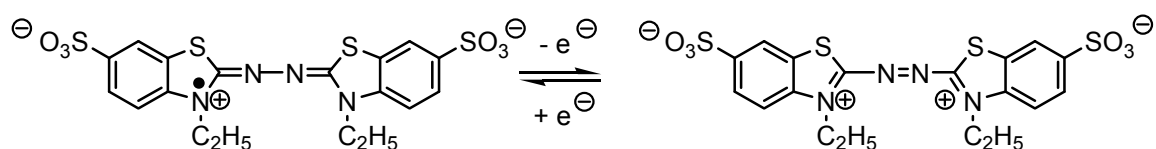


100 Red

101 Sem

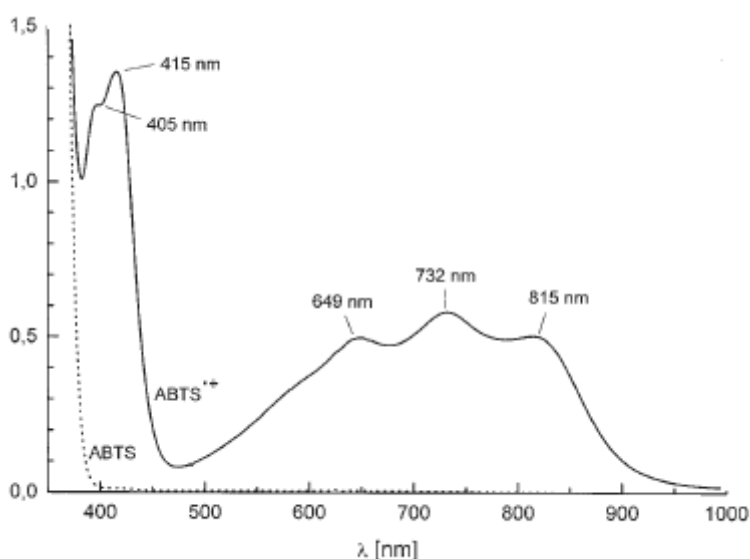
$$E_{01} (\text{Red/Sem}) = 460 \text{ mV in Wasser gegen Hg/Hg}_2\text{Cl}_2^{[87]}$$

Entfernt man ein weiteres Elektron stehen folgende Oxidationsstufen im Gleichgewicht:

**101 Sem****102 Ox**

$$E_{02}(\text{Sem/Ox}) = 840 \text{ mV in Wasser gegen Hg/Hg}_2\text{Cl}_2^{[87]}$$

Der Vorteil dieses Systems liegt in der einfachen photometrischen Endpunktsbestimmung einer Redoxreaktion, da alle Oxidationsstufen verschiedene Absorptionsmaxima besitzen. So absorbiert das leicht gelblich gefärbte ABTS **100** Red bei einer Wellenlänge von 345 nm, die semioxydierte Form **101** besitzt mehrere Absorptionsmaxima. Die grün-blaue Farbe des semioxydierten Radikalkations **101** Sem setzt sich aus den Absorptionsbanden bei 415 nm, 649 nm, 732 nm und 815 nm zusammen.

Abbildung 4.1^[89]: UV-Vis-Spektrum des ABTS^{•+}

Das Absorptionsmaximum der gelb-orangen dibetainischen Struktur **102** Ox liegt bei 487 nm^[87].

Um die antioxidative Fähigkeit einer Substanz zu testen wurde der ABTS-Assay ursprünglich mit Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid durchgeführt^[90]. Dabei wurde die zu untersuchende Substanz in den Assay gegeben, bevor die ABTS-Radikalkationen durch H₂O₂ und Metmyoglobin erzeugt worden waren. Diese sehr einfache Versuchsdurchführung besaß aber, durch das gleichzeitige

Vorhandensein von Metmyoglobin, Wasserstoffperoxid, ABTS und der antioxidativen Substanz, den Nachteil von zahlreichen Nebenreaktionen.

Als wichtigste Nebenreaktion ist die direkte Oxidation der antioxidativen Substanz durch Wasserstoffperoxid zu nennen. Damit ergibt sich im Assay eine geringere Stoffmenge an messbarer antioxidativer Substanz. Gleichzeitig kann das System H_2O_2 /Metmyoglobin, durch die abbauende Nebenreaktion von Wasserstoffperoxid, nur eine geringere Menge an ABTS-Radikalkationen erzeugen. Infolgedessen besaßen frühe antioxidative Kapazitätsmessungen (und die entsprechenden TEAC-Werte) starke Messunsicherheiten^[91].

Daher wird der ABTS-Assay in dieser Arbeit nach der "post-addition-protocol" Methode durchgeführt. Diese Verbesserung des ABTS-Assays geht auf Rice-Evans und Miller^[92] zurück. Die ABTS-Radikalkationen werden in einer Oxidation „außerhalb" des eigentlichen Assays erzeugt, und erst in einem folgenden Reaktionsschritt mit dem Antioxdans versetzt. So wird die direkte Reaktion der antioxidativen Substanz mit dem Oxidationsmittel ausgeschlossen. Eine Fehlbestimmung der antioxidativen Kapazität wird weitgehend vermieden. Als Oxidationsmittel wurden im ABTS-Assay zahlreiche biochemische^[93], organische^[94] und anorganische^[95] Oxidationsmittel verwendet. Erneut war es Rice-Evans^[96], die eine Assayvariante publizierte, in der Natriumperoxodisulfat als das zweckmäßigste Oxidationsmittel beschrieben wurde. Die einfache Durchführung der Oxidationsreaktion und der Verzicht auf eine aufwendige Aufarbeitung des Reaktionsansatzes favorisiert den Einsatz von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ gegenüber anderen Oxidationsmitteln, wie zum Beispiel Mangandioxid^[97] oder Azoverbindungen^[98].

Eine hohe Ausbeute an ABTS-Farbstoff-Radikalkationen wird über das hohe Oxidationspotential des Peroxodisulfats ($E_0 = 2.07 \text{ V}$ bei $\text{pH}=7$ ^[99]) sichergestellt, welches im stöchiometrische Reaktionsverhältnis von 2 mol ABTS zu 1 mol Peroxodisulfat eingesetzt werden muss.

So hergestellte $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösungen besitzen, dunkel und kühl aufbewahrt, eine Haltbarkeit von mehreren Wochen. Die außerordentliche Stabilität der $\text{ABTS}^{\bullet+}$ entstammt aus der ausgedehnten Radikaldelokalisierung über das gesamte π -Elektronensystem der gekoppelten Benzthiazolinsysteme. Durch die hohe Delokalisation des radikalischen Zentrums im Molekül besitzt das $\text{ABTS}^{\bullet+}$ eine äußerst geringe Tendenz zur Dimerisierung.

Die so dargestellte ABTS-Radikalkationen-Lösung wird soweit verdünnt, dass eine UV-Vis-Absorbanz von 0.7 ± 0.1 (Messwellenlänge 734 nm) resultiert. Über den Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{734} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [100] lässt sich die Ausgangskonzentration an ABTS^{++} , vor Zugabe einer antioxidativen Substanz, bestimmen. Um das System zu eichen, wird als Referenzsubstanz das Vitamin E-Derivat Trolox **62** verwendet.

Die eigenen Ergebnisse des ABTS-Assays nach Trolozzugabe zeigt die nachfolgende Abbildung, in der die resultierenden photometrisch bestimmten ABTS^{++} -Absorbanzabnahmen gezeigt sind:

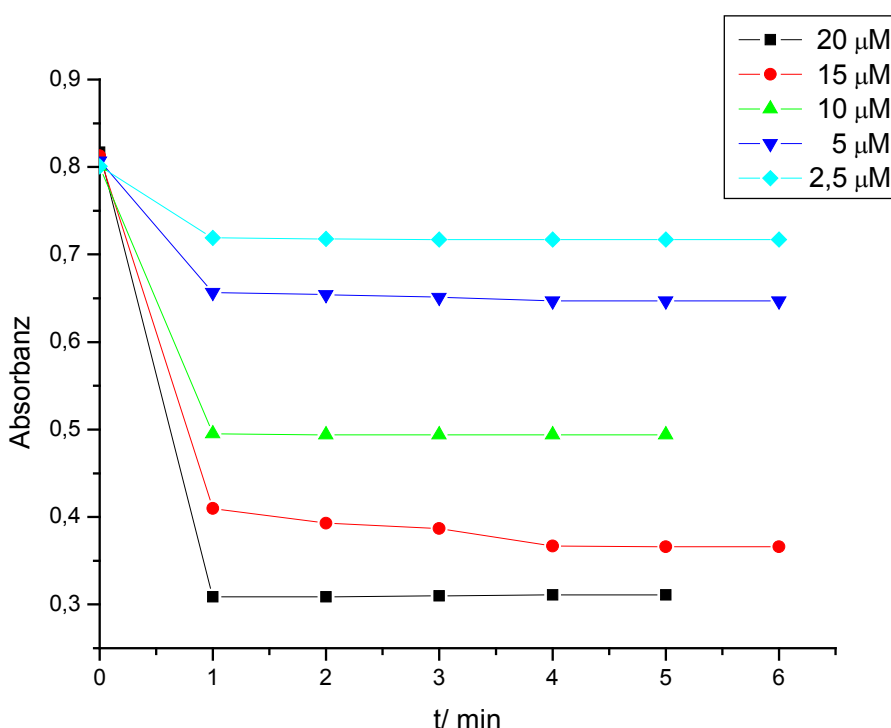


Abbildung 4.2: ABTS^{++} -Absorbanzabnahmen nach Trolozzugabe

Im Experiment zu Abbildung 4.2 gibt man die Troloxmengen so zu einer 1 ml ABTS-Stammlösung, dass in der Messküvette Troloxmengen von 20 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM und 2.5 µM resultieren. Man erkennt, dass die Absorbanz des ABTS -Radikalkations nach einer Minute Reaktionszeit einen konstanten Endwert erreicht. Aus dem Experiment erhält man so die Werte der maximalen Absorbanzverringern der ABTS -Radikalkationen für verschiedene Reaktionszeitpunkte.

In früheren Interpretationen^[101] des ABTS-Assays erhielt man aus der Auftragung, Werte der Absorbanzabnahmen nach einer Minute Reaktionszeit gegen die eingesetzten Troloxkonzentrationen, eine Gerade. Die Steigung dieser Geraden war Grundlage der Berechnung des TEAC-Wertes (**T**rolox **E**quivalent **A**ntioxidant **C**apacity), welcher wie folgt definiert ist^[54]:

$$\text{TEAC} = \frac{\text{Steigung der Geraden des Antioxidans}}{\text{Steigung der Troloxgeraden}}$$

Ein Vergleich der in der Literatur publizierten TEAC-Werte zeigt jedoch starke Streuungen. Um eine einheitliche Berechnungsgrundlage für eine antioxidative Bestimmung zu schaffen, wird die TEAC-Auswertung durch ein modifiziertes Verfahren nach Rice-Evans und Re^[96] ersetzt.

Die Messkurven der Antioxidanzugabe im ABTS-Assay der Literatur^[96] zeigen das gleiche Verhalten, wie die eigenen Messkurven (siehe z.B. Abbildung 4.3).

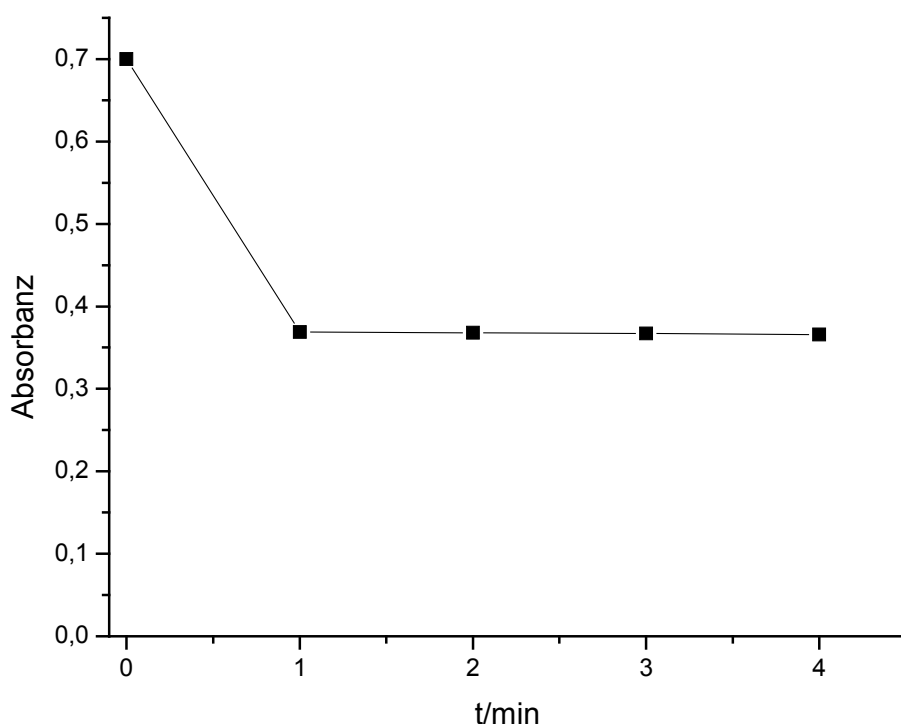


Abbildung 4.3: ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen nach 10 µM Troloxzugabe aus ^[96]

Für das modifizierte Auswertverfahren wird der RAA-Wert (**R**elative **A**ntioxidant **A**ctivity) eingeführt. Hierbei trägt man die Werte der prozentualen Absorbanzabnahmen für verschiedene Reaktionszeiten gegen die eingesetzten

Troloxkonzentrationen auf. Diese Messwerte beschreiben eine lineare Abhängigkeit, von welcher die Steigung bestimmt wird. Die nachfolgende Abbildung 4.4 zeigt den Graphen der Absorbanzabnahmen aus der Literatur, für die Troloxzugaben von 0 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM nach einer Reaktionszeit von 1 Minute.

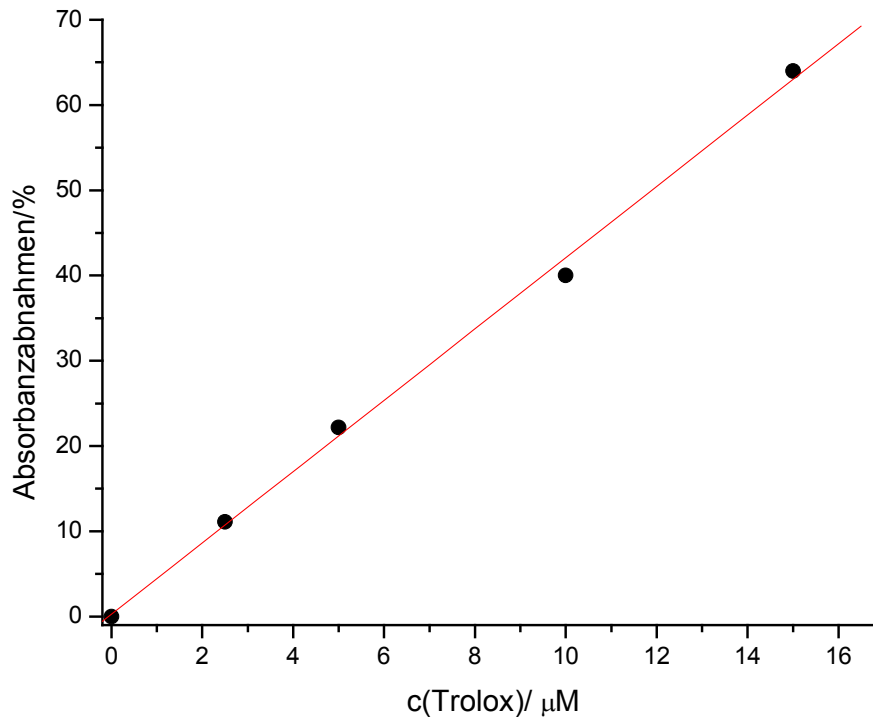


Abbildung 4.4: ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen nach 0 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM Troloxzugabe und 1 min Reaktionszeit aus^[96]

Bei Rice-Evans und Re^[96] findet man keine genauen Angaben, wie die Steigungswerte ermittelt wurden. So können verschiedene Methoden der Steigungsbestimmung verwendet worden sein. Es kann zum Beispiel ein Startwertepaar (0/0) berücksichtigt sein, da keine Zugabe von einem Antioxidans auch keine Änderung der Absorbanz hervorruft. Ferner können zur Auswertung die Regressionsgeraden durch den Ursprung oder nicht durch den Ursprung geführt werden. Um zu klären, welche Auswirkung die Variation der obigen Parameter auf die Steigungsbestimmung hat, wurden die folgenden Berechnungen anhand der Literaturdaten mit den Troloxkonzentrationen 0 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM durchgeführt.

Tabelle 4.1.: Vergleich des Fehlers für verschiedene Auswertmethoden in ^[96]

Art der Regression	Regressionskoeffizient r^2	Steigung [%(A_0-A/A_0) l mol ⁻¹]
Mit Startwertpaar (0/0) Ursprungsregression	0.9987	4.207 ± 0.069
Ohne Startwertpaar (0/0) Keine Ursprungsregression	0.9980	4.207 ± 0.080
Mit Startwertpaar (0/0) Keine Ursprungsregression	0.9987	4.181 ± 0.123
Ohne Startwertpaar (0/0) Keine Ursprungsregression	0.9980	4.157 ± 0.187

Wie die Tabelle 4.1 zeigt, ist die Variation der Steigungswerte recht gering. Den geringsten Fehler macht man, wenn zusätzlich das Startwertepaar (0/0) einbezogen wird (n+1) und wenn die Regressionsgerade mit $\sigma \pm 0$ durch den Ursprung führt. Daher soll dieses Verfahren auch primär bei der Auswertung der eigenen Ergebnisse Verwendung finden.

Für die Ermittlung des RAA(AUC)-Wertes wird in einer weiteren Auftragsung, in der die jeweiligen Beträge der erhaltenen Steigungen gegen die Reaktionszeit aufgetragen werden, die Fläche unter dieser Steigungs-Reaktionszeit-Auftragsung berechnet. Es werden zwei Flächen berechnet, einmal für eine Reaktionszeit nach 1 Minute und für eine Reaktionszeit nach 4 Minuten. In gleicher Weise werden auch andere Substanzen im ABTS-Assay ausgewertet. Der RAA(AUC)-Wert drückt nun das Verhältnis der jeweiligen Flächeninhalte AUC (**A**rea **U**nder **C**urve) eines Antioxidans, gegen den Flächeninhalt AUC (**A**rea **U**nder **C**urve) von Trolox aus.

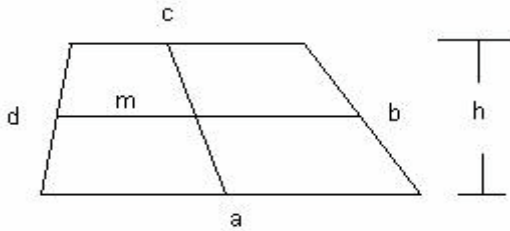
$$\text{RAA (AUC)} = \frac{\text{Fläche AUC für das Antioxidans}}{\text{Fläche AUC für Trolox}}$$

AUC Carotinoid = Fläche AUC der Auftragung Steigungen [Absorbanzabnahme in % gegen die zugegebene Carotinoid-Konzentration] gegen verschiedene Reaktionszeiten

AUC Trolox = Fläche AUC der Auftragung Steigungen [Absorbanzabnahme in % gegen zugegebene Trolox-Konzentration] gegen verschiedene Reaktionszeiten

Zur Veranschaulichung ist die Berechnung der Flächeninhalte AUC im folgenden gezeigt. Die Flächen-Berechnung wird nach der Trapezoid-Methode durchgeführt.

Dabei berechnet sich der Flächeninhalt eines Trapezes sich wie folgt:



Die Seiten a und c sind parallele Grundseiten des Trapezes. Ihr Abstand wird durch die Höhe h beschrieben. Der Flächeninhalt des Trapez ergibt sich nun aus der Höhe h multipliziert mit der Länge der parallel zu a und c liegenden Achse m .

$$\text{Fläche} = m \cdot h \quad \text{mit: } m = (a + c)/2$$

Für die Flächenberechnung der Troloxzugabe nach 1 und 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

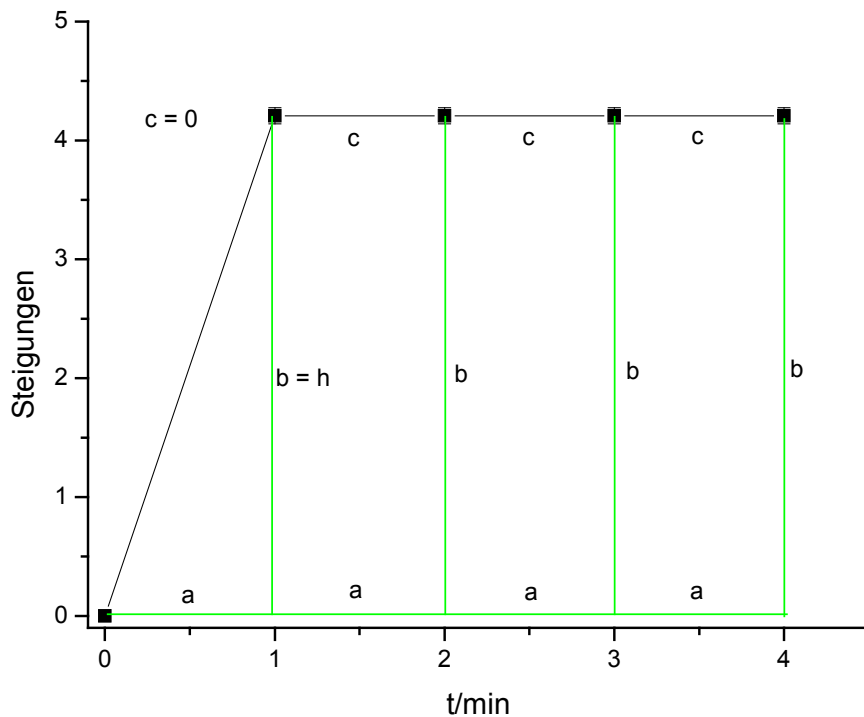


Abbildung 4.5: Auftragung der Steigungswerte der Graphen Absorbanzabnahmen in % gegen Konzentration" gegen die Reaktionszeit von 1-4 Minuten^[96]

Tabelle 4.2: Bestimmung des Flächenwertes in Abbildung 4.5 aus ^[96] nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt eine AUC-Fläche für Trolox von 2.10. Die Fläche ausgedrückt als $[(\% \text{ Absorbanzabnahme}) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \cdot \text{min}^{-1}$.

Reaktionszeit [min]	Steigung $[\%(A_0-A/A_0) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \pm \sigma$	Fläche $[\%(A_0-A/A_0) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \text{ min}^{-1}$
0	0	4.207 / 2 = 2.10
1	4.207 $\pm$ 0.069	

Tabelle 4.3: Bestimmung des Flächenwertes in Abbildung 4.5 aus ^[96] nach 4 Minuten Reaktionszeit ergibt eine AUC-Fläche für Trolox von 14.72. Auch hier wird die Fläche ausgedrückt als $[(\% \text{ Absorbanzabnahme}) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \cdot \text{min}^{-1}$.

Reaktionszeit [min]	Steigung $[\%(A_0-A/A_0) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \pm \sigma$	Fläche $[\%(A_0-A/A_0) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \text{ min}^{-1}$
0	0	2.10 + (3 • 4.207) = 14.72
1	4.207 $\pm$ 0.069	
2	4.207 $\pm$ 0.069	
3	4.207 $\pm$ 0.069	
4	4.207 $\pm$ 0.069	

Trolox besitzt damit einen aus den Literaturdaten berechneten Flächenwert von 14.72 nach einer Reaktionszeit 4 Minuten. Dazu soll bemerkt werden, dass in der Literatur nur ein Steigungswert 4,2/ $\text{l } \mu\text{mol}^{-1}$ nach 1 min abgebildet ist. Da zwischen 1 und 4 min die Steigung aber weitgehend konstant bleibt (siehe Fig. 5 in ^[96]), wird für die Flächenbestimmung über den Reaktionszeitraum von 1 - 4 Minuten dieser eine Steigungswert dreimal angesetzt, siehe Tab. 4.3. Diese Annahme ist sicher mit einem Fehler behaftet. Es wird vorausgesetzt, dass für alle Konzentrationszugaben die entsprechenden Absorbanzabnahmekurven gleichermaßen konstant bleiben, und die gleiche Steigung ergeben (siehe Abbildung 4.3.).

Der Flächeninhalt drückt das Ausmaß der ABTS^{•+}-Absorbanzabnahme für bestimmte Zugabemengen an Trolox aus. Trolox erhält als Referenzsubstanz vereinbarungsgemäß einen RAA(AUC)-Wert von eins. Antioxidantien, welche einen größeren RAA(AUC)-Wert als eins besitzen, reduzieren im gewählten

Reaktionszeitintervall eine größere Menge an ABTS-Radikalkationen. Damit reagieren diese Antioxidantien effektiver oder schneller mit $\text{ABTS}^{\bullet+}$ als Trolox. Entsprechend reduzieren Antioxidantien, welche einen RAA(AUC)-Wert kleiner eins besitzen, eine geringere Menge an ABTS-Radikalkationen.

Tabelle 4.4.: Bedeutung des RAA(AUC)-Wertes

RAA(AUC)-Wert < 1	RAA(AUC)-Wert = 1	RAA(AUC)-Wert > 1
Geringere Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$	Trolox (Referenz)	Höhere Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Im folgenden Kapitel 4.2 sind die Messergebnisse und RAA(AUC)-Auswertungen für Trolox und die eingesetzten Carotinoide gezeigt. Für die beiden Carotinoide Canthaxanthin und Astaxanthin zeigt sich, dass die Graphen der Messwerte andere $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Absorbanzabnahmen zeigen. Daher schließt sich in Kapitel 4.4 eine Diskussion der Messergebnisse und die Erklärung von „abweichenden“ Kurvenverläufen für Canthaxanthin und Astaxanthin an.

4.2 Messergebnisse des ABTS-Assays

4.2.1 Trolox

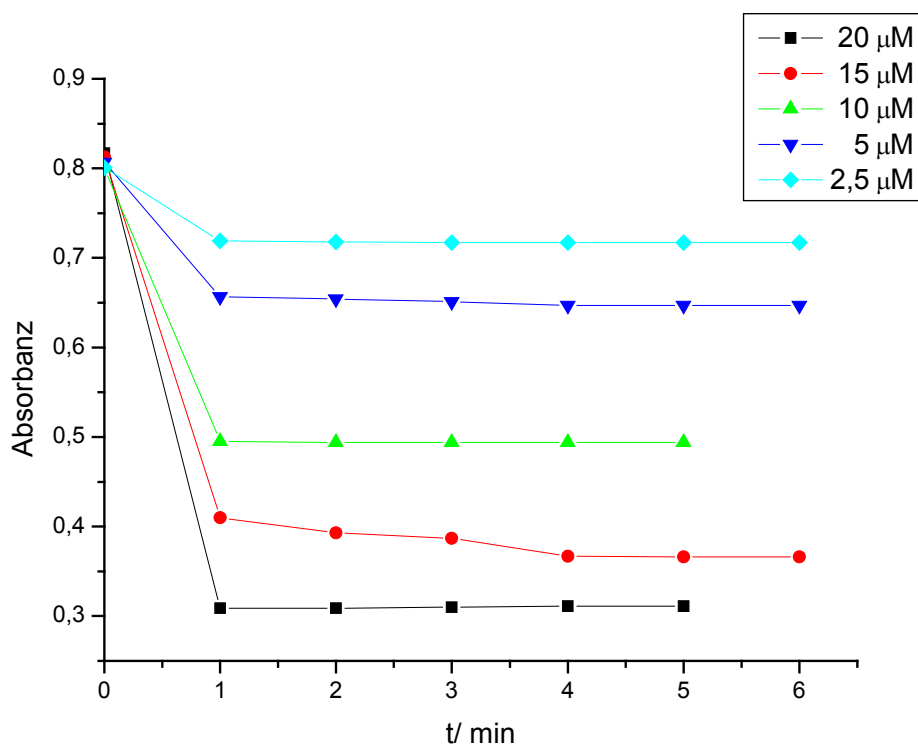


Abbildung 4.6: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Troloxkonzentrationen 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM

Tabelle 4.5: Gemessene ABTS^{•+}-Absorbanzen für die angegebenen Troloxkonzentrationen

Absorbanzen					
c (Trolox)	20 µM	15 µM	10 µM	5 µM	2.5 µM
t (min)					
0	0,817	0,813	0,801	0,807	0,801
1	0,309	0,410	0,495	0,657	0,719
2	0,309	0,393	0,494	0,654	0,718
3	0,310	0,387	0,494	0,651	0,717
4	0,311	0,367	0,494	0,647	0,717

Die gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen aus Tabelle 4.5 werden in prozentuale Absorbanzabnahmen (A%) umgerechnet.

Tabelle 4.6: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen (%):

% ($A_0 - A/A_0$)					
c (Trolox)	20 μ M	15 μ M	10 μ M	5 μ M	2.5 μ M
t (min)					
1	62.2	49.6	38.2	18.6	10.2
2	62.2	51.7	38.3	19.0	10.4
3	62.1	52.4	38.3	19.3	10.5
4	62.0	55.0	38.3	19.8	10.5

Werden die jeweiligen Troloxzugaben gegen die prozentuale Absorbanzabnahmen (%) aufgetragen erhält man folgenden Graphen in Abbildung 4.7.

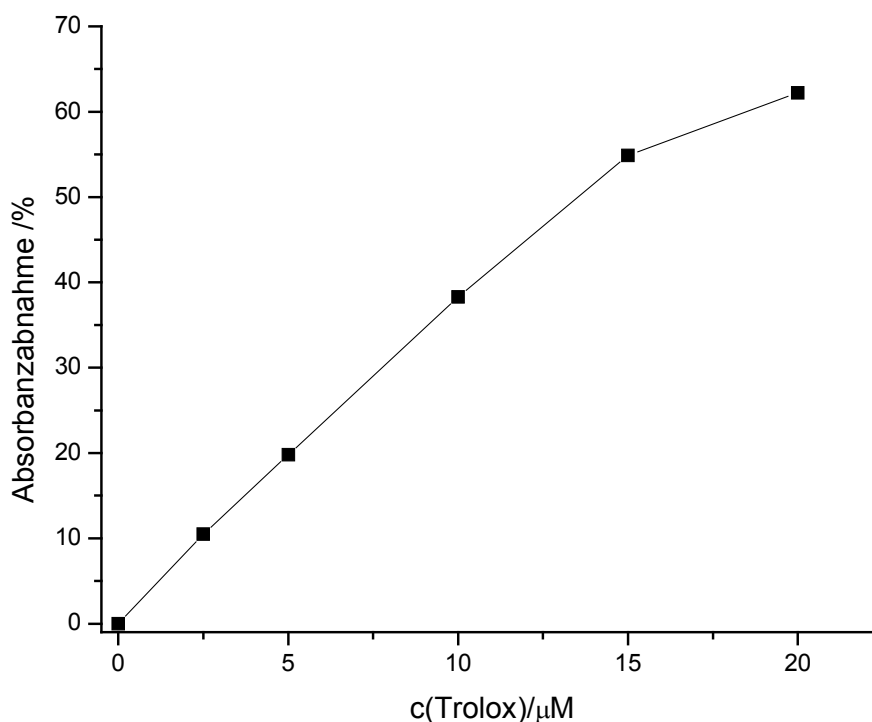


Abbildung 4.7: Auftragung der Troloxkonzentrationen 0 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M und 20 μ M gegen prozentuale Absorbanzabnahmen nach 4 min Reaktionszeit

Der Abbildung 4.7 kann man entnehmen, dass Troloxzugaben größer 15 μM von einem linearen Konzentrationsverhalten abweichen. Daher werden, wie in der Literatur, in die Auswertung des ABTS-Assays nur die Troloxzugaben von 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM einbezogen.

Da Trolox als Referenzsubstanz im Assay dient, wird der Fehler für die ausgelassenen hohen Troloxzugaben bestimmt.

Tabelle 4.7: Verschiedene Auswertungen mit und ohne 20 μM Troloxzugabe

Konzentrationen (mit Startwertepaar (0/0) und Regression durch den Ursprung)	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	r^2
2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM	3.738 ± 0.058	0.9993
2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM	3.406 ± 0.145	0.9905

Wie die Tabelle 4.7 zeigt, beträgt die Abweichung in den Steigungswerten mit 3.7 zu 3.4 etwa 10 %. Ohne die Konzentration von 20 μM hat die Regression eine höhere Güte und besitzt den geringeren Fehler. Das Auslassen der 20 μM Konzentration zeigt damit deutlichen Einfluß auf die Auswertung des ABTS-Assays. Ein geringerer Fehler von maximal 5 % ergibt sich, wie Tabelle 4.8 zeigt, durch die Art der Steigungsberechnung mit (Nicht-)/Berücksichtigung eines Startwertepaares (0/0) und einer Regression (nicht)/ durch den Ursprung.

Tabelle 4.8.: Fehleranalyse in der Steigungs- und Flächenbestimmung

Steigungsbestimmung für die Konzentrationen 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	r^2	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
mit Startwertepaar (0/0) und Regression durch Ursprung	3.738 ± 0.058	0.9993	12.58
mit Startwertepaar (0/0) und Regression nicht durch Ursprung	3.648 ± 0.080	0.9993	12.16
ohne Startwertepaar (0/0) und Regression durch Ursprung	3.738 ± 0.067	0.9996	12.34
ohne Startwertepaar (0/0) und Regression nicht durch Ursprung	3.561 ± 0.069	0.9996	11.75

Daher wird, wie schon bei der Auswertung der Literaturdaten gefunden, am besten ein Startwertpaar (0/0) verwendet und die Regressionsgerade durch den Ursprung geführt.

Mit diesen Bedingungen wird die Fläche in der Auftragung Reaktionszeit gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit im Troloxexperiment ergibt sich:

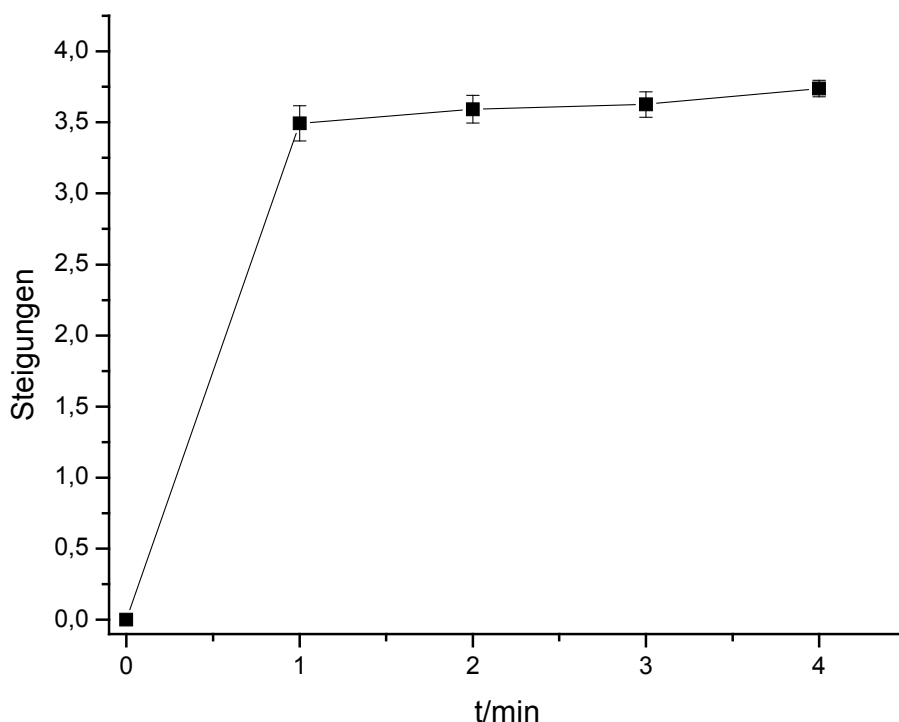


Abbildung 4.8: Steigungen gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Troloxexperiment

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.9: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	1.75
1	3.493 ± 0.124	

Fläche unter der Kurve der Abbildung 4.8:

Fläche = 1.75 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min⁻¹

RAA(AUC)-Wert _[1min]: **1.00** (Referenz)

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.10.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [% (A ₀ -A/A ₀) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [% (A ₀ -A/A ₀) l μmol^{-1}] min ⁻¹
0	0	12.58
1	3.493 $\pm$ 0.124	
2	3.592 $\pm$ 0.097	
3	3.626 $\pm$ 0.090	
4	3.738 $\pm$ 0.058	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.8:

Fläche = 12.58 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min⁻¹

RAA(AUC)-Wert _[4min]: **1.00** (Referenz)

4.2.2 Lycopin

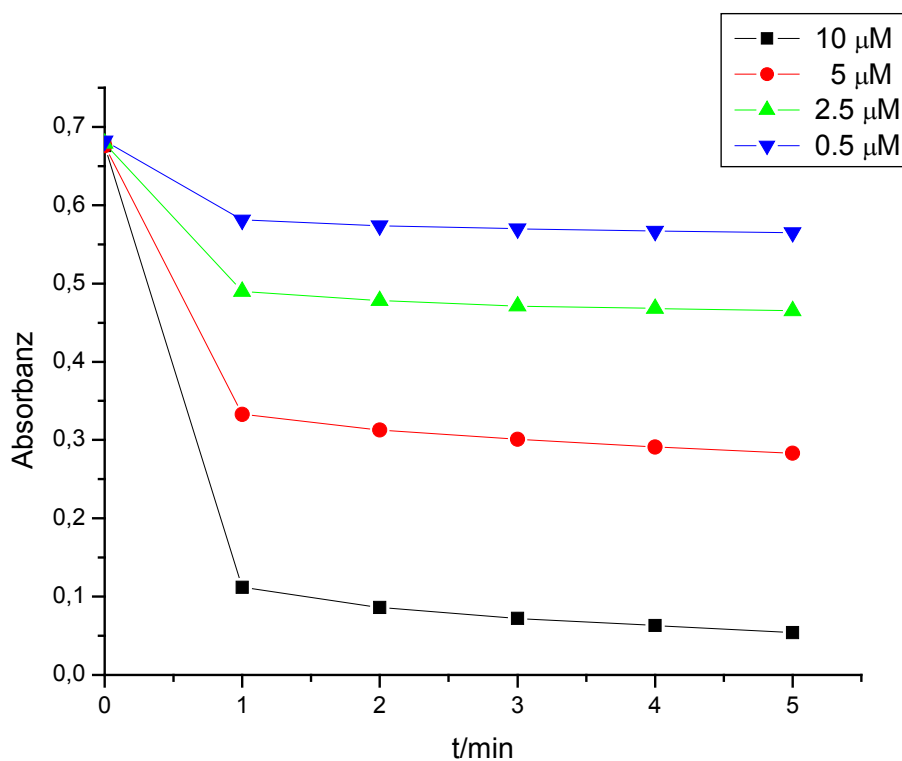


Abbildung 4.9: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Lycopinkonzentrationen 0.5 µM, 2.5 µM, 5 µM und 10 µM

Tabelle 4.11: Gemessene ABTS^{•+}Absorbanzen für die zugegebenen Lycopinkonzentrationen

Absorbanzen				
c (Lycopin)	10 µM	5 µM	2.5 µM	0.5 µM
t (min)				
0	0,676	0,676	0,679	0,682
1	0,112	0,333	0,49	0,581
2	0,086	0,313	0,478	0,574
3	0,072	0,301	0,471	0,57
4	0,063	0,291	0,468	0,567

Die gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen aus Tabelle 4.11 werden in prozentuale Absorbanzabnahmen (A%) umgerechnet.

Tabelle 4.12: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}Absorbanzabnahmen (%):

% ($A_0 - A/A_0$)				
c (Lycopin)	10 μ M	5 μ M	2.5 μ M	0.5 μ M
t (min)				
1	83.4	50.7	27.8	14.8
2	87.3	53.7	29.6	15.8
3	89.4	55.5	30.6	16.4
4	90.7	57.0	31.1	16.9

Werden die jeweiligen Lycopinzugaben gegen die prozentuale Absorbanzabnahmen (%) aufgetragen erhält man folgenden Graphen in Abbildung 4.10.

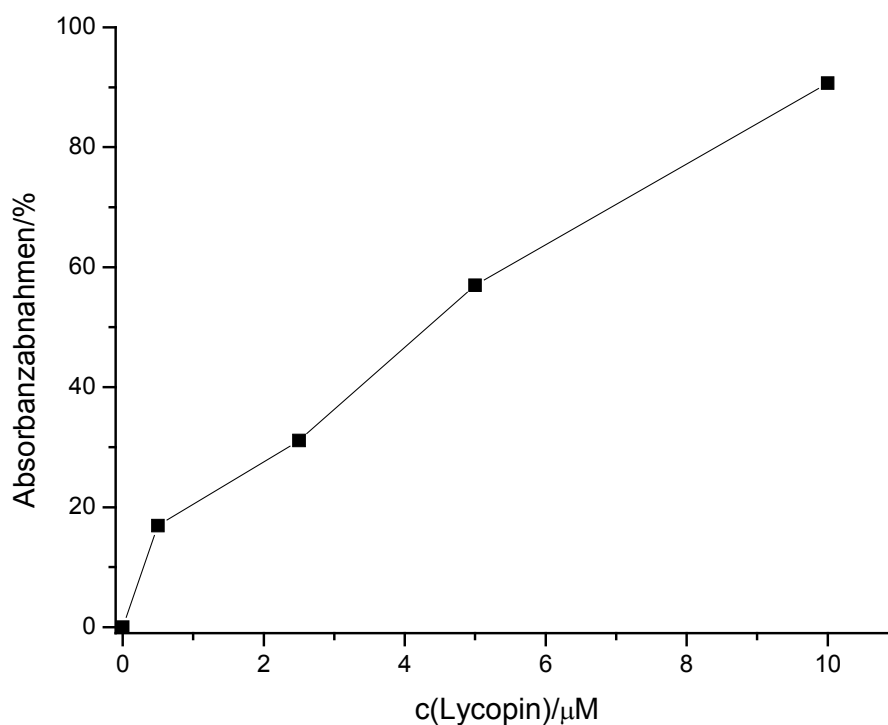


Abbildung 4.10: Auftragung der Lycopinkonzentrationen 0 μ M, 0.5 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, und 10 μ M gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 min Reaktionszeit

Wie die Abbildung 4.10 zeigt, weichen bei Lycopin die kleinen Zugabemengen vom linearen Konzentrationsverlauf ab. Um den Fehler der Referenz-Auswertung zu bestimmen, werden die folgende Berechnungen durchgeführt.

Tabelle 4.13.: Fehleranalyse in der Steigungs- und Flächenbestimmung nach der Reaktionszeit von 4 Minuten

Steigungsbestimmung für die Konzentrationen 2.5 μM , 5 μM und 10 μM	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	r^2	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
mit Startwertepaar (0/0) und Regression durch Ursprung	9.720 ± 0.760	0.9867	32.57
mit Startwertepaar (0/0) und Regression nicht durch Ursprung	8.601 ± 0.820	0.9967	28.98
ohne Startwertepaar (0/0) und Regression durch Ursprung	9.720 ± 0.878	0.9962	32.57
ohne Startwertepaar (0/0) und Regression nicht durch Ursprung	7.872 ± 0.488	0.9962	26.59

Wie erwartet ergibt sich für die Abweichungen bei den kleinen Konzentrationszugaben, dass der geringste Fehler in der Auswertung ohne ein Startwertepaar (0/0) und einer Regression nicht durch den Ursprung gemacht wird. Dazu soll bemerkt werden, dass die Fehlerdiskussion hier rein mathematisch geführt wird. Mögliche mechanistische Erklärungen, welche ein vom linearen Verlauf abweichendes Reduktionsverhalten erklären könnten, bleiben unberücksichtigt.

Dennoch sollen, um die RAA(AUC)-Werte besser zu vergleichen zu können, alle Auswertungen nach einer Methode durchgeführt werden. Hierbei wird die Referenz-Auswertmethode gewählt, welche auch für das Trolox angewendet wurde. Damit wird die Flächenbestimmung der Carotinoide einheitlich mit einem Startwertepaar (0/0) und einer Regression durch den Ursprung durchgeführt.

Für die Bestimmung des Lycopin RAA(AUC)-Wertes nach 1 und 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

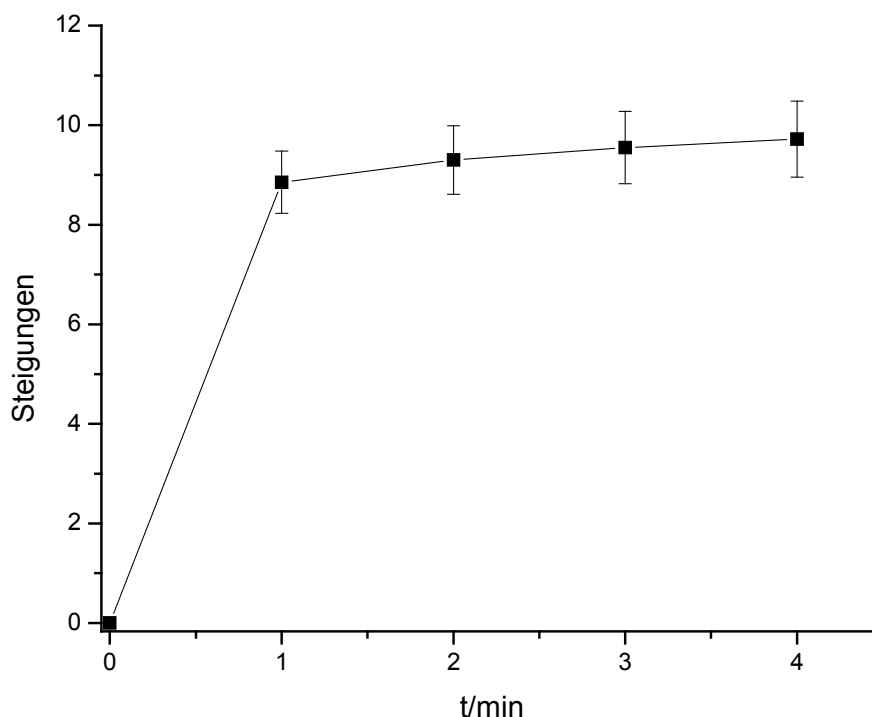


Abbildung 4.11: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Lycopinexperiment

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.14.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	4.43
1	8.855 $\pm$ 0.628	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.11:

Fläche = 4.43 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[1\text{min}]}$: **2.53**

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.15: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	32.57
1	8.855 ± 0.628	
2	9.303 ± 0.688	
3	9.553 ± 0.727	
4	9.720 ± 0.760	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.11:

Fläche = 32.57 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[4\text{min}]}$: **2.59**

4.2.3 Cryptoxanthin

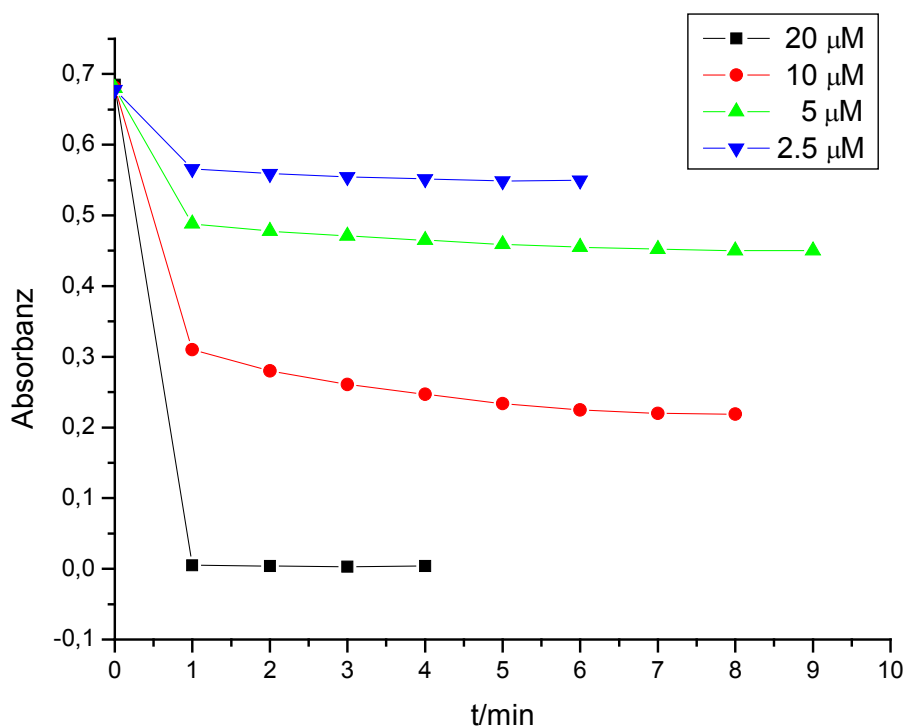


Abbildung 4.12: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Cryptoxanthinkonzentrationen 2.5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM

Tabelle 4.16: Gemessene ABTS^{•+}Absorbanzen für die zugegebenen Cryptoxanthinkonzentrationen

Absorbanzen				
c (Cryptoxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	2.5 µM
t (min)				
0	0,685	0,681	0,680	0,678
1	0,005	0,310	0,488	0,566
2	0,004	0,280	0,478	0,559
3	0,003	0,261	0,471	0,555
4	0,004	0,247	0,465	0,552

Die gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen aus Tabelle 4.16 werden in prozentuale Absorbanzabnahmen (%) umgerechnet.

Tabelle 4.17: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}Absorbanzabnahmen (%):

% ($A_0 - A/A_0$)				
c (Cryptoxanthin)	20 μ M	10 μ M	5 μ M	2.5 μ M
t (min)				
1	99.3	54.5	28.2	16.5
2	99.4	58.9	29.7	17.6
3	99.6	61.7	30.7	18.1
4	99.4	63.7	31.6	18.6

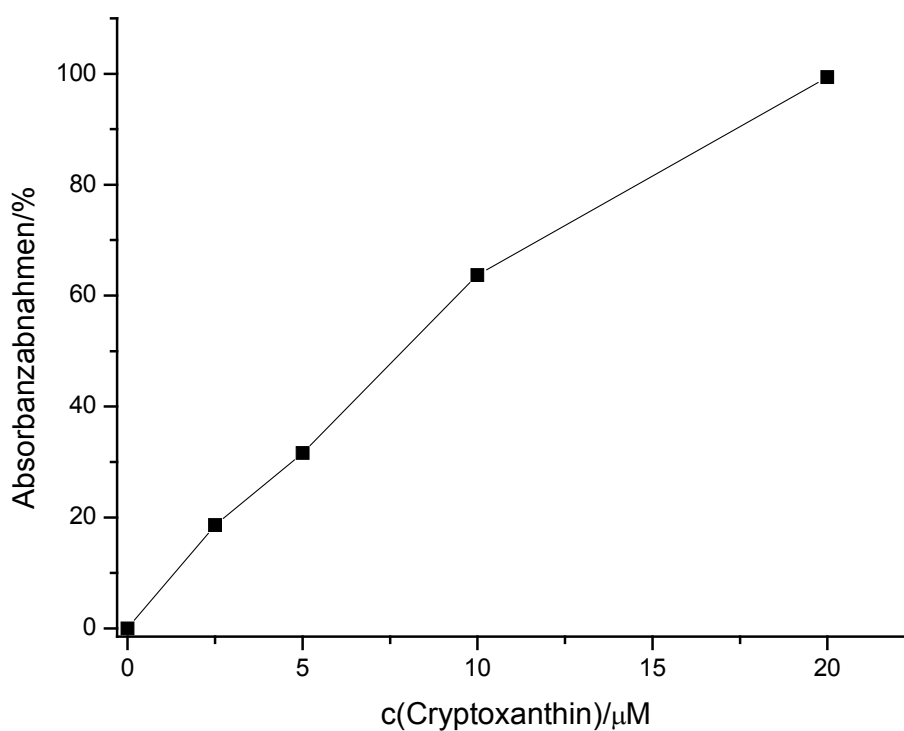


Abbildung 4.13: Auftragung der Cryptoxanthinkonzentrationen 0 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 min Reaktionszeit

Wie die Abbildung 4.13 zeigt, weicht die Cryptoxanthinzugabe von 20 μM vom linearen Konzentrationsverlauf ab. Das abweichende Verhalten zeigt sich jedoch nur bei einer Reaktionszeit von 4 Minuten. Nachfolgende Abbildung 4.14 zeigt den Konzentrationsverlauf für eine Reaktionszeit von einer Minute. Die nicht gezeigten Auftragungen für die Reaktionszeiten von 2 und 3 Minuten beschreiben ebenfalls ein lineares Konzentrationsverhalten.

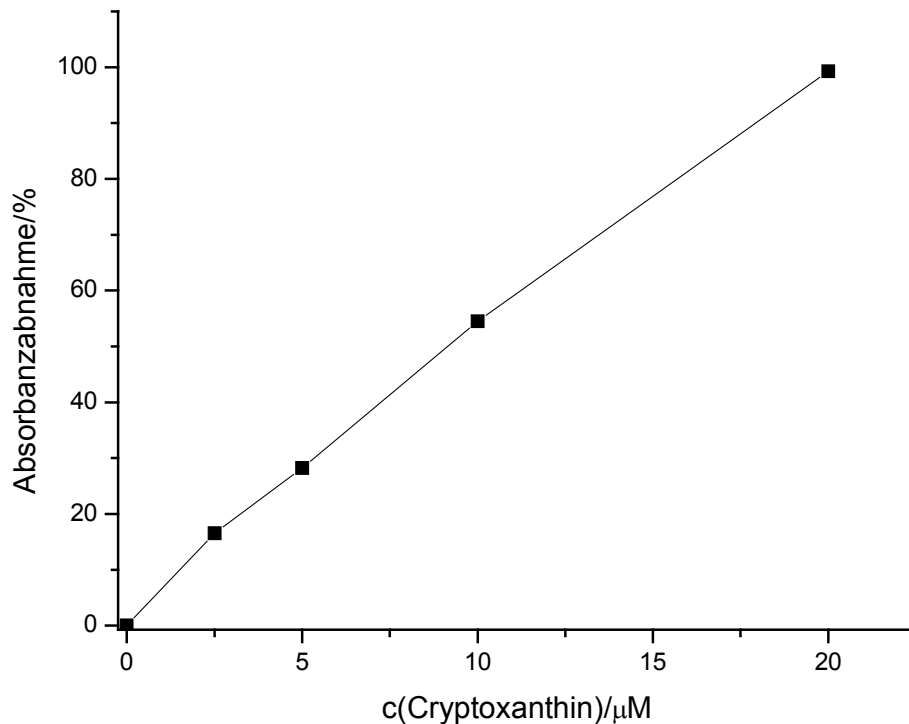


Abbildung 4.14: Auftragung der Cryptoxanthinkonzentrationen 0 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM gegen %-Absorbanzabnahmen nach 1 min Reaktionszeit

Daher wird die Konzentration von 20 μM Cryptoxanthin in die Auswertung einbezogen.

Für die Bestimmung des Cryptoxanthin RAA(AUC)-Wertes nach 1 und 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

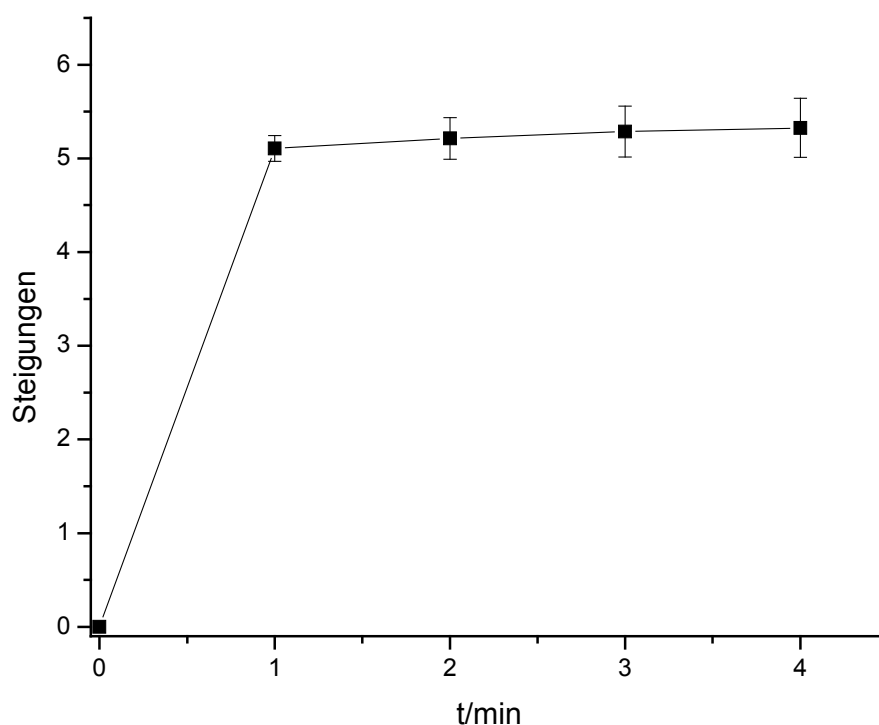


Abbildung 4.15: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Cryptoxanthinexperiment

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.18.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	2.55
1	5.107 $\pm$ 0.139	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.15:

Fläche = 2.55 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[1\text{min}]}$: **1.45**

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeit gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.19.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	18.27
1	5.107 $\pm$ 0.139	
2	5.213 $\pm$ 0.221	
3	5.285 $\pm$ 0.272	
4	5.326 $\pm$ 0.316	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.15:

Fläche = 18.27 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert _[4min]: **1.45**

4.2.4 Lutein

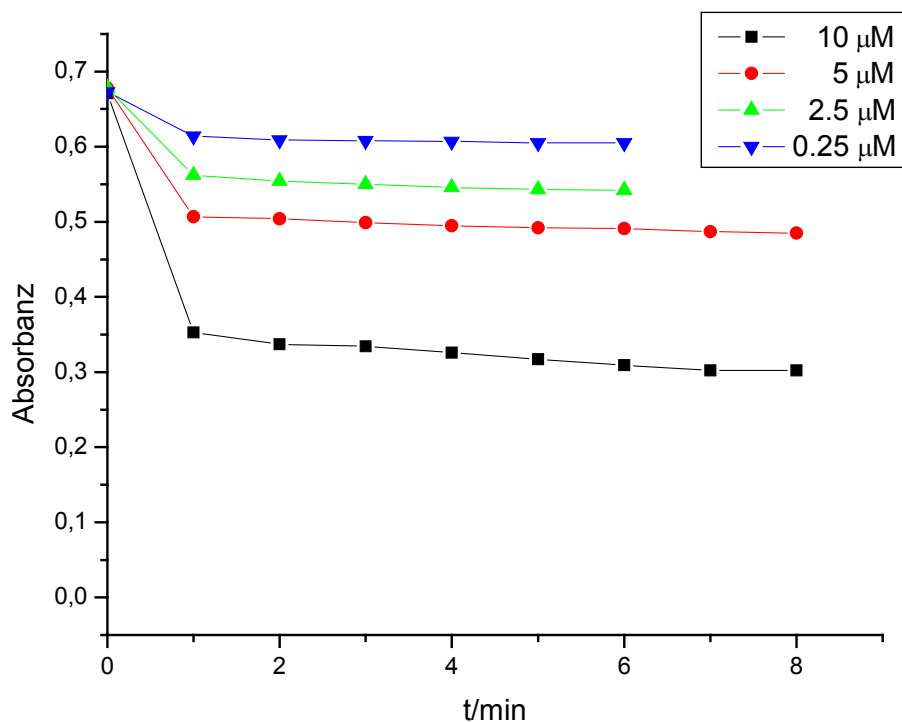


Abbildung 4.16: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Luteinkonzentrationen 0.25 µM, 2.5 µM, 5 µM und 10 µM

Tabelle 4.20: Gemessene ABTS^{•+}Absorbanzen für die zugegebenen Luteinkonzentrationen

Absorbanzen				
c (Lutein)	10 µM	5 µM	2.5 µM	0.25 µM
t (min)				
0	0,671	0,678	0,678	0,673
1	0,353	0,507	0,562	0,614
2	0,337	0,504	0,554	0,609
3	0,334	0,499	0,55	0,608
4	0,326	0,495	0,546	0,607

Die gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen aus Tabelle 4.20 werden in prozentuale Absorbanzabnahmen (%) umgerechnet.

Tabelle 4.21: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}Absorbanzabnahmen (%):

% ($A_0 - A/A_0$)				
c (Lutein)	10 μ M	5 μ M	2.5 μ M	0.25 μ M
t (min)				
1	47.4	25.2	17.1	8.8
2	49.8	25.7	18.3	9.5
3	50.2	26.4	18.9	9.7
4	51.4	26.9	19.5	9.8

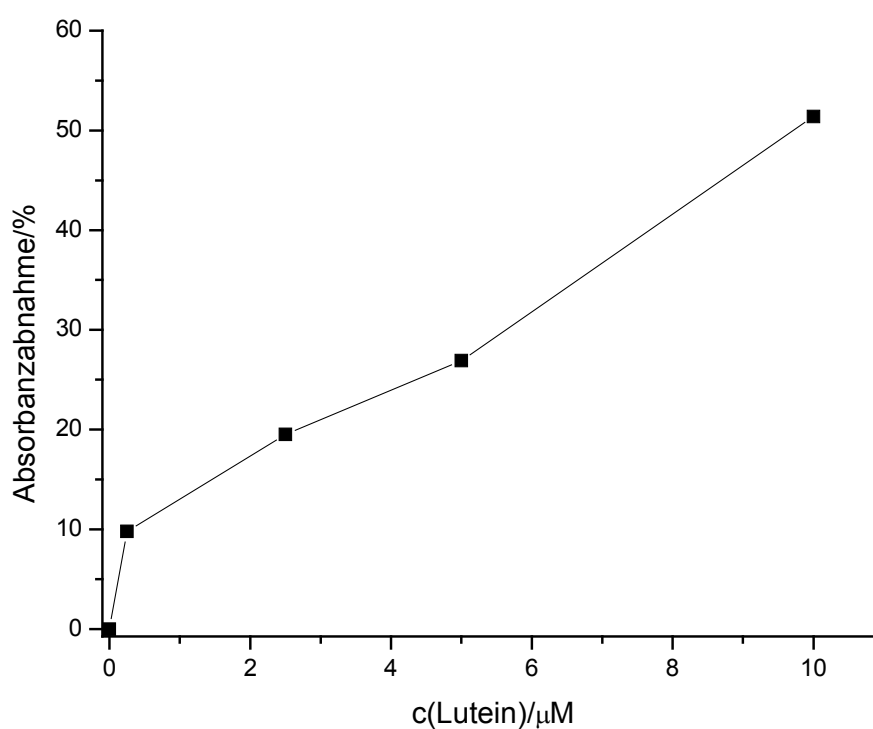


Abbildung 4.17: Auftragung der Luteinkonzentrationen 0 μ M, 0.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M und 10 μ M gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 min Reaktionszeit

Wie der Abbildung 4.17 zu entnehmen ist, zeigt Lutein für die kleinen Konzentrationszugaben, ähnlich dem Lycopin, ein Abweichen vom linearen Konzentrationsverlauf. Auch für das Lutein wird eine Fehlerberechnung und ein Vergleich zur Referenz-Auswertung durchgeführt.

Tabelle 4.22: Fehleranalyse in der Steigungs- und Flächenbestimmung nach der Reaktionszeit von 4 Minuten

Steigungsbestimmung für die Konzentrationen 2.5 μM , 5 μM und 10 μM	Steigung [%(A_0-A/A_0) $\text{l } \mu\text{mol}^{-1}$] $\pm \sigma$	r^2	Fläche [%(A_0-A/A_0) $\text{l } \mu\text{mol}^{-1}$] min^{-1}
mit Startwertepaar (0/0) und Regression durch Ursprung	5.328 ± 0.465	0.9840	17.92
mit Startwertepaar (0/0) und Regression nicht durch Ursprung	4.651 ± 0.486	0.9840	15.68
ohne Startwertepaar (0/0) und Regression durch Ursprung	5.329 ± 0.537	0.9960	17.92
ohne Startwertepaar (0/0) und Regression nicht durch Ursprung	4.229 ± 0.269	0.9961	14.31

Für die Auswertung von Lutein ergeben in den verschiedenen Auswertmethoden hohe Abweichungen. So liegen die Abweichungen in den Steigungsbeträgen und damit auch in der Flächenberechnung bei etwa 20 %. Trotz eines möglicherweise erhöhten Fehlers wird auch hier mit der Referenzmethode, unter Einbeziehung des Startwertepaares (0/0) und der Regression durch den Ursprung, ausgewertet.

Im Kapitel 4.4 folgt eine genauere Analyse des ABTS-Assays der Carotinoide, in welcher auf die spezielle Carotinoidreaktionen eingegangen wird.

Für die Bestimmung des Lutein RAA(AUC)-Wertes nach 1 und 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

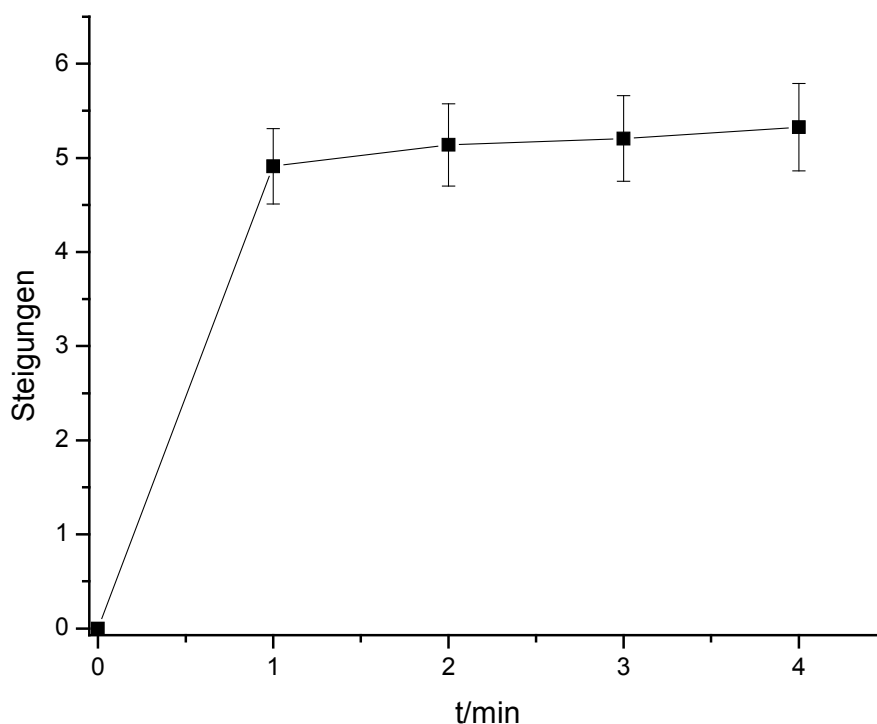


Abbildung 4.18: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Luteinexperiment

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.23: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	2.46
1	4.912 $\pm$ 0.400	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.18:

Fläche = 2.46 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[1\text{min}]}$: **1.41**

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeit gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit ergibt sich:

Tabelle 4.24.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	17.92
1	4.912 ± 0.400	
2	5.138 ± 0.436	
3	5.206 ± 0.455	
4	5.328 ± 0.465	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.18:

Fläche = 17.92 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[4\text{min}]}$: **1.42**

4.2.5 Zeaxanthin

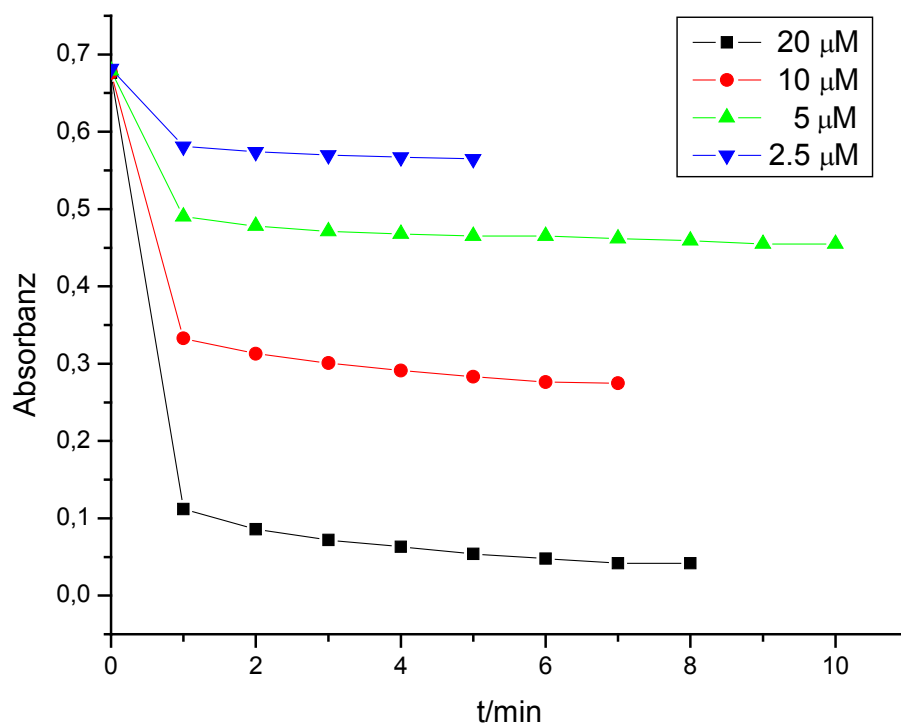


Abbildung 4.19: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Zeaxanthinkonzentrationen 2.5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM

Tabelle 4.25: Gemessene ABTS^{•+}-Absorbanzen für die zugegebenen Zeaxanthinkonzentrationen

Absorbanzen				
c (Zeaxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	2.5 µM
t (min)				
0	0,683	0,682	0,679	0,68
1	0,293	0,507	0,584	0,66
2	0,284	0,503	0,582	0,652
3	0,276	0,504	0,582	0,654
4	0,275	0,502	0,562	0,653

Die gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen aus Tabelle 4.25 werden in prozentuale Absorbanzabnahmen (%) umgerechnet.

Tabelle 4.26: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen (%):

% ($A_0 - A/A_0$)				
c (Zeaxanthin)	20 μ M	10 μ M	5 μ M	2.5 μ M
t (min)				
1	57.1	25.7	13.9	2.9
2	58.4	26.3	14.3	4.1
3	59.6	26.1	14.3	3.8
4	59.7	26.4	17.2	3.9

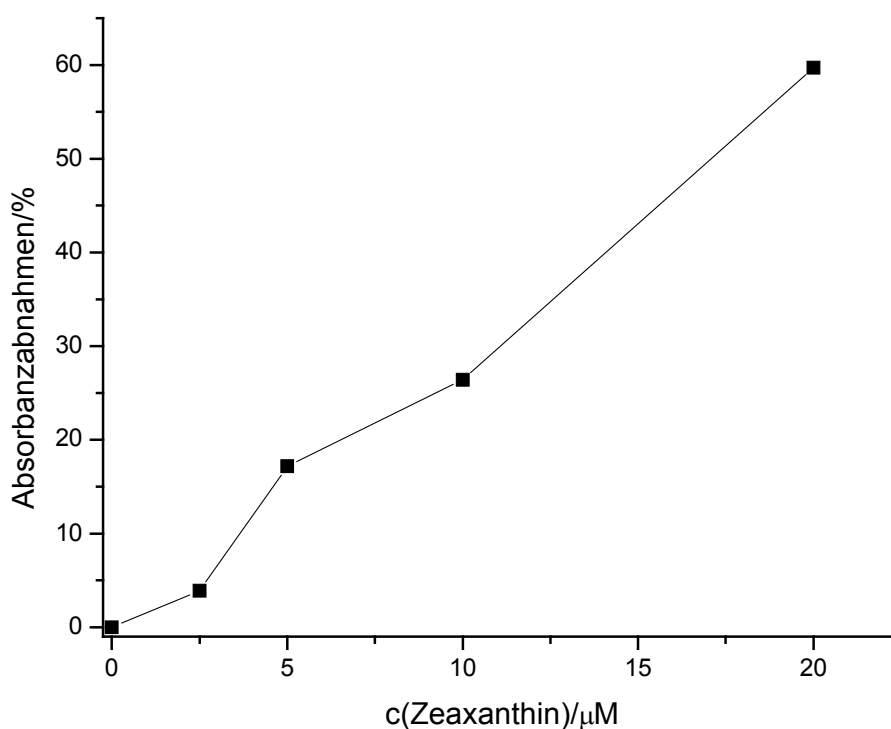


Abbildung 4.20: Auftragung der Zeaxanthinkonzentrationen 0 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, und 20 μ M gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 Minuten Reaktionszeit

Für die Bestimmung des Zeaxanthin RAA(AUC)-Wertes nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt sich:

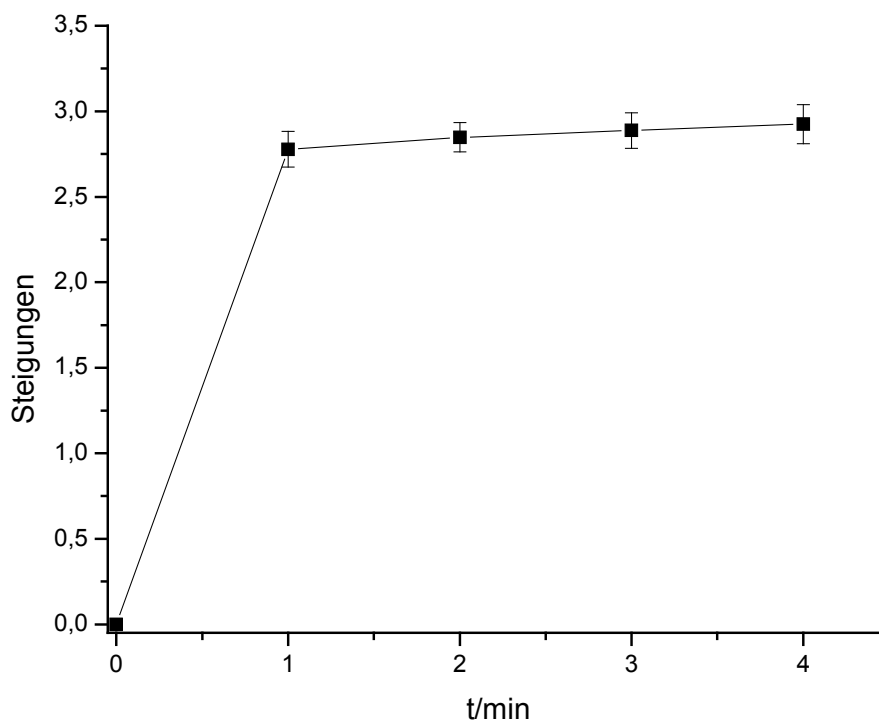


Abbildung 4.21: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Zeaxanthinexperiment

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. RAA(AUC)-Wert nach 1 Minute Reaktionszeit :

Tabelle 4.27.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	1.39
1	2.778 $\pm$ 0.104	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.21:

Fläche = 1.39 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[1\text{min}]}$: **0.79**

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeit gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit, ausgewertet nach der Referenzmethode, ergibt sich:

Tabelle 4.28.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	9.98
1	2.778 ± 0.104	
2	2.848 ± 0.087	
3	2.888 ± 0.104	
4	2.925 ± 0.114	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.21:

Fläche = 9.98 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[4\text{min}]}$: **0.79**

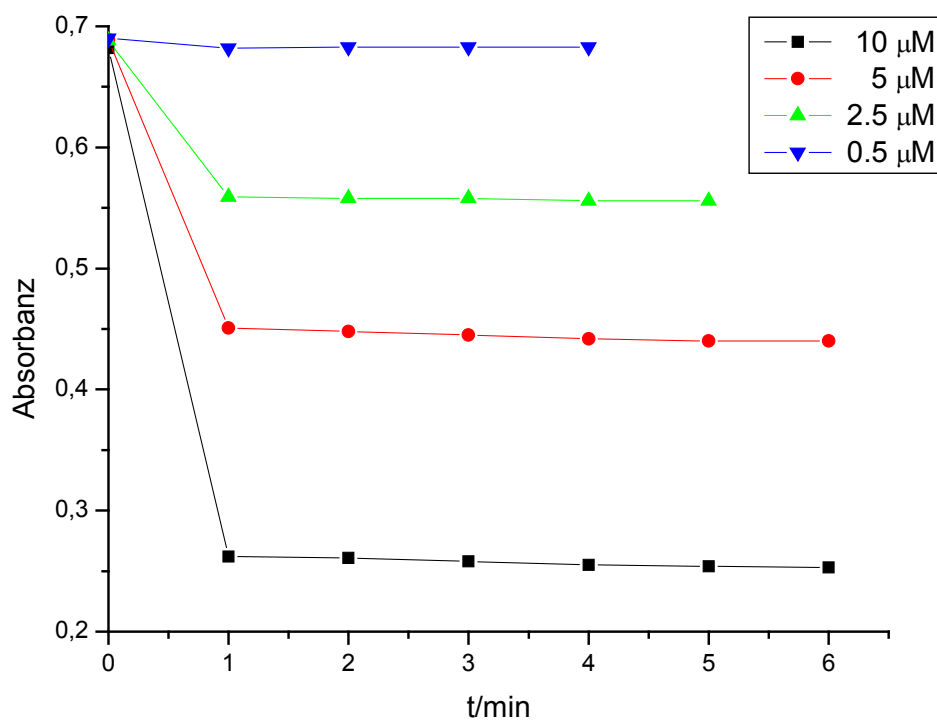
4.2.6 β -Carotin

Abbildung 4.22: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die β -Carotinkonzentrationen 0.5 μM , 2.5 μM , 5 μM und 10 μM

Tabelle 4.29: Gemessenen ABTS $^{\bullet+}$ -Absorbanzen für die zugegebenen β -Carotinkonzentrationen

Absorbanzen				
c (β -Carotin)	10 μM	5 μM	2.5 μM	0.5 μM
t (min)				
0	0,682	0,689	0,688	0,69
1	0,262	0,451	0,559	0,682
2	0,261	0,448	0,558	0,683
3	0,258	0,445	0,558	0,683
4	0,255	0,442	0,556	0,683

Die gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen aus Tabelle 4.29 werden in prozentuale Absorbanzabnahmen (%) umgerechnet.

Tabelle 4.30: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen (%):

% ($A_0 - A/A_0$)				
c (β -Carotin)	10 μ M	5 μ M	2.5 μ M	0.5 μ M
t (min)				
1	61.6	34.5	18.8	1.2
2	61.7	34.9	18.9	1.0
3	62.2	35.4	18.9	1.0
4	62.6	35.9	19.2	1.0

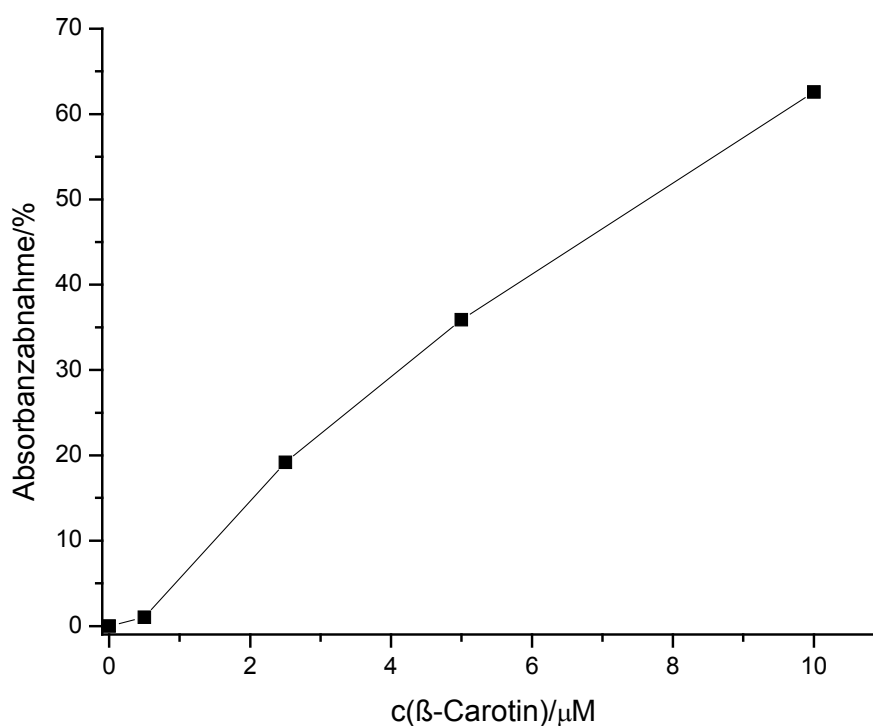


Abbildung 4.23: Auftragung der β -Carotinkonzentrationen 0 μ M, 0.5 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, und 10 μ M gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 Minuten Reaktionszeit

Für die Bestimmung des β -Carotin RAA(AUC)-Wertes nach 1 Minute Reaktionszeit ergibt sich:

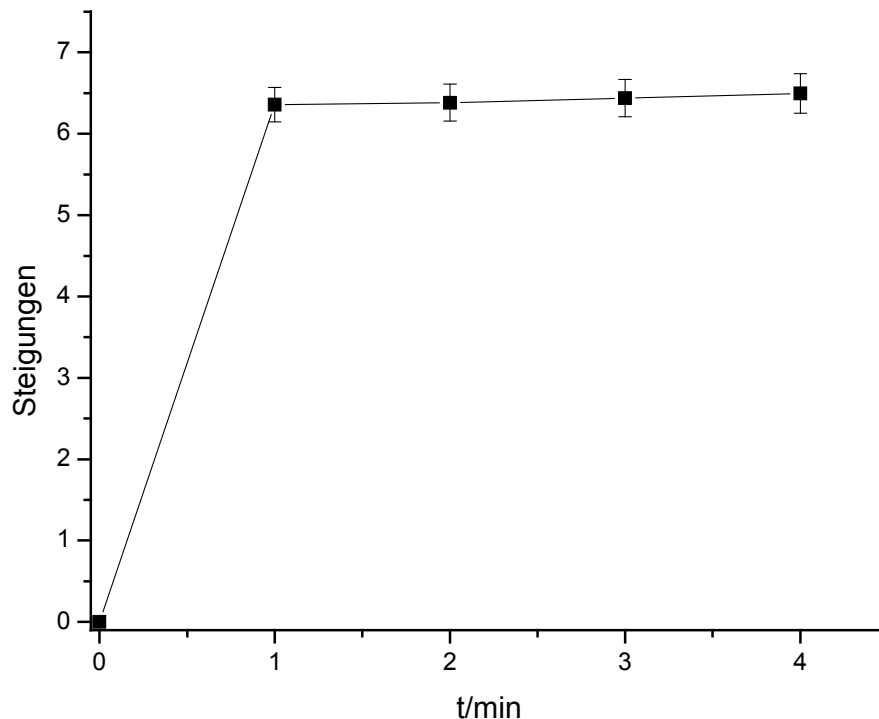


Abbildung 4.24: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im β -Carotinexperiment

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. RAA(AUC)-Wert nach 1 Minute Reaktionszeit :

Tabelle 4.31.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	3.18
1	6.358 $\pm$ 0.212	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.24:

Fläche = 3.18 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[1\text{min}]}$: **1.82**

Es wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigungen bestimmt. Für den RAA(AUC)-Wert nach 4 Minuten Reaktionszeit, ausgewertet nach der Referenzmethode, ergibt sich:

Tabelle 4.32.: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) l μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	22.43
1	6.358 $\pm$ 0.104	
2	6.382 $\pm$ 0.436	
3	6.439 $\pm$ 0.455	
4	6.494 $\pm$ 0.465	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.24:

Fläche = 22.43 [% (Absorbanzänderung) l μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[4\text{min}]}$: **1.78**

4.2.7 Canthaxanthin

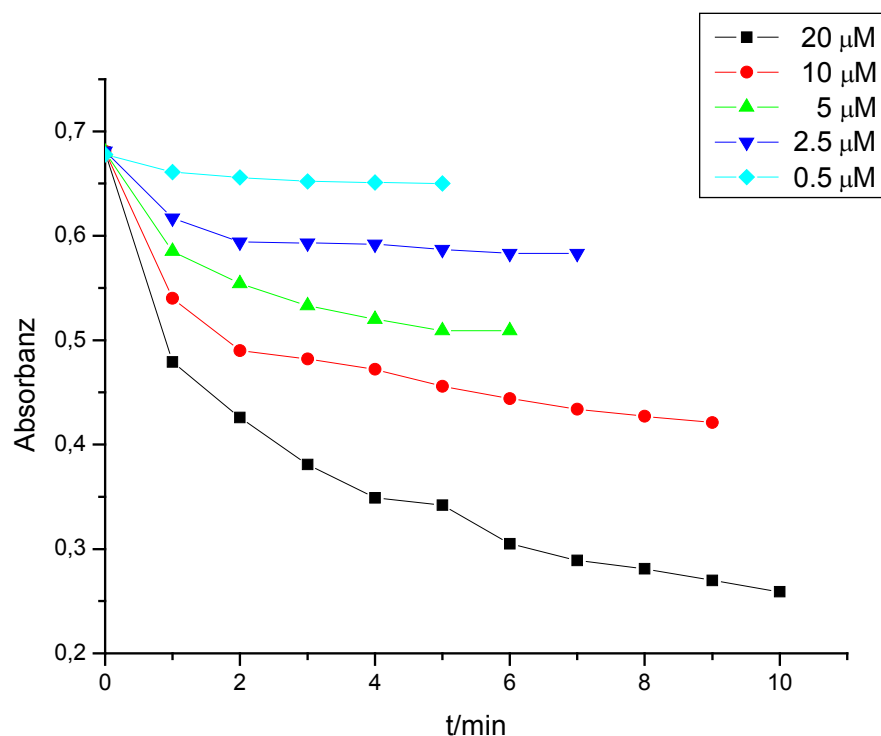


Abbildung 4.25: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Canthaxanthinkonzentrationen 0.5 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM

Tabelle 4.33.1: Gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen für die zugegebenen Canthaxanthinkonzentrationen (Teil 1)

Absorbanzen					
c (Canthaxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	2.5 µM	0.5 µM
t (min)					
0	0,68	0,681	0,68	0,681	0,678
1	0,479	0,54	0,585	0,617	0,661
2	0,426	0,49	0,554	0,594	0,656
3	0,381	0,482	0,533	0,593	0,652
4	0,349	0,472	0,52	0,592	0,651
5	0,342	0,456	0,509	0,587	0,65

Tabelle 4.33.2: Gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen für die zugegebenen Canthaxanthinkonzentrationen (Teil 2)

Absorbanzen					
c (Canthaxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	2.5 µM	0.5 µM
t (min)					
6	0,305	0,444	0,509	0,583	-
7	0,289	0,434	-	0,583	-
8	0,281	0,427	-	-	-
9	0,27	0,421	-	-	-
10	0,259	-	-	-	-

Tabelle 4.34: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen (%):

% (A ₀ -A/A ₀)					
c (Canthaxanthin)	20 mM	10 µM	5 µM	2.5 µM	0.5 µM
t (min)					
1	29.6	20.7	13.9	9.4	2.5
2	37.4	28.1	18.5	12.8	3.2
3	43.9	29.2	21.6	12.9	3.8
4	48.7	30.7	23.5	13.1	3.9

Canthaxanthin zeigt einen anderen Kurvenverlauf der Absorbanzabnahme als Trolox und die bisher gezeigten Carotinoide. Um eine Abschätzung des RAA(AUC)-Wertes zu machen, wird für Canthaxanthin die RAA(AUC)-Berechnung für die Konzentrationen 0 µM, 0.5 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM und 20µM nach 1 Minute und nach 4 Minuten Reaktionszeit durchgeführt. Da die Reaktion zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig abgelaufen ist, ist die Bestimmung des RAA(AUC)-Werts zunächst nur vorläufig.

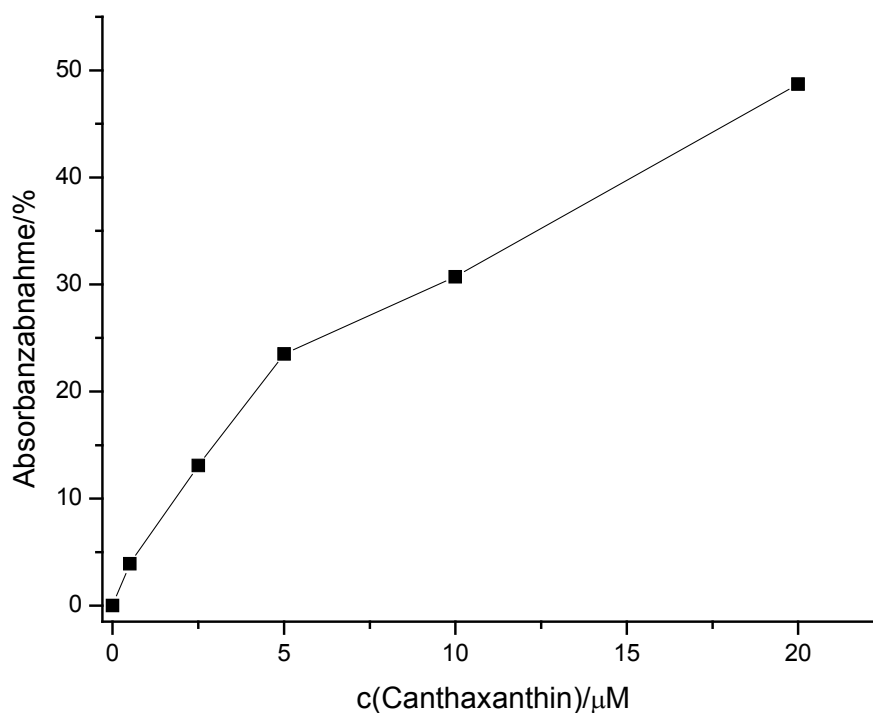


Abbildung 4.26: Auftragung der Canthaxanthinkonzentrationen 0 μM , 0.5 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 Minuten Reaktionszeit

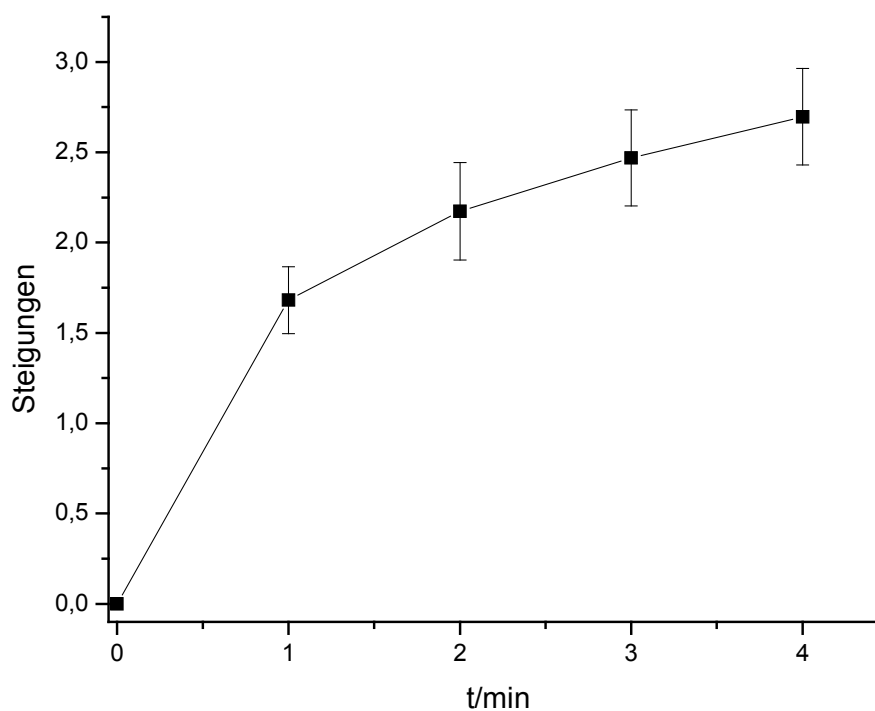


Abbildung 4.27: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Canthaxanthinexperiment

Wie die Abbildung 4.27 zeigt bleiben die Absorbanzabnahmen und die Steigungen im Reaktionsverlauf nicht konstant. Für die Bestimmung des Canthaxanthin RAA(AUC)-Wertes nach 1 Minute Reaktionszeit wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigung bestimmt.

Tabelle 4.35: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 1 Minute

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	0.84
1	1.681 $\pm$ 0.185	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.27:

Fläche = 0.84 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert _[1min]: **0.48**

Für die Bestimmung des Canthaxanthin RAA(AUC)-Wertes nach 4 Minuten Reaktionszeit wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigung bestimmt.

Tabelle 4.36: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	7.67
1	1.681 $\pm$ 0.185	
2	2.173 $\pm$ 0.270	
3	2.469 $\pm$ 0.266	
4	2.697 $\pm$ 0.267	

Fläche unter der Kurve (AUC)

Fläche = 7.67 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert _[4min]: **0.61**

4.2.8 Astaxanthin

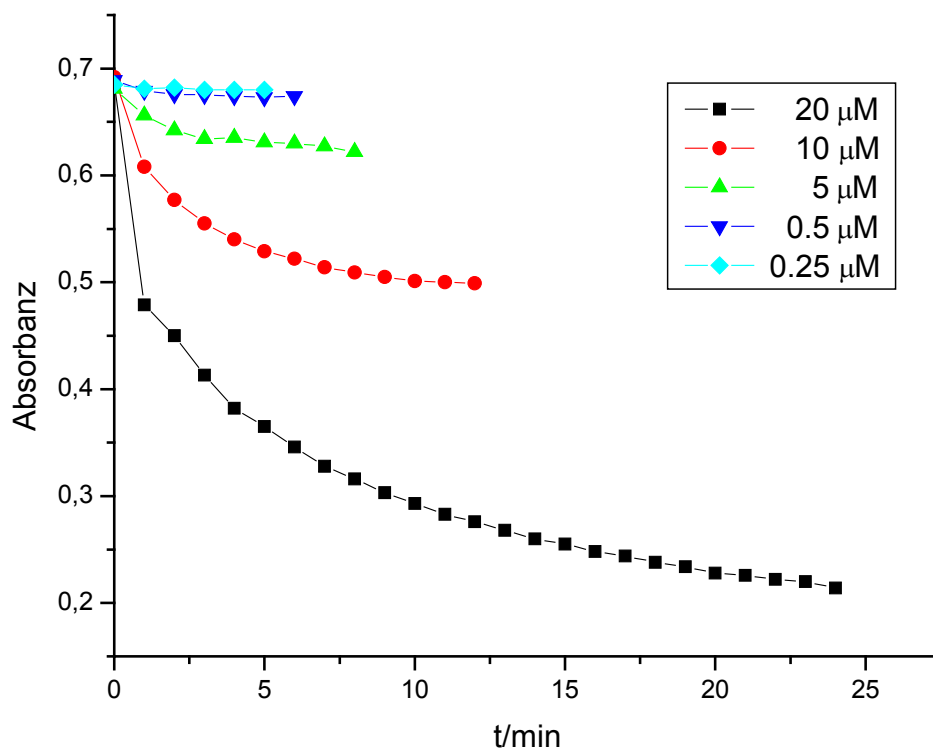


Abbildung 4.28: Auftragung der gemessenen Absorbanzen für die Astaxanthinkonzentrationen 0.25 µM, 0.5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM

Tabelle 4.37.1: Gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen für die zugegebenen Astaxanthinkonzentrationen (Teil 1)

Absorbanzen					
c (Astaxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	0.5 µM	0.25 µM
t (min)					
0	0,686	0,692	0,681	0,689	0,685
1	0,479	0,608	0,656	0,679	0,681
2	0,45	0,577	0,642	0,676	0,682
3	0,413	0,555	0,634	0,675	0,68
4	0,382	0,54	0,635	0,674	0,68
5	0,365	0,529	0,631	0,673	0,68

Tabelle 4.37.2: Gemessenen ABTS^{•+}-Absorbanzen für die zugegebenen Astaxanthinkonzentrationen (Teil 2)

Absorbanzen					
c (Astaxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	0.5 µM	0.25 µM
t (min)					
6	0,346	0,522	0,63	0,674	-
7	0,328	0,514	0,627	-	-
8	0,316	0,509	0,622	-	-
9	0,303	0,505	-	-	-
10	0,293	0,501	-	-	-
11	0,283	0,5	-	-	-
12	0,276	0,499	-	-	-
13	0,268	-	-	-	-
14	0,26	-	-	-	-
15	0,255	-	-	-	-
16	0,248	-	-	-	-
17	0,244	-	-	-	-
18	0,238	-	-	-	-
19	0,234	-	-	-	-
20	0,228	-	-	-	-

Tabelle 4.38: Berechnete prozentuale ABTS^{•+}-Absorbanzabnahmen (%):

% (A ₀ -A/A ₀)				
c (Astaxanthin)	20 µM	10 µM	5 µM	0.5 µM
t (min)				
1	30.2	12.1	3.7	1.5
2	34.4	16.6	5.7	1.9
3	39.8	19.8	6.9	2.0
4	44.3	21.9	6.8	2.2

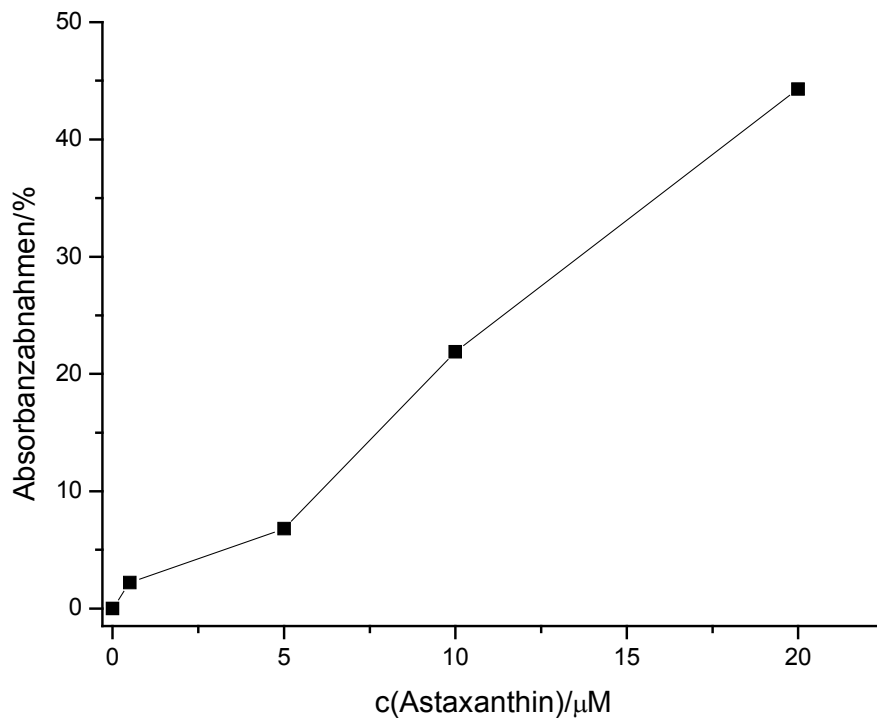


Abbildung 4.29: Auftragung der Astaxanthinkonzentrationen 0 μM , 0.5 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM gegen %-Absorbanzabnahmen nach 4 Minuten Reaktionszeit

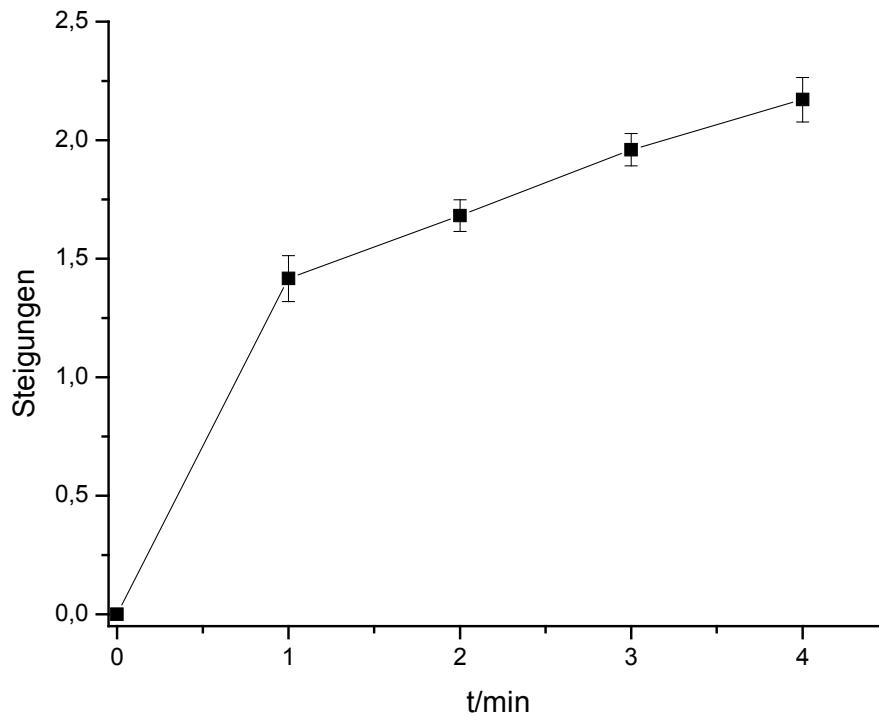


Abbildung 4.30: Steigung gegen die Reaktionszeit von 4 Minuten im Astaxanthinexperiment

Wie die Abbildung 4.30 zeigt bleiben die Absorbanzabnahmen und die Steigungen im Reaktionsverlauf nicht konstant. Für die Bestimmung des Astaxanthin RAA(AUC)-Wertes nach 1 Minute Reaktionszeit wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigung bestimmt.

Tabelle 4.39: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	0.71
1	1.417 $\pm$ 0.097	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.30:

Fläche = 0.71 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[1\text{min}]}$: **0.41**

Für die Bestimmung des Astaxanthin RAA(AUC)-Wertes nach 4 Minuten Reaktionszeit wird die Fläche unter der Auftragung Reaktionszeiten gegen die Steigung bestimmt.

Tabelle 4.40: RAA(AUC)-Berechnung für die Reaktionszeit 4 Minuten

Reaktionszeit [min]	Steigung [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] $\pm \sigma$	Fläche [%($A_0 - A/A_0$) μmol^{-1}] min^{-1}
0	0	6.14
1	1.417 $\pm$ 0.097	
2	1.682 $\pm$ 0.067	
3	1.960 $\pm$ 0.068	
4	2.171 $\pm$ 0.094	

Fläche unter der Kurve (AUC) der Abbildung 4.30:

Fläche = 6.14 [% (Absorbanzänderung) | μmol^{-1}] min^{-1}

RAA(AUC)-Wert $_{[4\text{min}]}$: **0.49**

4.3 Zusammenstellung der gemessenen RAA(AUC)-Werte

Die Tabelle 4.41 gibt eine Übersicht über alle berechneten RAA(AUC)-Werte.

Tabelle 4.41: Zusammenstellung der RAA(AUC)-Werte

Carotinoid	RAA(AUC)-Wert _[1min]	RAA(AUC)-Wert _[4min]
Lycopin	2.53	2.59
β-Carotin	1.82	1.78
Cryptoxanthin	1.45	1.45
Lutein	1.41	1.42
Trolox	1.00	1.00
Zeaxanthin	0.79	0.79
Canthaxanthin	(0.48)*	(0.61)*
Astaxanthin	(0.41)*	(0.49)*

Dabei zeigt sich, dass nur geringe Unterschiede zwischen den jeweiligen RAA(AUC)-Werten nach 1 Minute Reaktionszeit und den RAA(AUC)-Werten nach 4 Minuten Reaktionszeit bestehen. Dieser Befund wurde auch erwartet, da alle Absorbanzabnahmekurven schon nach 1 Minute eine fast vollständige Carotinoidoxidation zeigen. Die Unterschiede der RAA(AUC)-Werte sind etwas größer für die Carotinoide Lycopin und β-Carotin, welche die höchsten RAA(AUC)-Werte besitzen.

*Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass die RAA(AUC)-Werte von Canthaxanthin und Astaxanthin nur vorläufig sind, und eine nicht vollständige Reaktion mit ABTS^{•+} beschreiben. Zur Verdeutlichung sind diese Werte mit einem Stern markiert und sollten nicht ohne weitere Interpretation verwendet werden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse aus dem ABTS-Assay

Wie den Messkurven zu entnehmen ist, zeigen Canthaxanthin und Astaxanthin deutlich andere Kurvenverläufe als die Trolox- und die übrigen Carotinoidmesskurven. Nach einer Minute Reaktionszeit hat der ABTS^{•+}-Absorbanzwert von Canthaxanthin und Astaxanthin, gegenüber den anderen Carotinoiden, um einen sehr viel kleinen Betrag abgenommen. Die ABTS^{•+}-Absorbanz ist für beide Ketocarotinoide im Verlauf der Reaktion nicht konstant und nimmt mit steigender Reaktionszeit immer weiter ab. Dieser Befund bedarf einer weiteren Untersuchung.

Zudem zeigt sich, dass beim Vergleich der erhaltenen Carotinoid-RAA(AUC)-Werte für Lycopin, Lutein, β -Carotin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin mit den Carotinoid-RAA(AUC) oder den TEAC-Werten in der Literatur^[96,102], sehr große Abweichungen gefunden werden. Diese Abweichungen sind um so erstaunlicher, da für die RAA(AUC)-Auswertung alle Messungen nach gleichen Assaybedingungen durchgeführt wurden (T = 30°C, nicht entgaste Lsm, gleiche Konzentrationen von Stammlösung und Antioxidans Konzentrationen in der Messküvette, identische Herstellung der ABTS^{•+}-Stammlösung, gleiche Lösungsmittel) Zudem werden alle Ergebnis-Werte (TEAC bzw. RAA(AUC)) nach gleichem Verfahren berechnet, so dass alle berechneten Werte auf dem Verhältnis der Flächeninhalte (AUC) Carotinoid gegen Trolox basieren.

Tabelle 4.42: Gemessene RAA(AUC)-Werte und Vergleichswerte aus der Literatur

Carotinoid	RAA(AUC)-Wert	RAA(AUC)-Wert ^[96]	RAA(AUC)-Wert ^[102]
Lycopin	2.59	3.04	-
β -Carotin	1.78	2.50	3.56
Cryptoxanthin	1.45	-	1.58
Lutein	1.42	-	-
Zeaxanthin	0.79	-	3.28

Zur Demonstration der Abweichungen fasst die Abbildung 4.31 die Ergebnisse der obigen Tabelle nochmals graphisch zusammen.

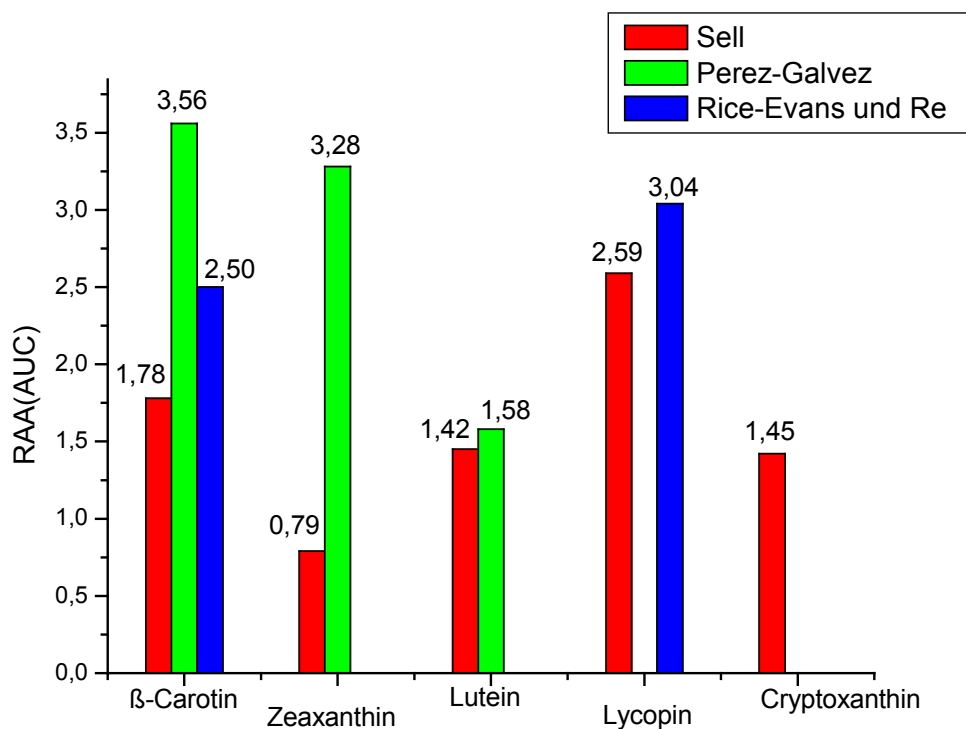
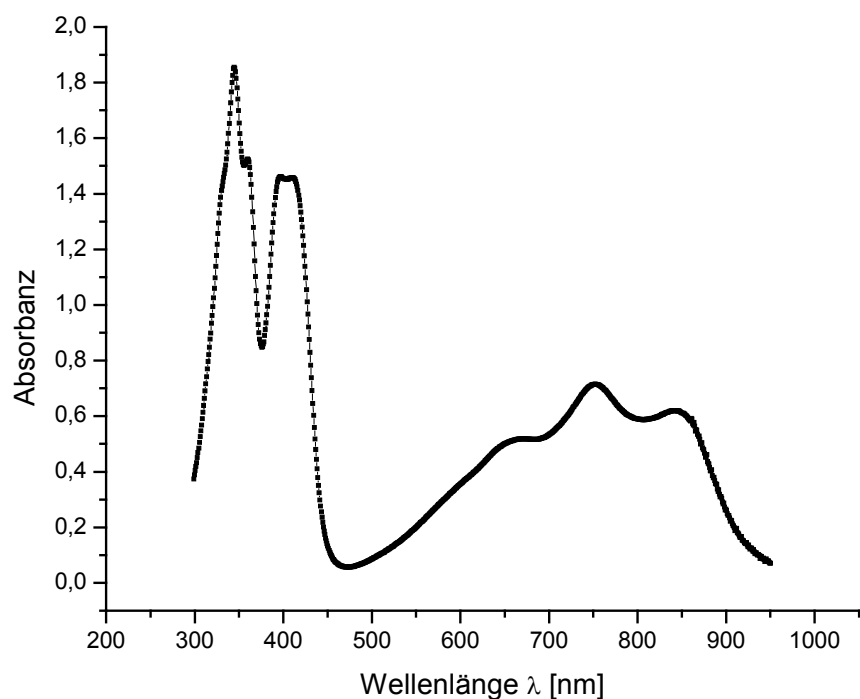


Abbildung 4.31: Graphischer Vergleich der RAA(AUC)-Werte

Um Gründe für die starken Abweichungen der Carotinoid-RAA(AUC)-Werte zu ermitteln, wurde zunächst die ABTS-Stammlösung genauer untersucht.

Abbildung 4.32: Eine 13.8 mM ABTS-Lösung versetzt mit einer 4.9 mM $K_2S_2O_8$ -Lösung in Ethanol/ H_2O

Das Spektrum der hergestellten ABTS-Radikalkationenlösung zeigt vier Hauptabsorptionsbanden. Die erste Absorptionsbande bei 345 nm zeigt nicht umgesetzten ABTS-Farbstoff (Red) an. Die Absorptionsbanden bei 415 nm, 655 nm, 734 nm und 855 nm beschreiben Absorptionen des ABTS-Radikalkations (Sem).

Über die entsprechenden Extinktionskoeffizienten^[100] des ABTS und des ABTS^{•+}-Radikalkations in wässriger Lösung lässt sich der Radikalgehalt der Stammlösung überprüfen.

$\epsilon_{345} \text{ nm}$	$\epsilon_{415} \text{ nm}$	$\epsilon_{734} \text{ nm}$
$3,66 \cdot 10^4 \text{ l / mol cm}$	$3,60 \cdot 10^4 \text{ l / mol cm}$	$1,60 \cdot 10^4 \text{ l / mol cm}$

Der aus den spektroskopischen Daten berechnete Radikalgehalt der ABTS^{•+}-Stammlösung beträgt damit etwa 35%. Durch Erhöhung der Oxidationsdauer auf 36 Stunden erhält man eine maximale Radikalkationenausbeute von 50%. Scheinbar wird das Ausgangsmolekül ABTS (Red) nicht vollständig oxidiert.

Folgendes kann dazu bemerkt werden:

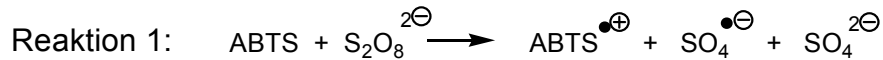
Erstens: Das ABTS-Molekül besitzt zwei Sulfonsäuregruppen, welche den Farbstoff sehr gut wasserlöslich machen. Daher sollte die Präparation und die Messung des Radikalkations im wässrigen Medium erfolgen. Der ABTS-Assay bietet eine gute Möglichkeit, wasserlösliche Antioxidantien im wässrigen Medium zu vermessen. Jedes zusätzliche Lösungsmittel oder jede Änderung in der Zusammensetzung des Mediums führt zu veränderten Löslichkeiten. Veränderte Löslichkeiten der Mess-Substanzen bedeuten veränderte Konzentrationen. Diese Konzentrationsänderungen können, nach der Nernst'schen Gleichung, eine Veränderung der Redoxpotentiale zur Folge haben. Ein verändertes Redoxpotential bedeutet in diesem Assay zwangsläufig einen Effekt auf die antioxidative Kapazitätsmessung.

Zweitens: Der zweite und ganz entscheidende Punkt ist der korrekte Einsatz der Konzentrationsäquivalente im Oxidationsansatz. Dazu sollten *alle* Reaktionen der oxidativen Darstellung von ABTS-Radikalkationen in der Reaktion mit Peroxodisulfat berücksichtigt werden.

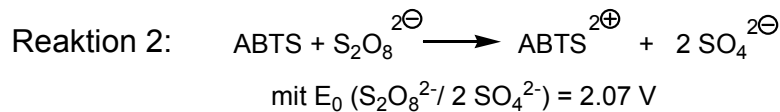
Wie schon einleitend bemerkt, handelt es sich beim ABTS-Farbstoff um ein *zweistufiges* Redoxsystem, in dem *drei* verschiedene Spezies beteiligt sind.

So wird ABTS (Red) von Peroxodisulfat, mit seinem sehr hohen Oxidationspotential von 2.07 V, nicht ausschließlich zur radikalischen monokationischen Spezies $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oxidiert, sondern auch zur dikationischen Spezies ABTS^{2+} .

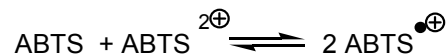
Es läuft also nicht nur ab:



Sondern auch:



Die ABTS-Radikalkationen (Sem) werden im Assay nicht nur durch die Reaktion 1 erzeugt, sondern auch durch die Reaktion 2. Über ein Komproportionierungsgleichgewicht zwischen ABTS (Red) und ABTS-Dikationen (Ox) werden zusätzlich ABTS-Radikalkationen (Sem) erzeugt:



Die Besonderheit dieser Gleichgewichtsreaktion liegt in dem ausgesprochen hohen Zahlenwert der Gleichgewichtskonstante K:

$$K = \frac{[\text{ABTS}^{\bullet+}]^2}{[\text{ABTS}] [\text{ABTS}^{2+}]}$$

Der Wert der Gleichgewichtskonstante K ist durch elektrochemische Untersuchungen zugänglich. Sind beide Halbstufenpotentiale bekannt, lässt sich die Gleichgewichtskonstante K mit den Werten aus^[87] berechnen:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = \frac{RT}{1F} \ln K$$

$$E_{02} = 840 \text{ mV} \quad E_{01} = 460 \text{ mV}$$

$$K = 2.14 \cdot 10^6$$

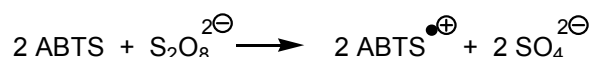
Mit einem K-Wert größer 10^6 liegt das Gleichgewicht der Oxidation nahezu vollständig auf der Seite der ABTS-Radikalkationen.



Diese Besonderheit erlaubt, dass die Oxidation von ABTS mit Peroxodisulfat in wässrigen Lösungen, zu einer 100%-igen Ausbeute an ABTS-Radikalkationen führt.

Eine maximale Ausbeute an Radikalkationen im Assay wird erreicht, wenn folglich *exakte* Oxidationsäquivalente eingesetzt werden.

Man sollte abweichend von der Assayvorschrift von Re und Rice-Evans^[96] nicht ein ungeradzahliges Verhältnis von ABTS zu Kaliumperoxodisulfat einsetzen (7 mM ABTS zu 2,45 mM K₂S₂O₈ = 2.9 / 1), sondern das genaue Verhältnis von 2 zu 1, welches der Reaktionsgleichung von



entspricht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Peroxodisulfat ein zweiwertiges Oxidans ist. Einige Autoren scheinen mit einem Unterschuss von Kaliumperoxodisulfat gearbeitet zu haben, wahrscheinlich um Nebenreaktionen der Carotinoide mit nicht umgesetztem Oxidationsmittel zu vermeiden. Arbeitet man aber im wässrigen Medium mit exakter Stöchiometrie, ist durch das hohe Oxidationspotential des K₂S₂O₈ und der leichten Oxidierbarkeit des Farbstoffes sichergestellt, dass kein Peroxodisulfat im Ansatz zurückbleibt. Damit sind Nebenreaktionen von K₂S₂O₈ mit der zu testenden antioxidativen Substanz ausgeschlossen.

Mit einem Unterschuss an Peroxodisulfat provoziert man eine unvollständig ablaufende Oxidation. Durch die ungeradzahligsten Mengenverhältnisse wird das Gleichgewicht nicht vollständig zur Produktseite (ABTS^{•+}) verschoben und es bleibt nicht umgesetztes ABTS und nicht umgesetztes Peroxodisulfat zurück. Verwendet man nicht das genaue stöchiometrische Mengenverhältnis von 2:1, sondern das in der Literatur^[92,96] angegebene, führt dies zu:



Diese unvollständige Oxidation mit einer Ausbeute von etwa 50% an ABTS-Radikalkationen findet man auch experimentell (Abbildung 4.32). Für weitere Interpretationen sei damit angemerkt, dass in der verwendeten ABTS-Stammlösung nicht nur ABTS-Radikalkationen vorhanden sind, sondern auch (teils beträchtliche) Konzentrationen an nicht umgesetztem ABTS (Red).

4.4.1 Diskussion der Troloxreaktion im ABTS-Assay

In der weiteren Diskussion wird die Reaktion von ABTS-Radikalkationen mit der Referenzsubstanz Trolox untersucht. Um diese Reaktion und den Mechanismus aufzuklären, wurde das Gesamtspektrum während der gesamten Reaktion aufgenommen. Die UV-Vis-Spektren der Zugabe einer 5 μM Troloxlösung zur $\text{ABTS}^{+\cdot}$ -Stammlösung sind in der nachfolgenden Abbildung 4.33 gezeigt:

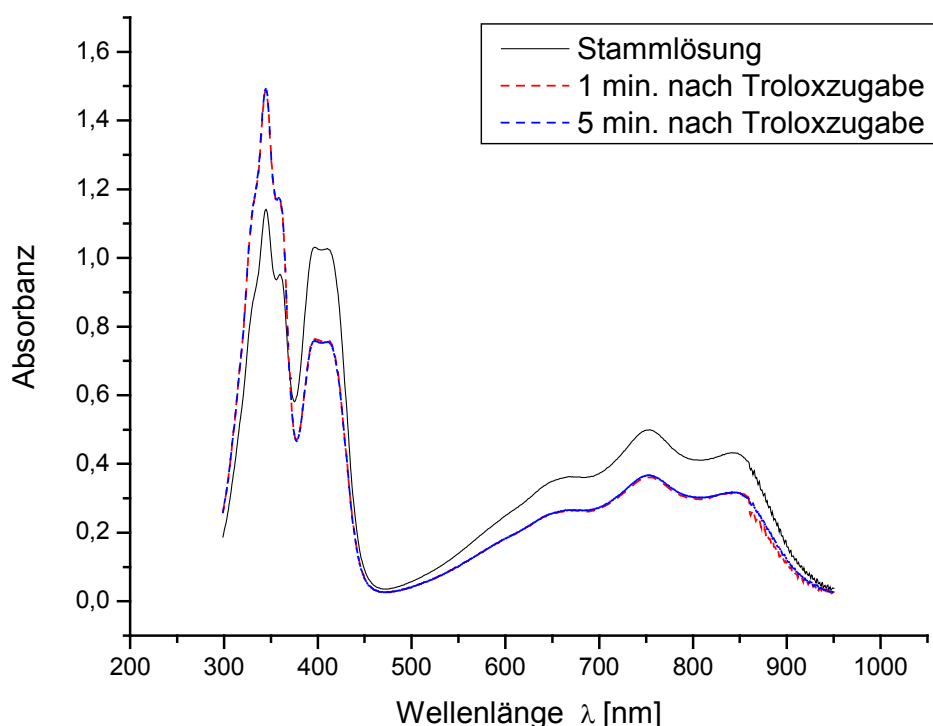


Abbildung 4.33: UV-Vis-Spektrum der $\text{ABTS}^{+\cdot}$ -Stammlösung nach Troloxzugabe. Die Abnahme ist schon nach einer Minute beendet.

Erneut zeigt sich eine sehr schnelle Umsetzung, wie auch in den UV-Vis-Messungen bei $\lambda = 734 \text{ nm}$ in der RAA(AUC)-Auswertung (z.B. Abbildung 4.2) gefunden. In Abbildung 4.33 erkennt man die schnelle Abnahme der Absorbanz an ABTS-Radikalkationen an mehreren Messwellenlängen (415 nm, 655 nm, 734 nm und 855 nm). Die Abnahme ist schon nach einer Minute beendet. Die Absorbanzkurven zeigen nach mehreren Minuten Reaktionszeit unveränderte Absorbanzen. Dies verdeutlicht, dass die Absorbanz von $\text{ABTS}^{+\cdot}$, nach einer anfänglich sehr schnellen Reaktion, im weiteren Verlauf nicht weiter abnimmt. Weiterhin kann man erkennen, dass der Absorptionspeak bei 345 nm ansteigt

und die Bildung von ABTS (Red) anzeigt. Für diesen Assay muss Trolox als ein „gutes“ Antioxidans eingestuft werden. Das Troloxmolekül besitzt ein geringeres Oxidationspotential und wird folglich sehr leicht und quantitativ von ABTS-Radikalkationen oxidiert. Dass eine Einelektronen-Übertragungsreaktion von Trolox auf $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (E_{01}) leicht möglich ist, zeigt der Vergleich des ABTS-Oxidationspotentials mit dem Trolox-Standardoxidationspotential:

Oxidationspotential Trolox/Trolox [•] (Hg/Hg ₂ Cl ₂ PBS pH=7) ^[103]	Oxidationspotential ABTS/ ABTS ^{•+} (Hg/Hg ₂ Cl ₂) ^[87]
$E_0 = 0.24 \text{ [V]}$	$E_{01} = 0.46 \text{ [V]}$

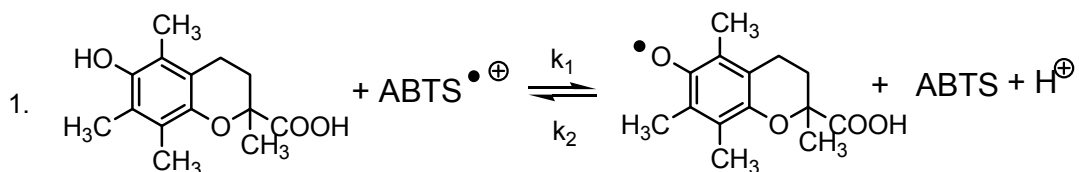
Wertet man die Absorbanzänderungen quantitativ aus, indem aus der zugegebenen Menge (μM) an Trolox mit der entsprechenden Konzentrationsverringernung (μM) an $\text{ABTS}^{\bullet+}$ korreliert wird, ergibt sich ein bemerkenswertes Ergebnis. Tabelle 4.41 zeigt die gemessenen $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Konzentrationen, welche nach Troloxyzugabe aus den Extinktionskoeffizienten berechnet wurden.

Tabelle 4.43: Berechnete $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Konzentrationen nach Troloxyzugabe

Zugabe an Trolox	Konzentrationsverringernung an $\text{ABTS}^{\bullet+}$
2.5 μM	0.9 μM
5 μM	8.1 μM
10 μM	15.4 μM
15 μM	30.8 μM
20 μM	43.5 μM

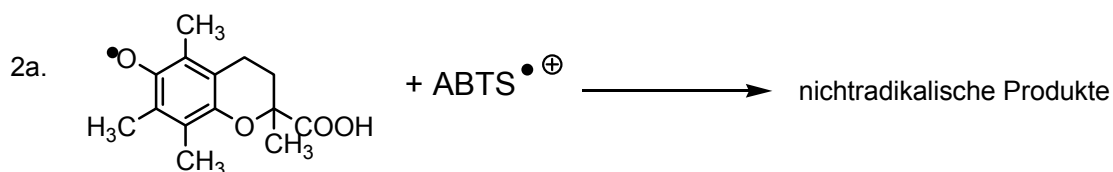
Man findet, insbesondere für die Troloxyzugaben größer 10 μM , eine annähernd doppelte so große Verringerung der ABTS-Radikalkationenkonzentration. Damit reagiert formal 1 Molekül Trolox mit 2 Molekülen $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Diese Ergebnis erhält man sowohl für die Zunahme an ABTS (Red), wie für die Abnahme an $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Sem). Da sich die jeweiligen Zunahmen und Abnahmen an Redoxfarbstoff gleichförmig verhalten können Nebenreaktionen, wie zum Beispiel eine Oxidation der Azinbindung^[104], z.B. durch Troloxylradikale, ausgeschlossen werden. Das stöchiometrische Reaktionsverhältnis von 2 mol $\text{ABTS}^{\bullet+}$ mit 1 mol Trolox deutet auf einen besonderen Reaktionsmechanismus hin. Die Reaktion

von ABTS-Radikalkationen mit Trolox, wird zunächst durch den als Reaktion 1 bezeichneten Ablauf beschrieben:



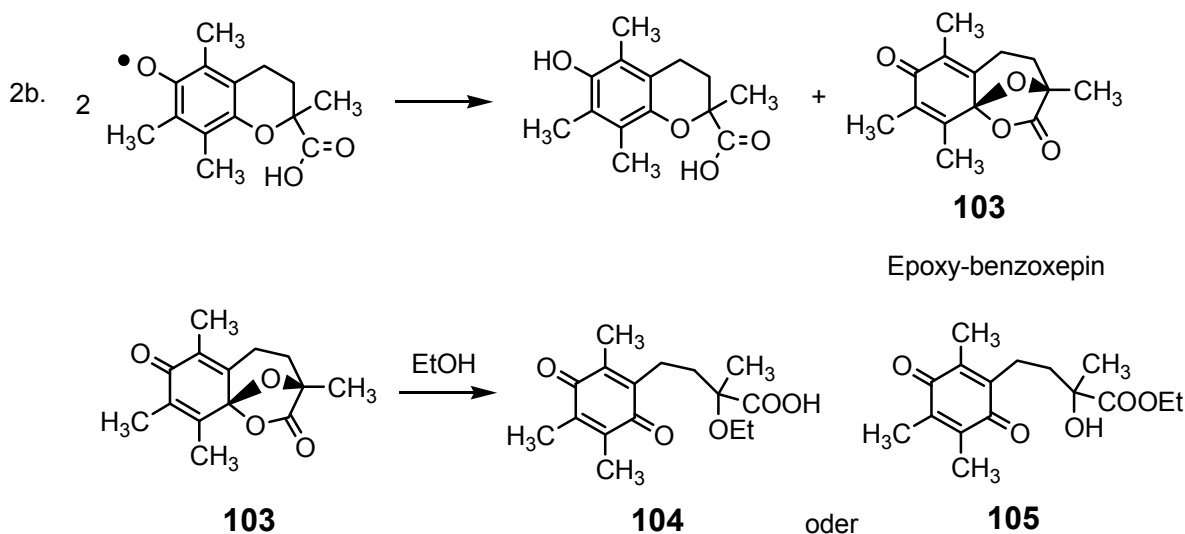
ABTS^{•+} oxidiert die Hydroxygruppe im Trolox, sodass unter Bildung von H⁺-Ionen, Troloxyldradikale gebildet werden. Da es sich bei der Oxidation um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, existiert nicht nur die Hinreaktion k₁ von ABTS^{•+} mit Trolox, sondern es gibt auch eine Rückreaktion mit k₂ von Troloxyldradikalen mit ABTS. Der Einfluss von k₂ auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist gering, da Trolox ein gutes Antioxidans mit niedrigem Redoxpotential (0.24 V) ist. Die Hinreaktion k₁ läuft damit sehr viel schneller ab als die Rückreaktion k₂. Nun muss die Reaktionsstöchiometrie von 2 mol ABTS^{•+} mit 1 mol Trolox in dieser Reaktion berücksichtigt werden.

Ein antioxidatives Verhalten ist häufig mit den Reaktionsprodukten der betreffenden Oxidation gekoppelt. Dies gilt auch für die antioxidativen Reaktionen von Trolox. Es zeigt sich, dass die reaktiven Troloxyldradikale für das stöchiometrische Reaktionsverhältnis verantwortlich sind. Entscheidend sind die Rekombinationsreaktionen der Troloxyldradikale. Sie können durch die beiden Reaktionen 2a. und 2b. beschrieben werden.



Die Reaktion 2a. entspricht der Rekombination eines ABTS-Radikals (Sem) mit einem Troloxyldradikal. Diese Reaktion würde die Stöchiometrie der Reaktion erfüllen, aber nicht die Bildung von ABTS (Red) erklären. Da es sich bei ABTS^{•+} um ein sehr stark delokalisiertes Radikal handelt, ist die Rekombination des Troloxyldradikals mit dem ABTS^{•+} eher unwahrscheinlich. Da die gemessene Konzentration an ABTS (Red) im selben Maß zunimmt, wie die ABTS^{•+}-Konzentration abnimmt, scheint es keine zusätzlichen Nebenreaktionen in Form dieser Rekombination zu geben.

Die Disproportionierung zweier Troloxyradikale (Reaktion 2b.) ist dagegen sehr viel wahrscheinlicher.



Diese Abbruchreaktion stellt eine Disproportionierungsreaktion von zwei Troloxyradikalen, zu einem Molekül Trolox und einem intermediären Molekül Trolox-epoxy-benzoxepin **103**^[105] dar. Das Epoxy-benzoxepin ist instabil und reagiert in ethanolischer Lösung direkt zu den Troloxchinonderivaten **104** oder **105**. Formal wird bei der Rekombination zweier Troloxyradikale ein mol Trolox zurückgewonnen:



Um die genauen Reaktionen für verschiedene Troloxkonzentrationen aufzuklären, hätten jedoch zeitaufgelöst Troloxreaktionsprodukte isoliert werden müssen.

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass das Trolox mit niedrigem Redoxpotential, schnell mit $\text{ABTS}^{\bullet+}$ abreagiert und das Gleichgewicht der Reaktion 1 auf die Produktseite verschiebt. Diese Reaktion wird unterstützt von der schnellen Disproportionierungsreaktion, welche ihrerseits für das kontinuierliche Abreagieren von Troloxyradikalen verantwortlich ist. Durch diese Reaktion wird die Gleichgewichtslage zusätzlich auf die rechte Seite verschoben. Es resultiert eine schnelle und ungehinderte Oxidation, welche erst bei vollständigem Verbrauch an Trolox stoppt.

4.4.2 Diskussion der Carotinoidreaktion im ABTS-Assay

Als nächstes werden die Reaktionen der Carotinoide mit ABTS-Radikalkationen UV-Vis-spektroskopisch untersucht. Es muss, wie schon bereits festgestellt, eine Fallunterscheidung zwischen Canthaxanthin und Astaxanthin, und den übrigen Carotinoiden gemacht werden. Es sei darauf hingewiesen, dass alle Absorbanzabnahmen der Carotinoide über UV-Vis-Spektren bestimmt wurden. Da beim Vergleich mit den RAA(AUC)-Literaturdaten (Abbildung 4.31) Zeaxanthin die größte Abweichung zeigt, soll Zeaxanthin stellvertretend diskutiert werden. Qualitativ beschreiben β -Carotin, Cryptoxanthin, Lycopin und Lutein sehr ähnliche Absorbanzabnahmen. Die nachfolgende Abbildung 4.34 zeigt die verschiedenen UV-Vis-Spektren nach Zugabe einer 5 μ M Zeaxanthinlösung zur ABTS^{•+}-Stammlösung:

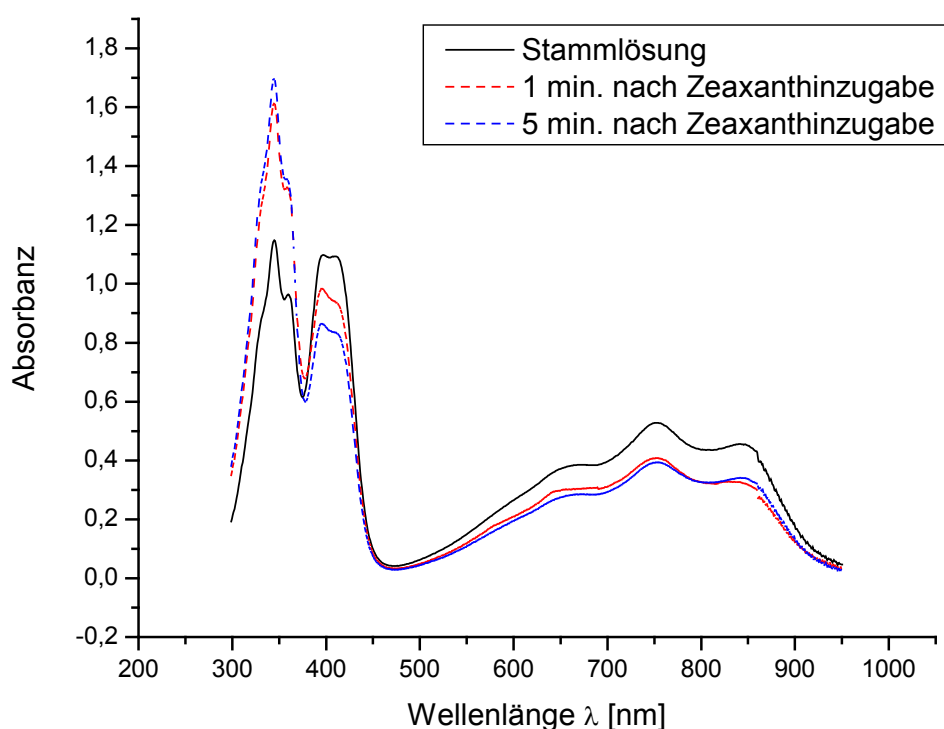


Abbildung 4.34: Stammlösung nach Zeaxanthinzugabe

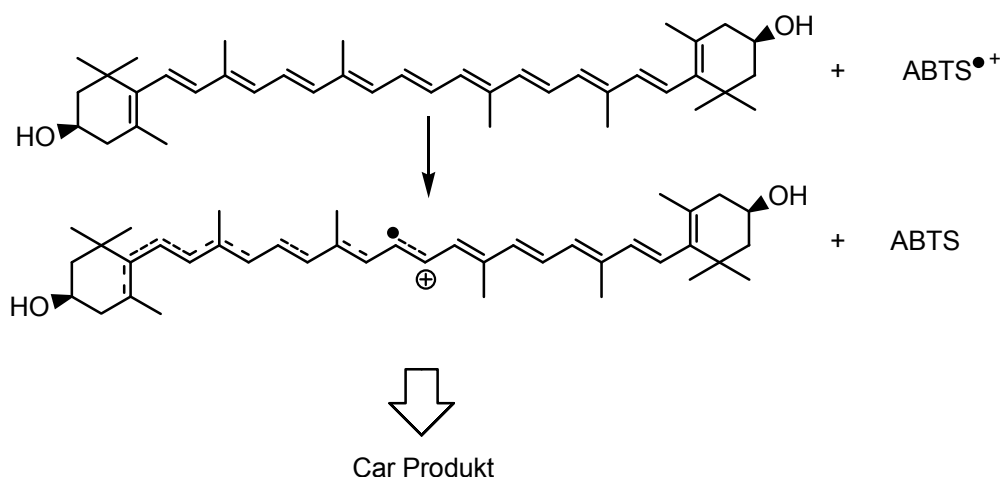
Es zeigt sich, dass bei Zugabe von Zeaxanthin eine sehr schnelle Reaktion stattfindet. Man erkennt die rasche Abnahme der Absorbanz des ABTS-Radikalkations (655 nm, 734 nm und 855 nm). Die Reaktion des Zeaxanthins ist nach einer Minute nahezu beendet. Auch die Bildung von ABTS (Red) wird

durch den Anstieg des Peaks bei 345 nm angezeigt. Eine genaue Analyse der UV-Vis-Daten von Zeaxanthin zeigt die nachfolgende Tabelle, in welcher die Konzentrationsverringernug von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (μM) nach Zugabe von Zeaxanthin (μM) dargestellt ist:

Tabelle 4.44: Berechnete $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Konzentrationen nach Zeaxanthinzugabe

Zugabe an Zeaxanthin	Berechnete Konzentrationsverringernug an $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($\lambda=734\text{ nm}$)
2.5 μM	2.25 $\mu\text{M} \pm 0.25$
5 μM	4.41 $\mu\text{M} \pm 0.58$
10 μM	7.79 $\mu\text{M} \pm 0.64$
20 μM	15.00 $\mu\text{M} \pm 2.24$

Für kleine Carotinoidzugaben erhält man ein Reaktionsverhältnis von etwa einem Mol $\text{ABTS}^{\bullet+}$ mit einem Mol Carotinoid. Für höhere Carotinoidzugaben verringert sich das Reaktionsverhältnis auf etwa $\frac{3}{4}$ Mol $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pro Mol Carotinoid. Diese Abweichung kann am besten über die Bildung von reaktiven Carotinoidabbauprodukten beschrieben werden. Zunächst wird das Carotinoid zum Carotinoidradikalkation oxidiert:



Bei hohen Carotinoidkonzentrationen im Assay können verstärkt Abbaureaktionen zwischen den Carotinoiden auftreten, da die intermediären Konzentrationen an Carotinoidradikalkationen (oder ihren radikalischen Abbauprodukten) hoch sind. Dies könnte auch das Abweichen von einem

linearen Konzentrationsverhalten, in den Graphen zur Steigungsbestimmung der Absorbanzabnahmen in % gegen verschiedene Konzentrationen an Carotinoid, erklären. Weitere Carotinoidverluste können durch die Verwendung von nicht entgastem Lösungsmitteln entstehen. Der in diesen Lösungen enthaltene Sauerstoff kann mit Carotinoidradikalen einen zusätzlichen peroxidischen Carotinoidabbau induzieren. Damit sollten die im ABTS-Assay verwendeten Carotinoidzugaben nicht zu groß sein. Sie sollten in einem Konzentrationsbereich von 1 μM bis 10 μM gemessen werden.

Für Zeaxanthin wurden UV-Vis-time-drive Messungen durchgeführt. Dabei wurden $\text{ABTS}^{•+}$ -Absorbanzabnahmen mit einer Aufnahmeabfolge von jeweils einer 1/10 Sekunde, bei der Messwellenlänge 734 nm, gemessen. Es zeigte sich, dass die Oxidation von Zeaxanthin oberhalb dieser gerätebegrenzten Zeitauflösung stattfindet. Damit müssen die Reaktionsgeschwindigkeiten der Carotinoidoxidation Werte von $> 10^4 \text{ mol l}^{-1}\text{s}^{-1}$ besitzen. Durch diese sehr schnelle Oxidationsreaktion wird eine genaue mechanistische Interpretation der Reaktion erschwert.

Das Ausmaß der Oxidation von Carotinoiden durch $\text{ABTS}^{•+}$ lässt sich am besten durch die Standardoxidationspotentiale der eingesetzten Carotinoide bestimmen. Die bekannten Oxidationspotentiale der Carotinoide, zusammen mit der Referenzverbindung Trolox, sind in der folgenden Tabelle 4.45 aufgelistet.

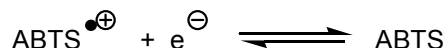
Tabelle 4.45: Redoxpotentiale der verwendeten Antioxidantien

Substanz	Redoxpotential	Oxidation durch $\text{ABTS}^{•+}$ ($\approx 0.68\text{V}$)	RAA(AUC)-Wert [4 Min.]
Trolox ^[103]	0.24 V (SCE, PBS)	Gut geeignet	1.00 (Ref.)
Lycopin ^[106]	0.51 V [*] (Hg/Hg ₂ Cl ₂)	geeignet	2.59
β -Carotin ^[107,108]	0.54 V [*] (Ag/AgCl)	geeignet	1.78
Cryptoxanthin ^[106]	0.56 V [*] (Hg/Hg ₂ Cl ₂)	geeignet	1.45
Lutein	-	geeignet	1.42
Zeaxanthin ^[109]	0.63 V [*] (Ag/AgCl)	geeignet	0.79

* = Die Carotinoid-Redoxpotentiale korrigiert um das Potential der Referenzelektroden Ag/AgCl gesätt. (E = 0.198 V) oder Hg/Hg₂Cl₂ gesätt. (E = 0.241V).

Ähnlich dem Trolox können die Carotinoide, welche ein geringeres Redoxpotential besitzen, also keine Carbonylsubstituenten in 4- und 4'-Position tragen, leicht ABTS-Radikalkationen reduzieren.

Das Redoxpotential der ABTS^{•+}-Reaktion,



ist literaturbekannt. Die Potentiale sind in der folgenden Tabelle 4.46 aufgelistet.

Tabelle 4.46: Literatur Redoxpotentiale des Systems ABTS^{•+} + e⁻ / ABTS

ABTS ^{•+} /ABTS	Redox- potential	Referenzelektrode (Potentiale unkorrigiert)	Lösungsmittel
Espenson ^[110]	0.68 V	NHE	Acetat-Puffer pH = 4.9
Janata ^[104]	0.55 V	Ag/AgCl sat. (E = 0.198 V)	CH ₃ CN/H ₂ O (3:1)
Hünig ^[87]	0.46 V	Hg/Hg ₂ Cl ₂ sat. (E = 0.241V)	GME*/H ₂ O (1:1)

*GME = Glykoldimethyläther

Dabei zeigt sich ein Standardredoxpotential (NHE) von etwa 0.7 V für das ABTS^{•+} /ABTS System. Es ergeben sich geringe Unterschiede, da alle Standard-redoxpotentiale in verschiedenen Reaktionsmedien gemessen worden sind. Ein Standardredoxpotential in wässrig-ethanolischer Lösung wurde nicht bestimmt. Als Diskussionsgrundlage wird daher das Potential von 0.68 V vs. NHE angenommen.

Die Standardredoxpotentiale von Canthaxanthin und Astaxanthin betragen 0.69 V und 0.75 V (siehe Tabelle 4.47). Diese liegen damit oberhalb, beziehungsweise knapp unterhalb einer möglichen Oxidation durch ABTS^{•+}.

Tabelle 4.47: Redoxpotentiale von Canthaxanthin und Astaxanthin

Carotinoid	Oxidationspotential	Oxidation durch ABTS ^{•+} (≈ 0.68V)	RAA(AUC)- Wert [4 Min]
Canthaxanthin ^[106]	0.69 V * (Hg/Hg ₂ Cl ₂)	ungeeignet	(0.61)*
Astaxanthin ^[107,109]	0.75 V * (Ag/AgCl)	ungeeignet	(0.49)*

* = Die Carotinoid-Redoxpotentiale korrigiert um das Potential der Referenzelektroden Ag/AgCl gesätt. (E = 0.198 V) oder Hg/Hg₂Cl₂ gesätt. (E = 0.241V).

Damit ist es dem $\text{ABTS}^{\circ+}$ -Radikalkation nicht möglich Astaxanthin zu oxidieren. Canthaxanthin ist ein Grenzfall. Die Differenz der Standardpotentiale von Canthaxanthin und $\text{ABTS}^{\circ+}$ beträgt nur 0.1 V. Es ist aber davon auszugehen, dass auch eine Canthaxanthinoxidation nicht, oder nur sehr schwer möglich ist. Nicht in Diskussion einbezogen sind hier Lösungsmittelleffekte der Carotinoid-redoxpotentiale für wässrig-ethanolische Lösungen. Durch die schlechte Löslichkeit der Carotinoide in wässrig-ethanolischen Medien sollte die $\text{ABTS}^{\circ+}$ -Oxidation zusätzlich erschwert werden.

Trägt man die RAA(AUC)-Werte gegen die Carotinoid-Redoxpotentiale auf zeigt sich auch graphisch ganz deutlich, dass zwischen den Carotinoiden: Lycopin, β -Carotin, Cryptoxanthin, Zeaxanthin und den Carotinoiden Astaxanthin und Canthaxanthin eine Fallunterscheidung gemacht werden muss:

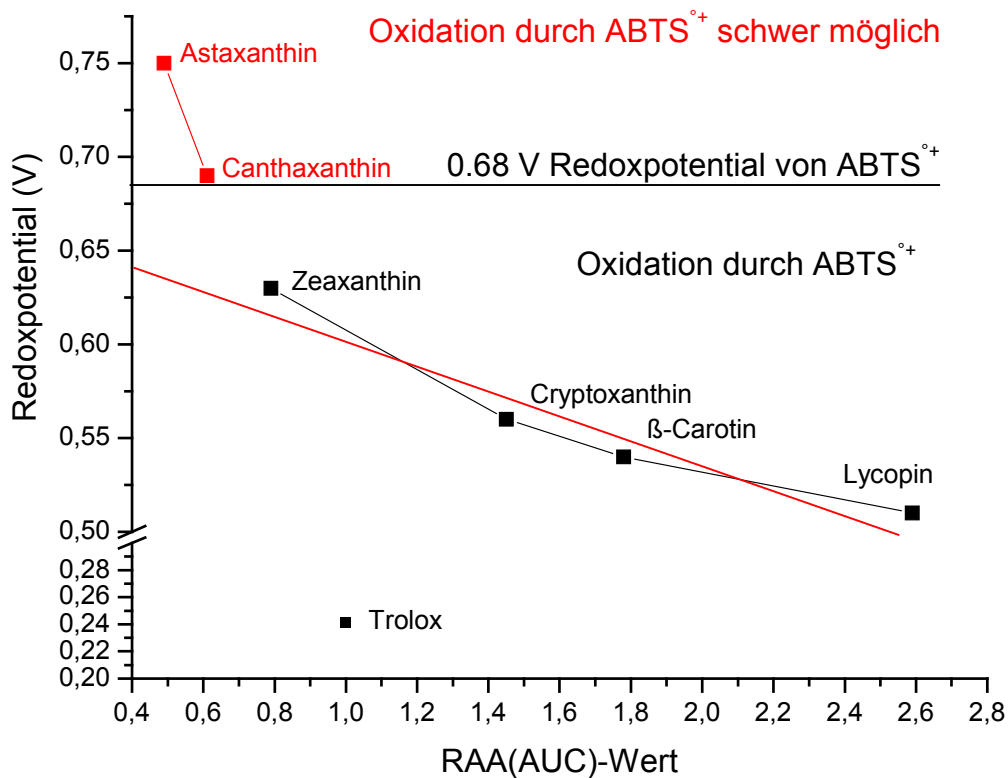


Abbildung 4.35: Redoxpotentiale Carotinoide gegen RAA(AUC)

Mit: Trolox = 0.24 V (SCE, PBS pH=7)^[103], Lycopin = 0.51 V (SCE, CH_2Cl_2)^[106], β -Carotin = 0.54 (Ag/AgCl, CH_2Cl_2)^[107,108], Cryptoxanthin = 0.56 V (SCE, CH_2Cl_2)^[106], Zeaxanthin = 0.63 V (Ag/AgCl, CH_2Cl_2)^[107], Canthaxanthin = 0.69 V (SCE, CH_2Cl_2)^[106], Astaxanthin 0.75 V (Ag/AgCl, CH_2Cl_2)^[107,109]

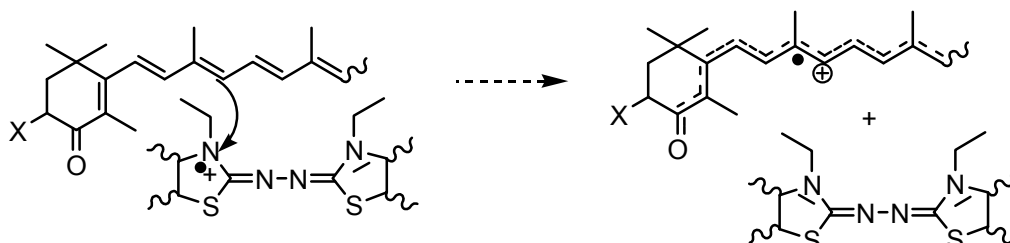
Während die Korrelation der Carotinoide mit einem Redoxpotential kleiner 0.68 V annähernd linear ist (Steigung $-6.52 \cdot 10^{-2}$, $r=0.959$) gibt es eine deutliche Unterbrechung zu Canthaxanthin und Astaxanthin mit Redoxpotentialen größer 0.68 V. Die Abbildung 4.35 zeigt zudem die exponierte Position der Referenzsubstanz Trolox. Trotz des geringen Oxidationspotentials und der guten Wasserlöslichkeit besitzt Trolox einen RAA(AUC)-Wert von 1.0 (Referenz). Dieser RAA(AUC)-Wert ist im Vergleich zu schlecht wasserlöslichen Carotinoiden im Assay deutlich zu niedrig festgelegt. Unberücksichtigt bleibt hier die Reaktionsstöchiometrie bei Trolox, welche in den Messwerten enthalten ist, aber nicht in der RAA(AUC)-Auswertung berücksichtigt wird. Dies ist umso mehr von Bedeutung, weil Trolox als Referenzsubstanz im Assay dient und alle Carotinoid-Flächenwerte auf den Trolox-Flächenwert bezogen werden. Ebenso unberücksichtigt bleibt die völlig andere Reaktionsweise und chemische Natur von Trolox, im Gegensatz zu den Carotinoiden.

Für die Carotinoide Lycopin, β -Carotin, Cryptoxanthin und Zeaxanthin erhält man eine recht gute Korrelation zwischen Redoxpotential und „antioxidativen“ Verhalten. Mit steigender Anzahl der Doppelbindungen wird eine Einelektronen-Oxidation leichter. Die Reaktion mit ABTS-Radikalkationen ist leicht möglich. Lycopin mit 11 konjugierten Doppelbindungen (lineare Struktur ohne Cyclohexenringe) besitzt das niedrigste Redoxpotential aller hier gezeigten Carotinoide und somit den höchsten RAA(AUC)-Wert. β -Carotin besitzt ebenfalls 11 konjugierte Doppelbindungen. Zwei der 11 Doppelbindungen liegen im β -Carotin in verdreht angeordneten Cyclohexenringen. Diese Doppelbindungen leisten nicht den vollen elektronischen Beitrag einer Ketten-Doppelbindung. Folglich hat β -Carotin ein etwas höheres Oxidationspotential und besitzt den kleineren RAA(AUC)-Wert. Lutein mit 10 Doppelbindungen besitzt einen kleineren RAA(AUC)-Wert als β -Carotin. Da das genaue Redoxpotential von Lutein nicht bekannt ist, können auch keine exakten Aussagen darüber gemacht werden, ob sich das Lutein und sein zugehöriger RAA(AUC)-Wert in die obige (annähernd) lineare Abhängigkeit der Abbildung 4.35 einfügt.

Man kann den Einfluss verschiedener funktioneller Gruppen im Carotinoidmolekül im ABTS-Assay interpretieren. Der Einfluss von Carbonylgruppen ist leicht verständlich. Carbonylgruppen in 4- und 4'-Position

stehen in direkter Verbindung zum carotinoidischen Polyensystem, dadurch wird die Polyenkette zwar verlängert, aber durch den starken – I-Effekt der Sauerstoffatome wird Elektronendichte aus der Kette abgezogen, sodass carbonylhaltige Carotinoide höhere Redoxpotentiale besitzen.

hohes Oxidationspotential-langsame Reaktion



Der Einfluss von Hydroxylgruppen in Carotinoiden ist dagegen schwieriger zu interpretieren. Die Hydroxylgruppen in den Carotinoiden sind von der Polyenkette isoliert angeordnet. Dadurch sollte sich kein elektronischer Effekt zeigen und auch keine Veränderung des carotinoidischen Oxidationspotentials ergeben. Es zeigt sich aber, dass Cryptoxanthin, Lutein und besonders Zeaxanthin deutlich kleinere RAA(AUC)-Werte besitzen als β -Carotin (bei gleicher Anzahl der Doppelbindungen).

Tabelle 4.48: Vergleich Kettenlänge und RAA(AUC)-Wert

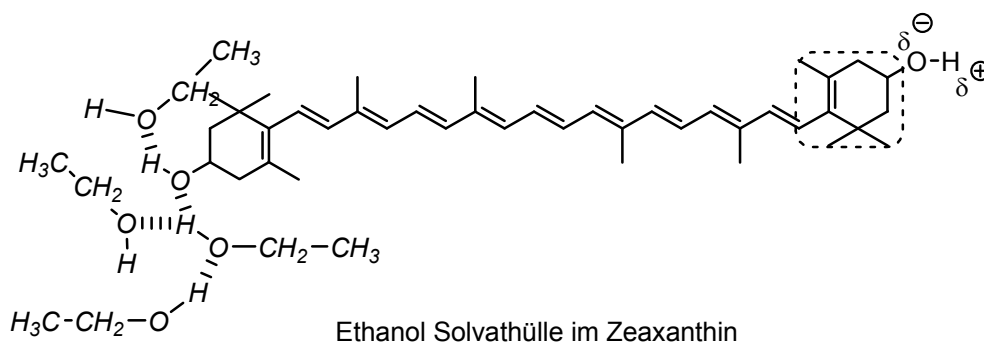
Carotinoid	Anzahl der Doppelbindungen	Anzahl der Hydroxygruppen	RAA(AUC)-Wert
Lutein	10	2	1.42
Cryptoxanthin	11	1	1.45
Zeaxanthin	11	2	0.79

Das schlechtere reduktive Verhalten der hydroxygruppentragenden Carotinoide kann über unterschiedliche Solvatisierungseigenschaften erklärt werden. Weil reine Kohlenwasserstoff-Carotinoide im Standardlösungsmittel Ethanol/Wasser eine wenig ausgeprägte Solvathülle besitzen, können die ABTS-Radikalkationen relativ leicht zu dem Polyensystem vordringen. Der Eielektronentransfer mit ABTS-Radikalkationen findet rasch statt.

Im Falle der polaren Hydroxycarotinoide liegen andere Solvatationseigenschaften vor. Die polaren Hydroxygruppen können über Wasserstoffbrückenbindungen eine Ethanol/Wasser-Solvathülle um die

Cyclohexenringe ausbilden. Sind diese intramolekularen Wechselwirkungen stark genug, können sogar Teile des Polyensystems „maskiert“ werden.

So lässt sich auch ein unterschiedliches Verhalten zwischen Zeaxanthin und Cryptoxanthin deuten. Zeaxanthin besitzt, im Gegensatz zu Cryptoxanthin, zwei Cyclohexenringe, welche mit Hydroxylgruppen substituiert sind. Damit kann Zeaxanthin an beiden Polykettenenden Solvathüllen aufbauen, welche vor Oxidation schützen. Auch die unterschiedlichen Reaktivitäten zwischen Zeaxanthin und Lutein lassen sich auf diese Weise deuten. Im Zeaxanthin liegen die Doppelbindungen der beiden Cyclohexenringe in direkter Konjugation zum Polyensystem. Beide Cyclohexenringe sind zu etwa 50° aus der Polykettenenebene herausgedreht.



Das Lutein besitzt nur einen Cyclohexenring mit einer Doppelbindung in direkter Konjugation zur Polykette. Im anderen Cyclohexenring entsteht am Carotinoid-Kohlenstoffatom 6 eine freie Drehbarkeit des Cyclohexenrings um die Polykette.

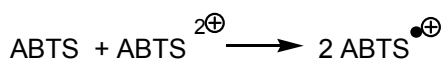
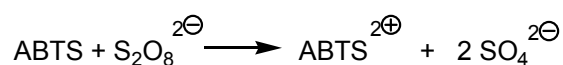
Prinzipiell muss hier aber gesagt werden, dass sich der ABTS-Assay besonders für wasserlösliche Antioxidantien eignet. Für die Messungen von wasserunlöslichen Carotinoiden ist der Assay, zumindest nach der Rice-Evans-Methode, nicht sehr geeignet. Die obigen Interpretationen der Hydroxycarotinoide [0]bleiben zum Teil recht spekulativ.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, sollen zwei alternative Assaymethoden vorgeschlagen werden, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnten.

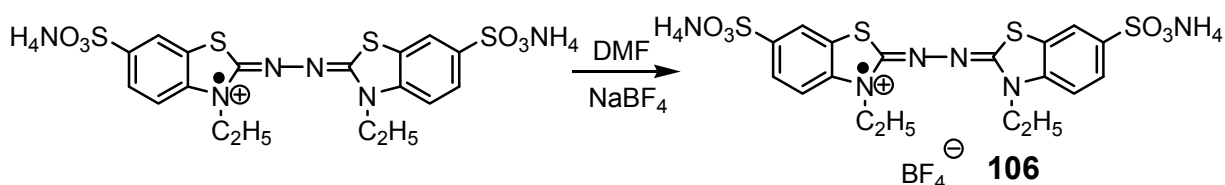
So könnten die ABTS-Radikalkationen in einer Oxidationsreaktion direkt als Radikalsalze dargestellt werden. Das Radikalsalz kann in ein Lösungsmittel eingebracht werden, in dem auch die Carotinoide sehr gut löslich sind (z.B.

Methylenchlorid). Ein allgemeine Versuchsvorschrift um das ABTS-Radikalsalz darzustellen, soll kurz dargestellt werden:

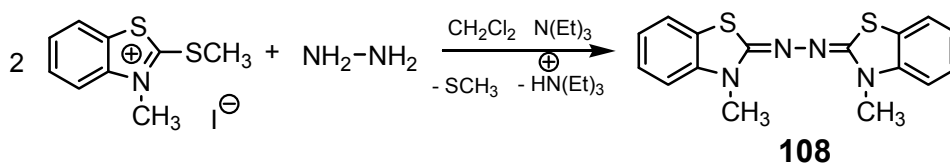
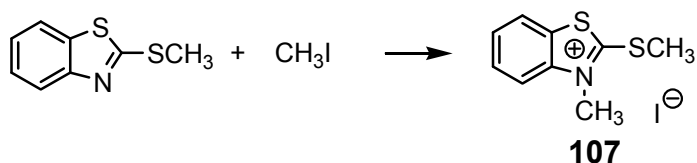
Das ABTS (Red) wird in Dimethylformamid vorgelegt. Um den ABTS-Farbstoff vollständig zu lösen, genügt kurze Erwärmung auf dem Wasserbad. Dann wird die Lösung mit Peroxodisulfat versetzt und mehrfach geschüttelt. Aus der intensiv blaugrün-violett gefärbten Lösung kann das Radikal mit Natriumtetrafluoroborat nahezu quantitativ als stabiles Radikalsalz **106** ausgefällt werden. Die Ausbeute dieser Reaktion liegt bei 78% der Theorie. Der spektroskopisch festgestellte Radikalgehalt von **106** liegt dann bei 95 % ± 3%.



V9



Ein zweiter Weg wäre die Synthese eines weniger wasserlöslichen ABTS-Derivates. So wurde von Silber^[111] aus unserem Arbeitskreis ein heterocyclisches Immoniumsalz **107** dargestellt, um Cyaninfarbstoffe zu synthetisieren. Das entsprechende Aza-Cyanin **108** ließe sich leicht und in guten Ausbeuten in einer Umsetzung mit Hydrazin gewinnen. Erleichtert wird der Angriff von Hydrazin durch das positiviert Kohlenstoffatom der Imingruppe und der guten nucleofugen Abgangsgruppe –SCH₃ im Iminiumsalz **107**.



4.4.3 Diskussion von Cantha- und Astaxanthin im ABTS-Assay

Im folgenden soll die Reaktion von Canthaxanthin mit ABTS-Radikalkationen untersucht werden. Die Abbildung 4.36 zeigt die aufgenommenen UV-Vis-Spektren nach Zugabe einer 20 μM Canthaxanthinlösung zur ABTS^{•+}-Stammlösung:

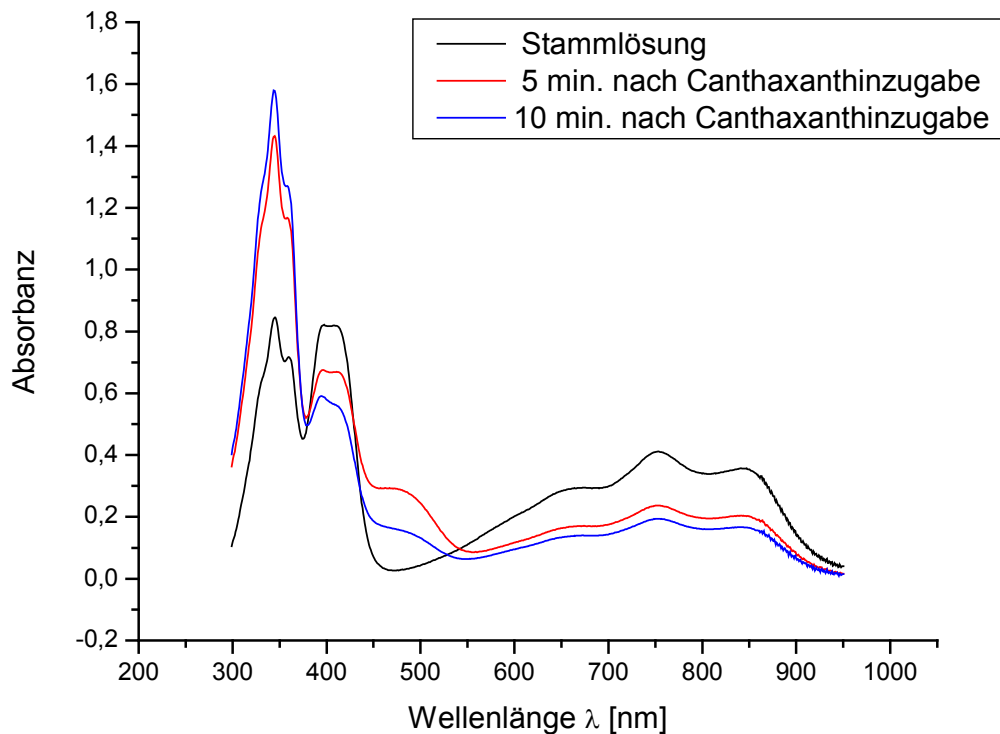


Abbildung 4.36: Stammlösung (keine Absorbanz bei 472 nm) und nach Canthaxanthinzugabe

Es zeigt sich, dass bei Zugabe von Canthaxanthin eine langsame Reaktion von Carotinoid mit ABTS^{•+} stattfindet. Man erkennt die sukzessive Abnahme der Absorbanz des ABTS-Radikalkations (415 nm, 655 nm, 734 nm und 855 nm). Im Gegensatz zu den leicht oxidierbaren Carotinoiden ist die Reaktion nicht nach einer Minute beendet. Die einzelnen Absorbanzkurven sind nach mehreren Minuten Reaktionszeit noch deutlich voneinander verschieden. Die Bildung von ABTS (Red), zeigt der Anstieg des Peaks bei 345 nm. Das geringere Reaktionsverhalten von Canthaxanthin und Astaxanthin lässt sich über ihre sehr hohen Oxidationspotentiale^[106,109] erklären. Der Einelektronen-Übergang ist für Oxocarotinoide nicht möglich oder stark erschwert. Canthaxanthin bietet nun noch die Möglichkeit, aufgrund seines

Absorptionsmaximums bei 472 nm, die Canthaxanthinabnahme selbst zu verfolgen. Für die zuvor besprochenen Carotinoide ist dies nicht möglich, da ihre Absorptionen durch den ABTS-Radikalkationenpeak bei 415 nm überlagert werden. Die Abbildungen 4.37 und 4.38 zeigen die UV-Vis-spektroskopisch bestimmte Canthaxanthin- und die ABTS-Radikalkationenabnahme.

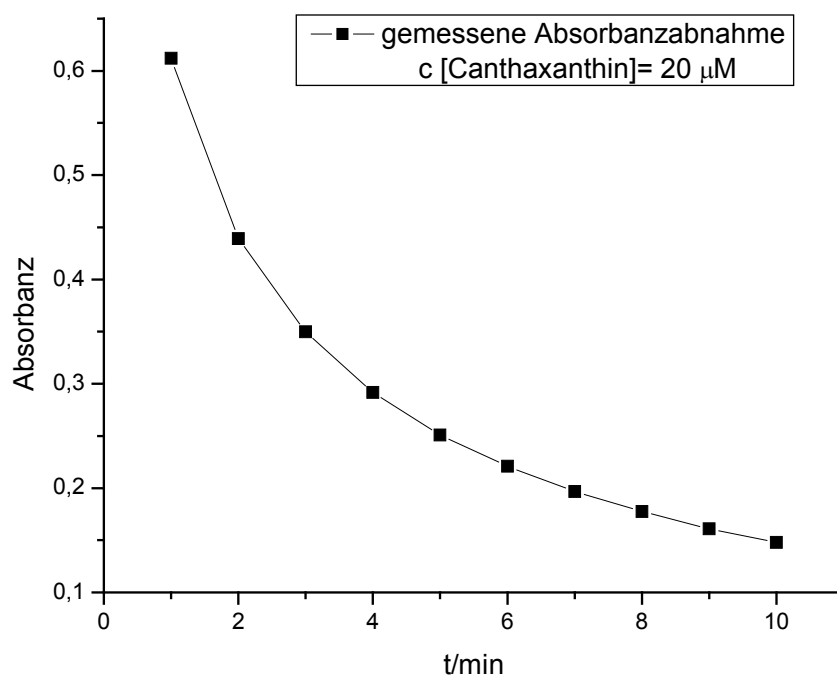


Abbildung 4.37: Abnahme der Canthaxanthin-Absorbanz im Assay

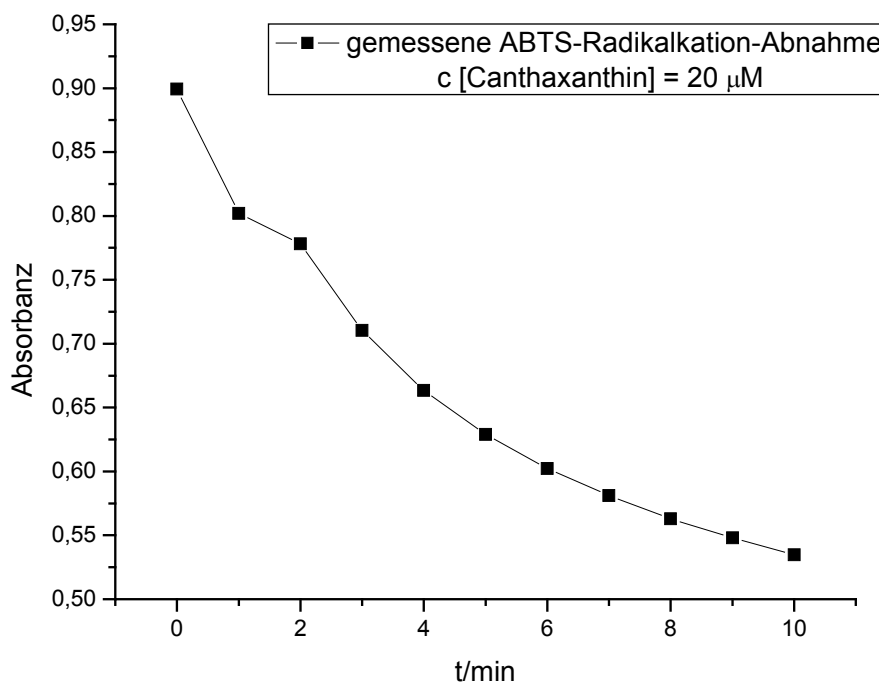


Abbildung 4.38: Abnahme der ABTS^{•+}-Absorbanz nach Canthaxanthinzugabe

Die gefundene Abnahmekurve für Canthaxanthin beschreibt eine Abnahmekurve für eine Reaktionen zweiter Ordnung. Auch der Graph der ABTS-Radikalkationenabnahme beschreibt ebenfalls eine Abnahmekurve zweiter Ordnung. Um die Reaktionsordnung zu überprüfen, wurde die Reaktionsordnung mit Hilfe der Powell'schen Methode bestimmt^[112].

$$k t = \frac{1}{(n-1)} \left(\frac{1}{c^{n-1}} - \frac{1}{c_0^{n-1}} \right)$$

$$(n-1) \underbrace{c_0^{n-1} k t}_{\text{reduzierte Zeit } \tau} = \left(\frac{c_0}{c} \right)^{n-1} - 1$$

Für eine Reaktion zweiter Ordnung erhält man mit:

$$\tau = \frac{c_0}{c} - 1 \quad \text{und} \quad \alpha = \frac{\text{Absorbanz } A}{\text{Ausgangsabsorbanz } A_0}$$

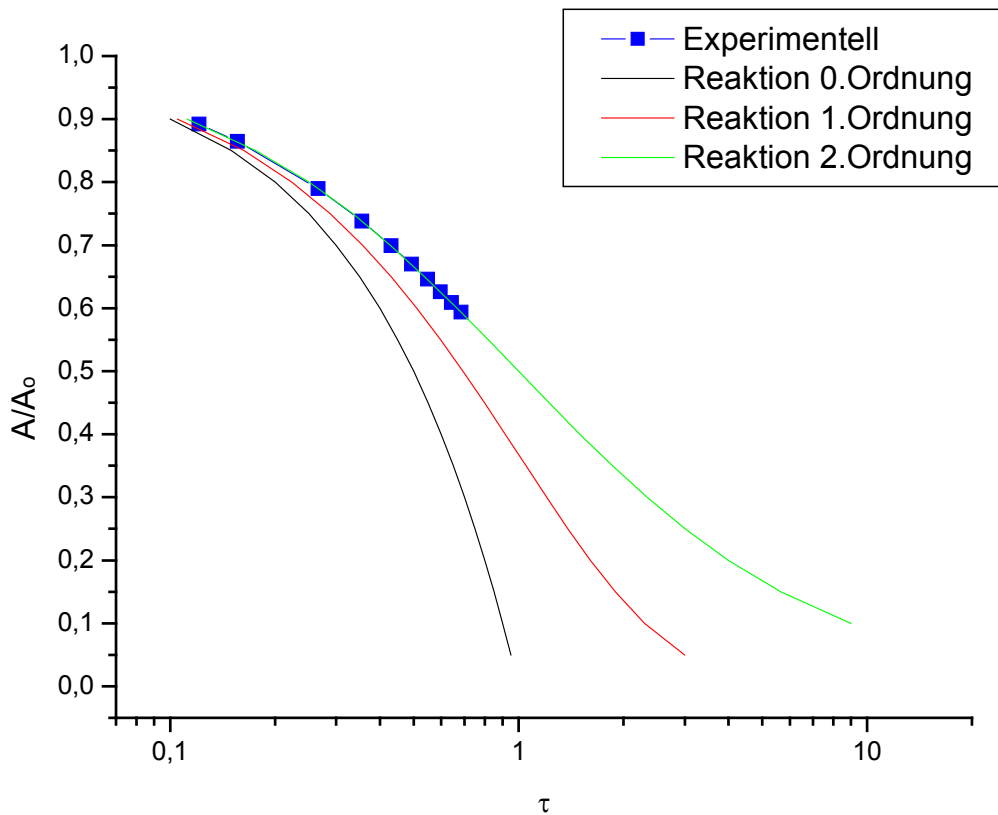


Abbildung 4.39: Verschiedene Powell Auftragungen der Canthaxanthin-Absorbanzänderung gegen die logarithmierte reduzierte Zeit τ

Tabelle 4.49: Wertetabelle der theoretischen Daten (erste und zweite Ordnung) und der Absorbanzänderungen (exp. Ordnung) für die Berechnung der Powell-Darstellung in Abbildung 4.39

A/Ao	τ (erste Ordnung)	A/Ao	τ (zweite Ordnung)	A/Ao	τ (exp. Ordnung)
0,9	0,105	0,9	0,112	0,892	0,121
0,85	0,163	0,85	0,176	0,865	0,156
0,8	0,223	0,8	0,25	0,79	0,266
0,75	0,288	0,75	0,334	0,738	0,355
0,7	0,357	0,7	0,429	0,699	0,431
0,65	0,431	0,65	0,538	0,67	0,493
0,6	0,511	0,6	0,667	0,646	0,548
0,55	0,598	0,55	0,818	0,626	0,597
0,5	0,693	0,5	1	0,609	0,642
0,45	0,799	0,45	1,223	0,594	0,684
0,4	0,916	0,4	1,5	-	-
0,35	1,05	0,35	1,857	-	-
0,3	1,204	0,3	2,334	-	-
0,25	1,386	0,25	3	-	-
0,2	1,609	0,2	4	-	-
0,15	1,897	0,15	5,667	-	-
0,1	2,303	0,1	9	-	-

Man erkennt, dass die aufgetragenen Canthaxanthin-Messwerte nur mit der Powell'schen Auftragung für eine Reaktion zweiter Ordnung korrelieren.

Es wurde versucht, mit Hilfe der Halbwertszeitmethode die Geschwindigkeitskonstante k und die Geschwindigkeit der Reaktion von Canthaxanthin mit ABTS^{•+} aus den Messwerten zu bestimmen (Abbildung 4.40 und Wertetabelle 4.50).

Tabelle 4.50: Wertetabelle der Konzentrationsänderungen zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k

Konzentration Canthaxanthin (mol/l)	Kehrwert Konzentration 1/Canthaxanthin (l/mol)	Halbwertszeit in Sekunden (s)
$4,93 \cdot 10^{-6}$	202810	225
$3,54 \cdot 10^{-6}$	282623	355
$2,82 \cdot 10^{-6}$	354774	495

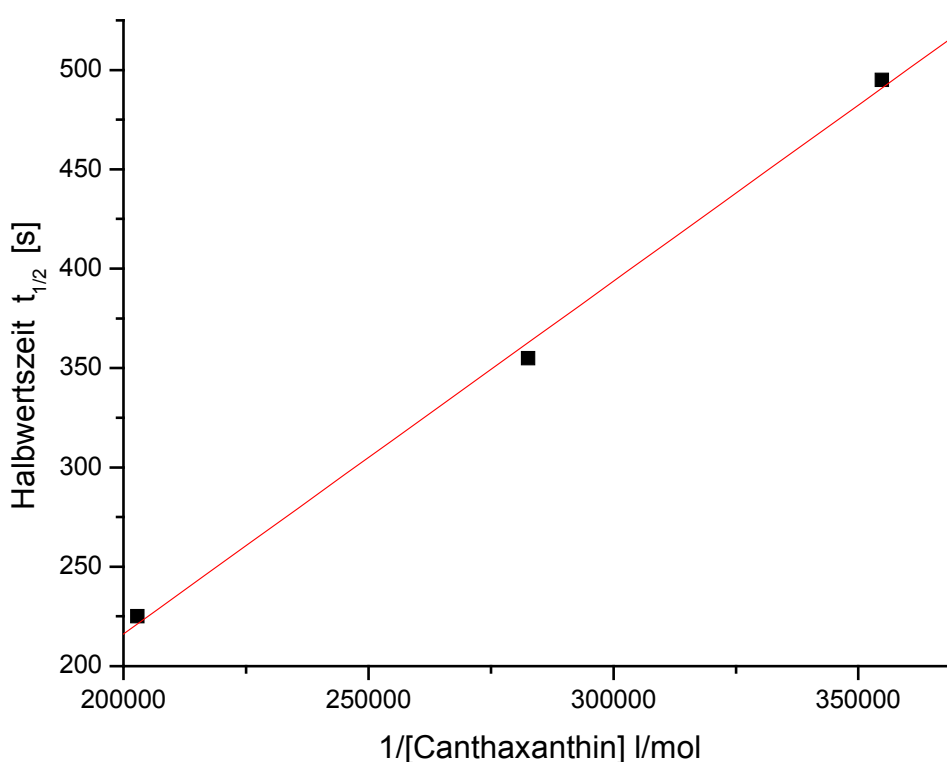


Abbildung 4.40: Canthaxanthin Halbwertszeitauftragung aus dem ABTS-Assay

Aus der Abbildung 4.40 ergibt sich eine Gerade, für die man eine Steigung von $1.77 \cdot 10^{-3}$ ablesen kann. Damit erhält man für k:

$$k = (1/1.77 \cdot 10^{-3}) \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1} = 565 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Damit sind die Geschwindigkeiten der Oxidation von Oxocarotinoiden mit ABTS^{++} deutlich geringer als die Oxidationsreaktionen von Trolox und der anderen Carotinoide. Schon die Absorbanzabnahmekurven verdeutlichten die langsamere Reaktion von Canthaxanthin und auch von Astaxanthin. Für beide Carotinoide wäre ein anderer Reaktionsmechanismus mit ABTS^{++} denkbar.

4.4.4 Abschließende Diskussion des ABTS-Assays

Wie schon erwähnt, zeigen die TEAC- bzw. RAA(AUC)-Werte beim Vergleich mit der Literatur deutliche Abweichungen. Neben den bisher genannten „mechanistischen“ Gründen gibt es weitere Aspekte um Abweichungen zu erklären. Es geht dabei um die Vielzahl der angewendeten Reaktionsbedingungen der durchgeführten TEAC/RAA(AUC)-Assays.

Um die einzelnen TEAC/RAA(AUC)-Werte besser vergleichen zu können, wäre es erforderlich, ein *standardisiertes* Verfahren durchzuführen. Neben den bereits diskutierten Assay-Bedingungen sind besonders die folgenden Reaktionsbedingungen zu beachten:

- Das genaue Konzentrationsverhältnis der Stammlösung (nicht umgesetztes ABTS zu ABTS^{•+})

Wenn der ABTS-Assay nach der Rice-Evans-Methode^[96] durchgeführt wird, gelangt man zu einem etwa 50-prozentigem Umsatz an ABTS. Es ist zu beachten, dass die Konzentration von nicht umgesetztem ABTS in der Stammlösung möglichst gering ist. Insbesondere bei den langsam verlaufenden Reaktionen ist durch nicht umgesetztes ABTS (Red) mit Auswirkungen auf die Gleichgewichtslage zu rechnen, da das ABTS (Red) gegen eine schon vorhandene Konzentration an ABTS (Red) erzeugt werden muss. Zudem beeinflussen die Konzentration der oxidierten oder reduzierten Spezies das Standardpotential E_0 in der Nernst'schen Gleichung. Daher sollte bei der Darstellung von ABTS^{•+} das genaue stöchiometrische Mengenverhältnis zwischen ABTS und Oxidationsmittel von 2 zu 1 eingehalten werden.

- Konzentrationsverhältnis von ABTS^{•+} zu den zugegebenen Mengen an Antioxidans (ABTS^{•+}-Unterschuss / ABTS^{•+}-Überschuss)

Im ABTS-Assay wird eine bestimmte Ausgangskonzentration an ABTS-Radikalkationen vermessen. Die molare Konzentration entspricht etwa 42 μM an ABTS^{•+}. Wird der ABTS-Assay und die TEAC/RAA(AUC)-Wert Bestimmung nach Rice-Evans durchgeführt, erhält man nur dann gut interpretierbare Ergebnisse, wenn die zugegebene molare Konzentration an Carotinoid kleiner als 42 μM ist.

Tabelle 4.51: Geeignete Konzentrationsverhältnisse bei Durchführung des ABTS-Assay nach Rice-Evans ^[96]

ABTS ^{•+} -Konzentration	Carotinoid-Konzentration	Carotinoid-Konzentration	Carotinoid-Konzentration
42.5 μM	10 μM	5 μM	2.5 μM
Car/ABTS ^{•+}	0.24	0.12	0.06

Optimal sind Konzentrationszugaben von Carotinoid zu ABTS^{•+}, welche im Verhältnis von 0.25 bis 0.05 liegen. Kleinere Zugaben an Carotinoid sind wegen der geringen Extinktionsänderung schlecht auswertbar. Zu große Mengen an Carotinoid führen im ABTS-Assay zu verstärkten Nebenreaktionen.

- Verwendung gleicher Lösungsmittel

Als Standardlösungsmittel wird im ABTS-Assay ein Ethanol/Wasser-Gemisch verwendet. Die Löslichkeit der unpolaren Carotinoide in Ethanol ist sehr schlecht. Um zu vermeiden, dass die unpolaren Carotinoide in der Stammlösung ausfallen und die Konzentrationen der Stammlösungen nicht einheitlich sind, wurden die Carotinoide in sehr wenig THF (kleiner 5 Vol.-%) aufgenommen. Erst dann wurden sie mit der ethanolischen Lösung versetzt.

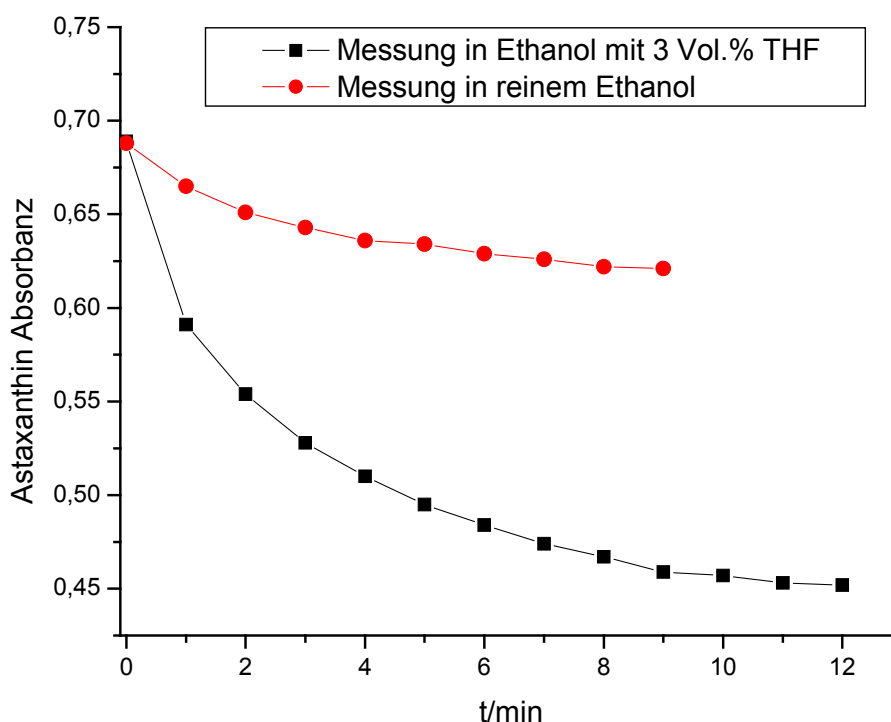


Abbildung 4.41: Astaxanthin-Absorbanzänderungen bei Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung

Welchen starken Effekt die Lösungsmittelzusammensetzung auf den ABTS-Assay besitzt zeigt Abbildung 4.41, mit Astaxanthin als Beispielsubstanz, für zwei verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen. Da THF ein leicht oxidables Lösungsmittel ist, sei auf mögliche radikalische Oxidationsreaktionen des THFs hingewiesen. Diese wurden bei der Interpretation aber nicht berücksichtigt.

- Berücksichtigung der molaren Reaktionsverhältnisse (wenn ungleich 1)

Ein Ergebnis des ABTS-Assays ist, dass ein Mol Trolox zwei Mol $\text{ABTS}^{•+}$ reduziert. Dies müsste, da Trolox als Referenzsubstanz dient, in die TEAC-/RAA(AUC)-Auswertung einfließen. Wenn dieser Faktor nicht berücksichtigt wird sollte dies angemerkt werden. Gleiches gilt für das zu bestimmende Antioxidans, wenn dieses ein deutlich von eins abweichendes molares Reaktionsverhältnis besitzt.

- Reaktionszeit als Endpunkt

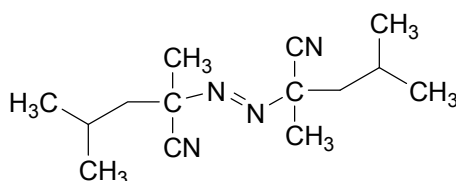
Die Reaktionszeit als Endpunkt des ABTS-Assays zu verwenden macht aus mehreren Gründen keinen Sinn. Erstens sind die Oxidationsreaktionen mit Carotinoiden in weniger als einer Minute beendet. Ist ein Carotinoid vollständig verbraucht, muss die Absorbanz für spätere Reaktionszeiten konstant bleiben. Zweitens sollten langsame und unvollständig verlaufende Reaktionen nicht nach einer festen Reaktionszeit ausgewertet werden. Bei Canthaxanthin und Astaxanthin entspricht die Reaktionszeit von 4 Minuten nicht dem Endpunkt der Reaktion.

- Umbenennung des RAA(AUC)/TEAC-Wertes

Der ABTS-Assay beschreibt eine klassische Redoxtitration für geeignete Antioxidantien. Um Verwirrungen bezüglich des dimensionslosen Ausdrucks „antioxidative Kapazitätsbestimmung (im Verhältnis zu Trolox)“ zu vermeiden sollte statt RAA(AUC) oder TEAC eine **Antioxidant Reducing Capacity of $\text{ABTS}^{•+}$ (ARC)** eingeführt werden. Dies ist eine anschaulichere Beschreibung für die Reaktion und die ermittelten Steigungen aus den Graphen Absorbanzabnahmen in % gegen verschiedene Konzentrationszugaben, z.B. mit der Einheit $[\%(A_0-A/A_0) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}]$ oder $[\%(A_0-A/A_0) \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}] \text{ min}^{-1}$.

5. Druckmessungen der Sauerstoffabnahme

Eine weitere Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Carotinoiden ist die Beschreibung einer Oxidationsreaktion durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs. Bei der durchgeführten Messung handelt es sich um eine radikalisch-induzierte Cumoloxidation. Das verwendete Meßsystem setzt sich aus einem zu schützenden Substrat (Cumol), einem Radikalstarter und einem Carotinoid zusammen. Als Radikalstarter findet das 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalerodinitril) AMVN **109** Verwendung.



AMVN **109**

(nicht löslich in Wasser, Löslichkeit in Toluol 20°C 3.3g/l, Löslichkeit in n-Hexan 20°C 1.0g/l, $k = 2.83 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 50°C ^[50])

Als Antioxidantien werden die Carotinoide β -Carotin **1**, Lycopin **67**, Lutein **68**, Zeaxanthin **69**, Cryptoxanthin **70**, Astaxanthin **71** und Canthaxanthin **72** eingesetzt. Die allgemeine Anordnung des Meßsystems geht auf Ruck^[113] und Frixel^[114] zurück. Das Meßsystem besteht aus einem Probengefäß und einem Referenzgefäß. Beide Gefäße können mit verschiedenen N₂/O₂-Mischungen entsprechend den Sauerstoffpartialdrücken von 15 Torr (2 kPa = Sauerstoffgehalt im menschlichen Gewebe) und 150 Torr (20 kPa = atmosphärischer Sauerstoffgehalt) befüllt werden. Die Gefäße werden bei einer Temperatur von 30°C thermostatisiert. Die Abnahme des Druckes im Probengefäß wird mit Hilfe eines differenziellen Drucknehmers gegen das Referenzgefäß gemessen. Das Probengefäß wird vor der Befüllung an die Messapparatur angeschlossen. Die gesamte Apparatur wird zweimal sekuriert und anschließend mit dem entsprechenden Sauerstoffgasgemisch befüllt. Frisch hergestellte Messlösungen werden mit einer Spritze über ein Septum in das Probengefäß gegeben.

Das Gesamtvolumen von 10 ml der Messlösung im Probengefäß setzt sich wie folgt zusammen:

- 5 ml Cumol
- 4 ml Carotinoidlösung in Chlorbenzol
- 1 ml einer 0.045 M Lösung von AMVN in Chlorbenzol

Nach Zugabe des Cumols und der Carotinoidlösung wird die Starterlösung injiziert, gleichzeitig wird die Messung gestartet. Alle Absperrhähne der Apparatur werden verschlossen, damit sich eine Druckdifferenz aufbauen kann. Die gemessenen Druckdifferenzen werden elektronisch aufgenommen und aufgezeichnet. Nach 90 Minuten wird die Messung gestoppt. Alle Messungen werden doppelt bestimmt. Trägt man die Meßwerte gegen die Reaktionszeit auf, werden die folgende Graphen (Abbildung 5.1) erhalten. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Druckabnahme für verschiedene Cryptoxanthinkonzentrationen.

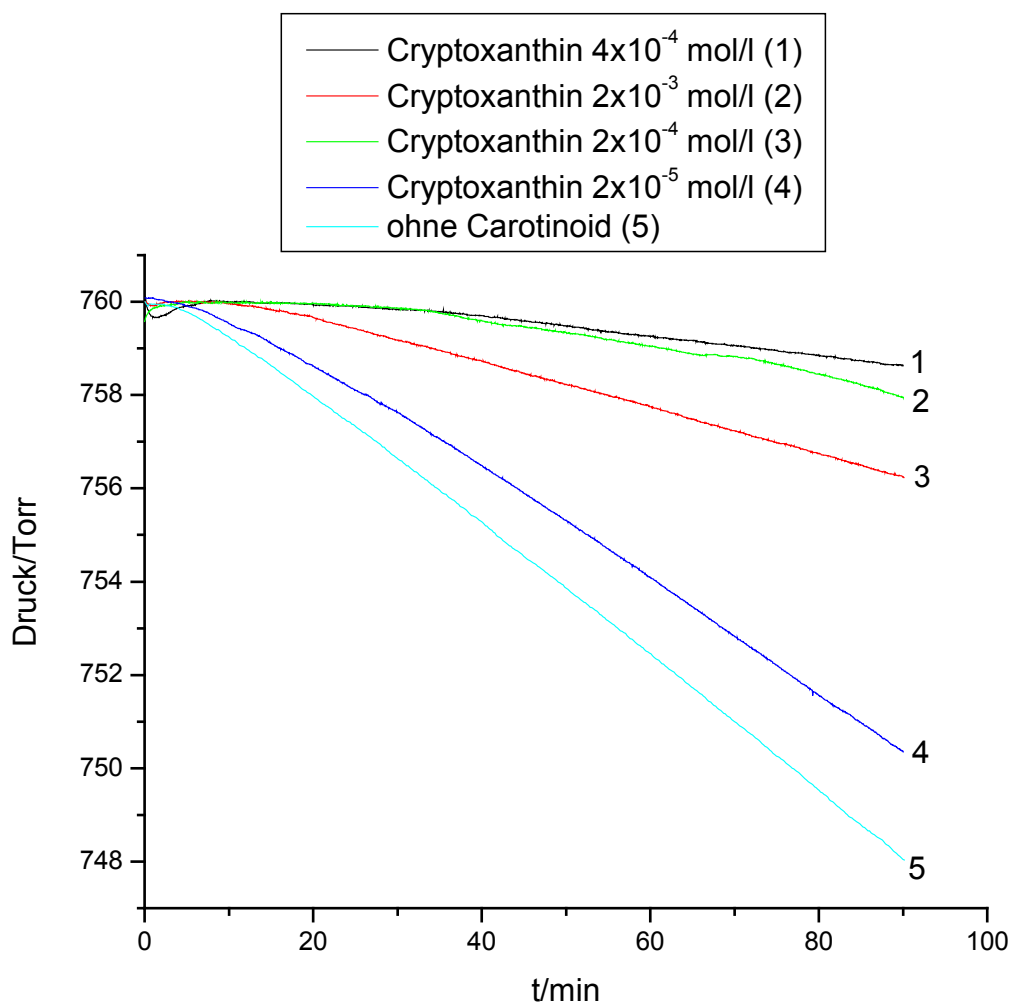


Abbildung 5.1: Sauerstoffdruckabnahmekurven für Cryptoxanthin bei verschiedenen Konzentrationen

Man erkennt, dass im Vergleich zur Referenzmessung ohne Carotinoid die Zugabe von Cryptoxanthin die Oxidation von Cumol zu Cumolhydroperoxid inhibiert. Der Sauerstoff wird im Vergleich zur Referenzmessung langsamer verbraucht. Bei hohen Konzentrationen an Carotinoid (siehe $2 \cdot 10^{-3}$ M in Abbildung 5.1) steigt der Sauerstoffverbrauch der Reaktion, im Gegensatz zu Carotinoidkonzentration bis $4 \cdot 10^{-4}$ M, wieder an. Dieses Phänomen wurde schon von Burton und Ingold^[7] beschrieben und als „pro-oxidativer“ Effekt der Carotinoide gedeutet.

Bei genauer Interpretation des pro-oxidativen Effekts zeigt sich, dass Carotinoide in hohen Konzentrationen die Cumoloxidation nicht beschleunigen. Die Carotinoide werden in der radikalischen Cumoloxidation selbst oxidiert. Dabei reagieren zum Beispiel das Cryptoxanthin beziehungsweise seine Abbauprodukte mit Sauerstoff, wodurch der höhere Verbrauch an Sauerstoff gemessen wird. Die gemessenen Druckabnahmen werden nach Ruck und Frixel^[114] ausgewertet. Dabei legt man eine Ausgleichsgerade durch alle Messwerte in einem Zeitintervall zwischen 50 und 70 Minuten und bestimmt die Steigung dieser Geraden.

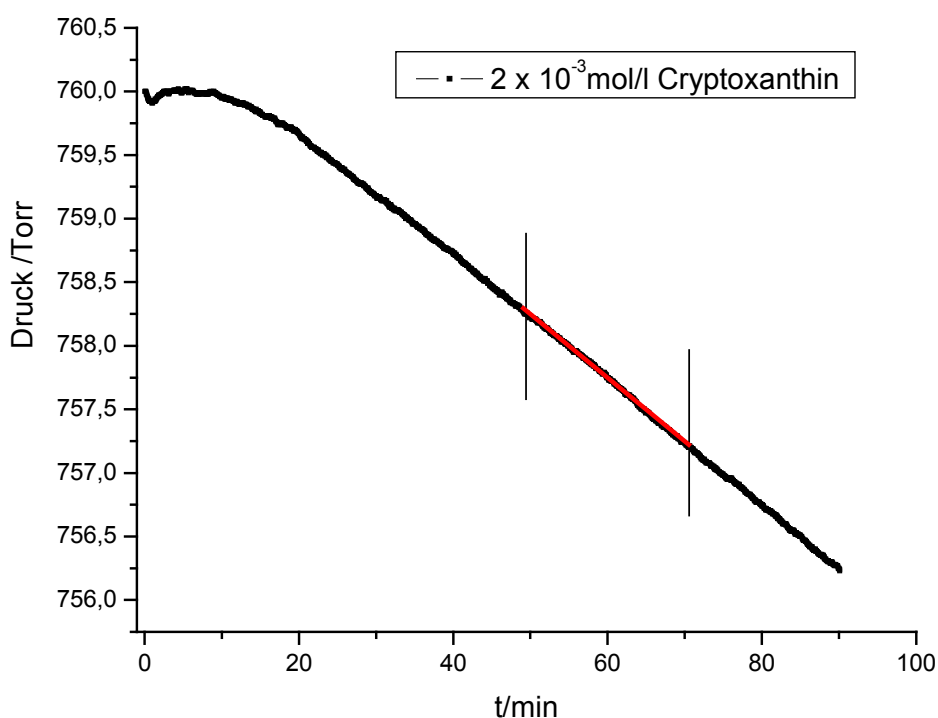


Abbildung 5.2: Steigungsbestimmung der Sauerstoffdruck/Zeitkurven

Bei kleinen Carotinoidkonzentrationen wird im Zeitintervall von 50 bis 70 Minuten die Cumoloxidation nur in geringem Maße unterdrückt. Das Carotinoid und der größte Teil der antioxidativ wirkenden Abbauprodukte ist verbraucht. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs der Cumoloxidation ist hoch, der Betrag der Steigung der Ausgleichsgeraden ist groß. Bei höheren Carotinoidkonzentrationen ist im Zeitintervall von 50 bis 70 Minuten noch Carotinoid vorhanden. Die Cumoloxidation wird inhibiert und der Betrag der Steigung der Ausgleichsgeraden ist kleiner.

Die relativen Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten ergeben sich nach Frixel aus der Steigung multipliziert mit einem Faktor von 665.7. Dieser Faktor resultiert aus der Beschreibung der realen Sauerstoff-Konzentrationserniedrigung mit Hilfe der allgemeinen Gasgesetze unter Berücksichtigung der SI-Einheiten in $\text{mol} \cdot \text{min} / (\text{l} \cdot \text{s} \cdot \text{Torr})$.

Im folgenden werden die einzelnen Messergebnisse der Sauerstoffdruckmessungen gezeigt. Lycopin stand für die Messung in dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Daher wurden die Daten für Lycopin aus der Arbeit von Frixel^[114] entnommen. Vergleicht man die relative Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit der reinen Cumoloxidation von Frixel (-0.1614 Torr/min) mit dem eignen Wert der reinen Cumoloxidation (-0.1354 Torr/min) zeigt sich, dass Frixel eine etwa 15 % höheren Sauerstoffverbrauch der reinen Cumoloxidation gemessen hat. Dieser Unterschied kann mit der Alterung und der nachlassenden Aktivität des Starters AMVN erklärt werden. Ein Vergleich der Aktivität ergibt, dass der Starter pro Jahr etwa 3% seiner Aktivität verliert. Um die antioxidative Aktivität des Lycopins dennoch einordnen zu können, wurden für die Interpretation des Lycopins um 15% verringerte Werte zugrunde gelegt.

5.1 Messergebnisse Lycopin

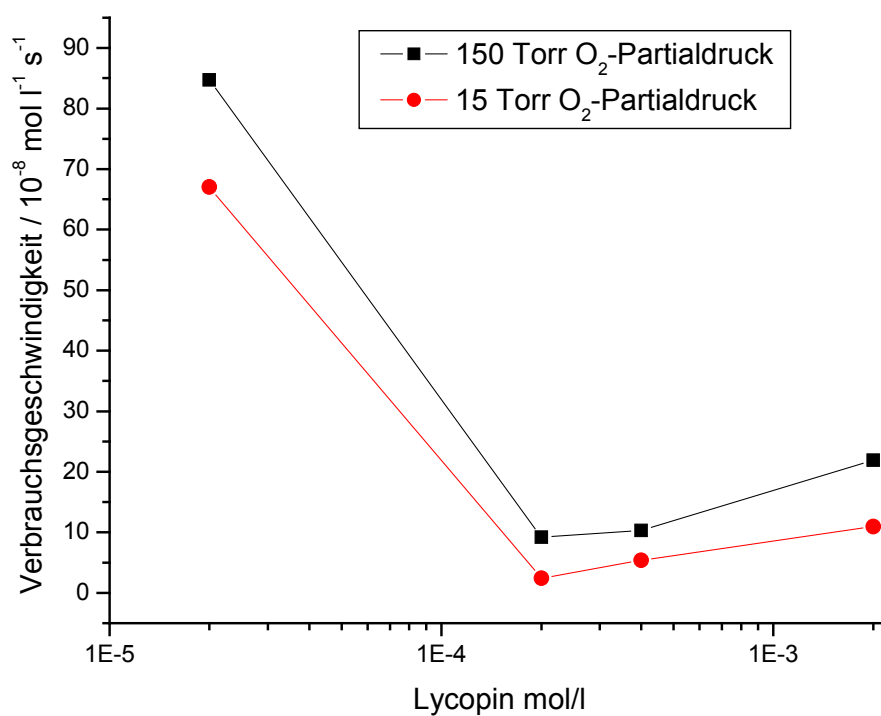
Abbildung 5.3: Konzentrationen gegen O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit von 67

Tabelle 5.1: Auswertung der Druckmessung von Lycopin bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1273	84.73
2·10 ⁻⁴	-0.0139	9.22
4·10 ⁻⁴	-0.0155	10.32
2·10 ⁻³	-0.0329	21.93

Tabelle 5.2: Auswertung der Druckmessung von Lycopin bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1007	67.03
2·10 ⁻⁴	-0.0037	2.43
4·10 ⁻⁴	-0.0081	5.37
2·10 ⁻³	-0.0164	10.95

5.2 Messergebnisse Cryptoxanthin

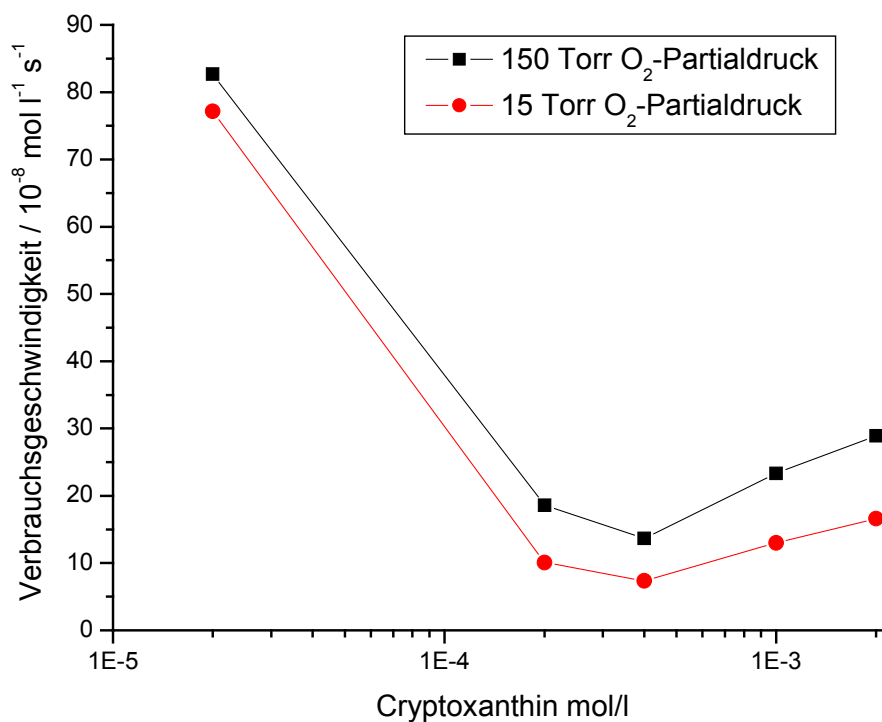
Abbildung 5.4: Konzentrationen gegen O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit von 70

Tabelle 5.3: Auswertung der Druckmessung von Cryptoxanthin bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1242	82.69
2·10 ⁻⁴	-0.0279	18.59
4·10 ⁻⁴	-0.0251	13.87
1·10 ⁻³	-0.0264	23.31
2·10 ⁻³	-0.0434	28.90

Tabelle 5.4: Auswertung der Druckmessung von Cryptoxanthin bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1159	77.14
2·10 ⁻⁴	-0.0151	10.05
4·10 ⁻⁴	-0.0110	7.35
1·10 ⁻³	-0.0195	13.01
2·10 ⁻³	-0.0294	16.59

5.3 Messergebnisse Zeaxanthin

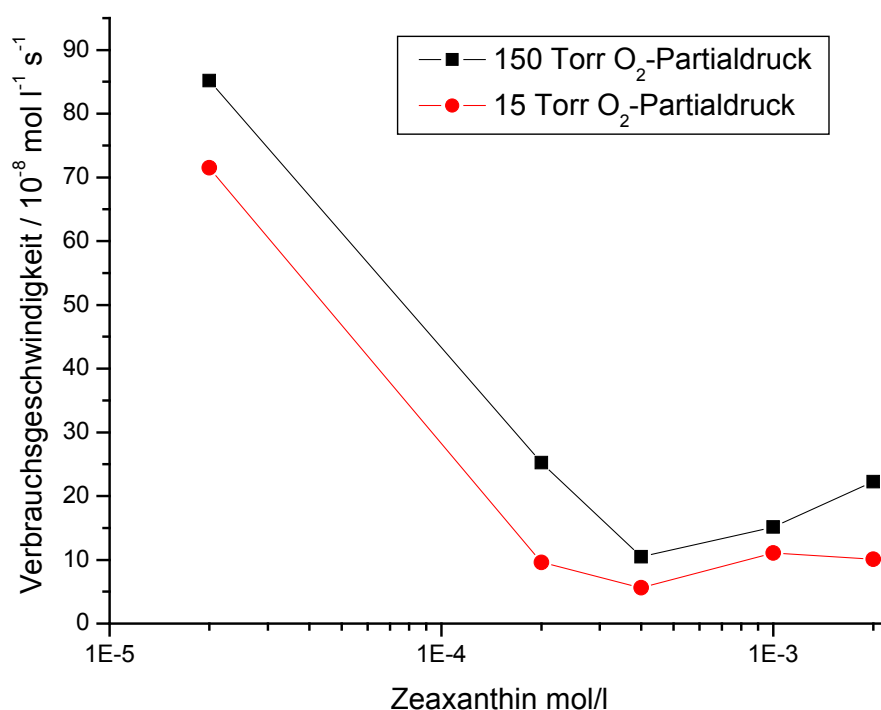
Abbildung 5.5: Konzentrationen gegen O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit von 69

Tabelle 5.5: Auswertung der Druckmessung von Zeaxanthin bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1280	85.21
2·10 ⁻⁴	-0.0379	25.22
4·10 ⁻⁴	-0.0228	10.49
1·10 ⁻³	-0.0158	15.15
2·10 ⁻³	-0.0334	22.26

Tabelle 5.6: Auswertung der Druckmessung von Zeaxanthin bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1074	71.51
2·10 ⁻⁴	-0.0144	9.57
4·10 ⁻⁴	-0.0085	5.63
1·10 ⁻³	-0.0166	11.08
2·10 ⁻³	-0.0151	10.07

5.4 Messergebnisse Lutein

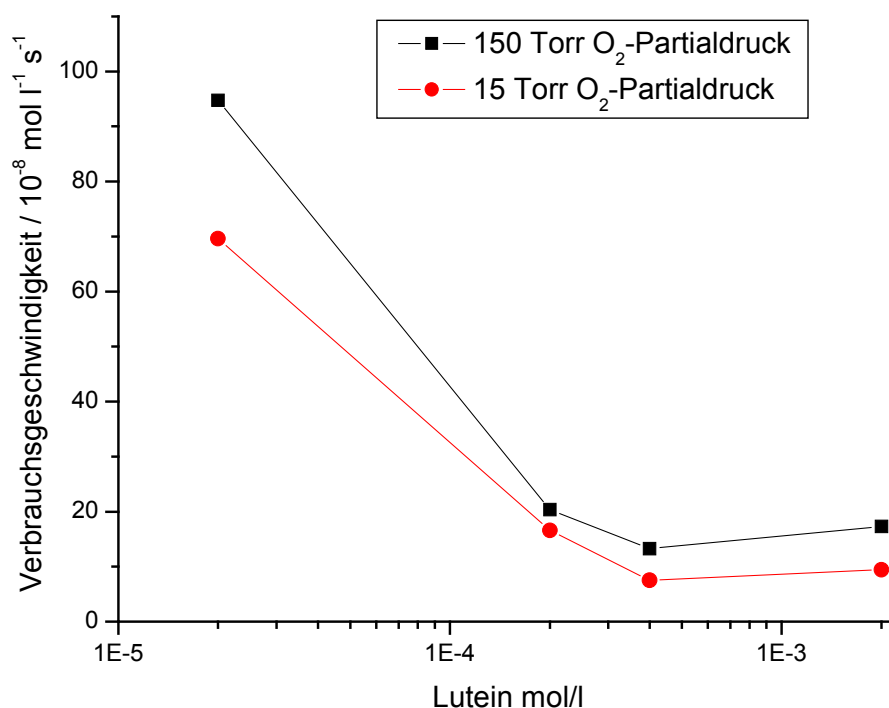
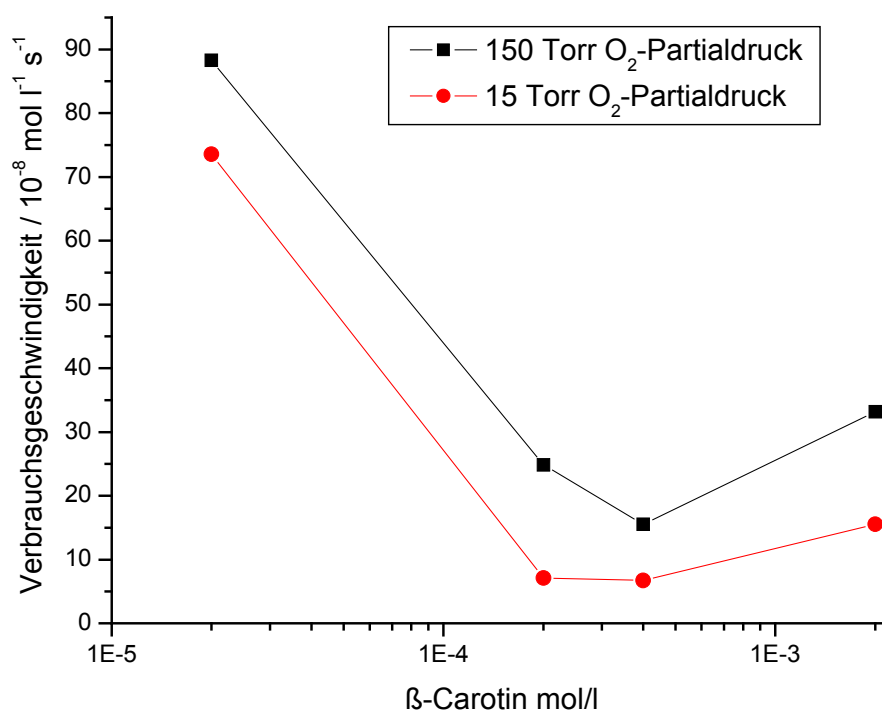
Abbildung 5.6: Konzentrationen gegen O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit von 68

Tabelle 5.7: Auswertung der Druckmessung von Lutein bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1423	94.74
2·10 ⁻⁴	-0.0306	20.38
4·10 ⁻⁴	-0.0199	13.28
2·10 ⁻³	-0.0260	17.30

Tabelle 5.8: Auswertung der Druckmessung von Lutein bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1045	69.58
2·10 ⁻⁴	-0.0295	16.58
4·10 ⁻⁴	-0.0114	7.56
2·10 ⁻³	-0.0142	9.46

5.5 Messergebnisse β -CarotinAbbildung 5.7: Konzentrationen gegen O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit von 1Tabelle 5.9: Auswertung der Druckmessung von β -Carotin bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / $10^{-8} \text{ mol/(l}\cdot\text{s)}$
$2 \cdot 10^{-5}$	-0.1326	88.29
$2 \cdot 10^{-4}$	-0.0373	24.83
$4 \cdot 10^{-4}$	-0.0233	15.54
$2 \cdot 10^{-3}$	-0.0499	33.20

Tabelle 5.10: Auswertung der Druckmessung von β -Carotin bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / $10^{-8} \text{ mol/(l}\cdot\text{s)}$
$2 \cdot 10^{-5}$	-0.1105	73.55
$2 \cdot 10^{-4}$	-0.0107	7.13
$4 \cdot 10^{-4}$	-0.0101	6.74
$2 \cdot 10^{-3}$	-0.0234	15.55

5.6 Messergebnisse Canthaxanthin

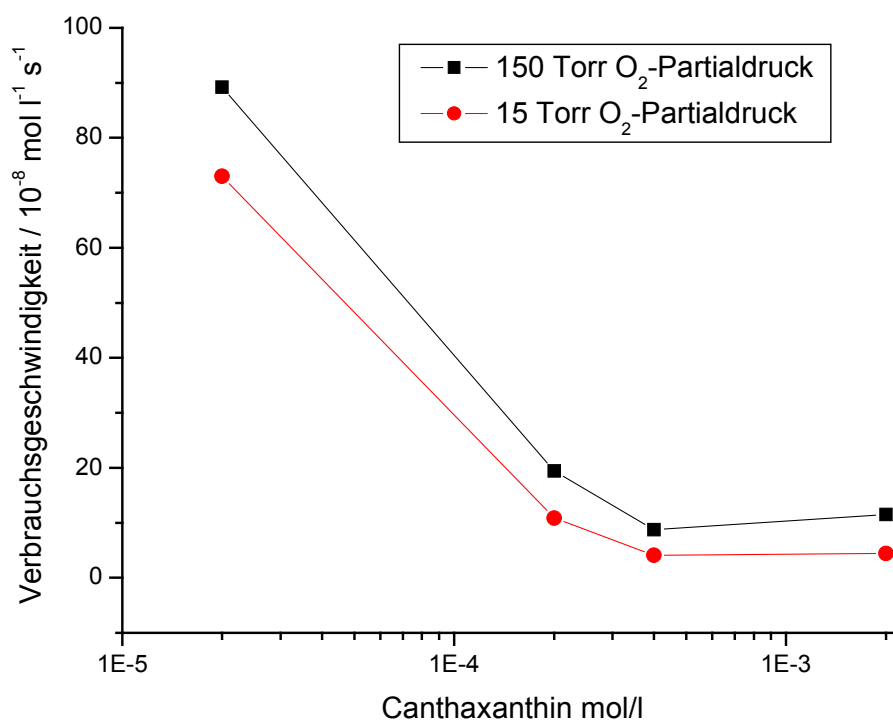
Abbildung 5.8: Konzentrationen gegen O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit von **72**

Tabelle 5.11: Auswertung der Druckmessung von Canthaxanthin bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1334	89.20
2·10 ⁻⁴	-0.0292	19.44
4·10 ⁻⁴	-0.0131	8.73
2·10 ⁻³	-0.0173	11.51

Tabelle 5.12: Auswertung der Druckmessung von Canthaxanthin bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / 10 ⁻⁸ mol/(l·s)
2·10 ⁻⁵	-0.1096	72.98
2·10 ⁻⁴	-0.0163	10.88
4·10 ⁻⁴	-0.0062	4.10
2·10 ⁻³	-0.0067	4.39

5.7 Messergebnisse Astaxanthin

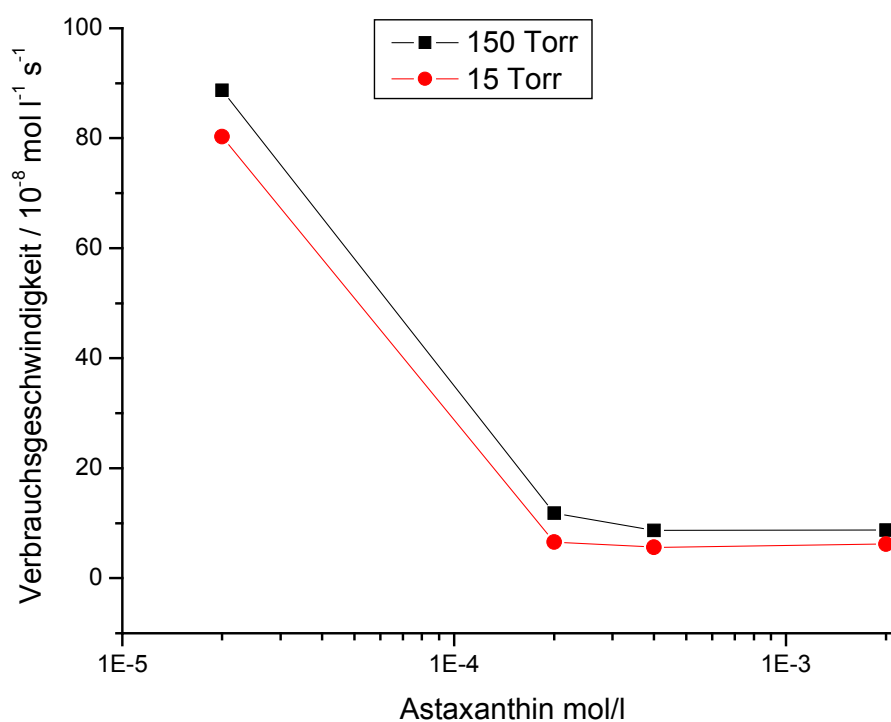
Abbildung 5.9: Konzentrationen gegen O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit von 71

Tabelle 5.13: Auswertung der Druckmessung von Astaxanthin bei 150 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / $10^{-8} \text{ mol/(l}\cdot\text{s)}$
$2 \cdot 10^{-5}$	-0.1333	88.72
$2 \cdot 10^{-4}$	-0.0177	11.81
$4 \cdot 10^{-4}$	-0.0131	8.69
$2 \cdot 10^{-3}$	-0.0130	8.75

Tabelle 5.14: Auswertung der Druckmessung von Astaxanthin bei 15 Torr

Konzentration mol/l	Steigungen Torr/min	Geschwindigkeit / $10^{-8} \text{ mol/(l}\cdot\text{s)}$
$2 \cdot 10^{-5}$	-0.1053	80.30
$2 \cdot 10^{-4}$	-0.0099	6.58
$4 \cdot 10^{-4}$	-0.0085	5.65
$2 \cdot 10^{-3}$	-0.0093	6.18

5.8 Interpretation der Messergebnisse

Bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ M zeigen alle Carotinoide in diesem Assay die größte antioxidative Wirksamkeit. Bei dieser Carotinoidkonzentration sind die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten im Experiment am geringsten. Die Cumuloxidation wird effektiv inhibiert. Es ergibt sich folgende antioxidative hierarchische Abfolge der Carotinoide, jeweils für den Sauerstoffdruck von 150 Torr bzw. 15 Torr. Die antioxidative Hierarchie wurde aus der Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme für das Zeitintervall von 50 bis 70 Minuten bestimmt und bei einem Sauerstoffpartialdruck von 150 Torr.

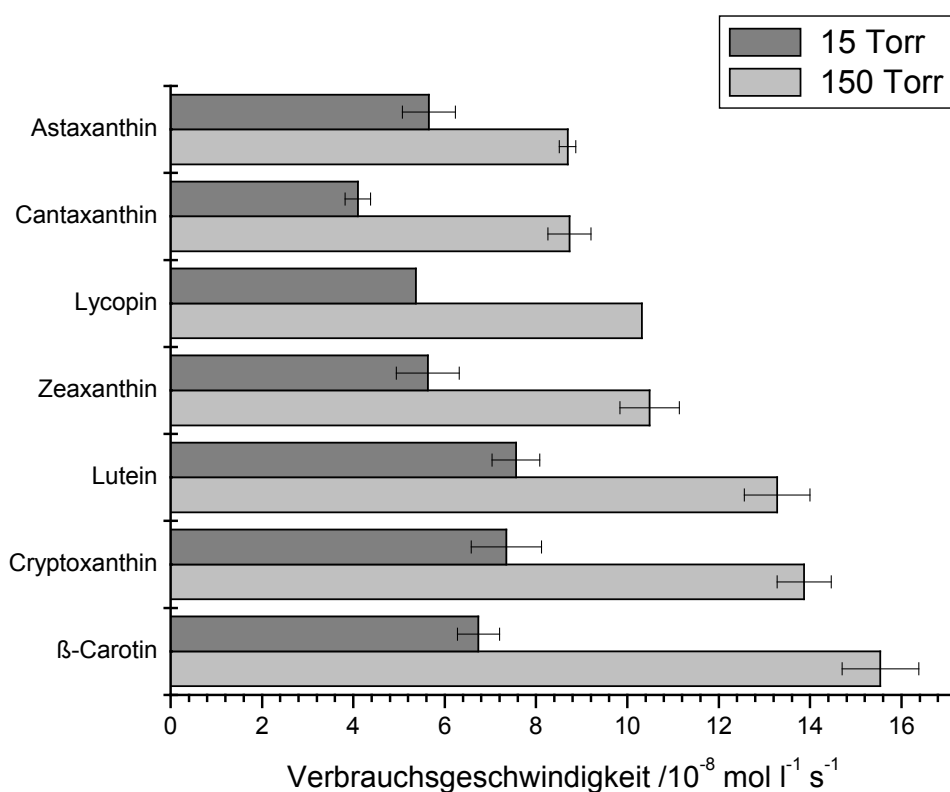


Abbildung 5.10: Vergleich der O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeiten der Carotinoide für eine Konzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l

Im Rahmen des Messfehlers zeigen β -Carotin und die Hydroxygruppen tragenden Carotinoide Cryptoxanthin und Lutein die geringste antioxidative Wirkung. Der antioxidative Effekt nur einer Hydroxygruppe im Cryptoxanthin zeigt für kurze Reaktionszeiten von 50-70 Minuten nur einen geringen Effekt. Bessere antioxidative Wirkung zeigen das Zeaxanthin und das Lycopin. Lycopin besitzt im Gegensatz zu Zeaxanthin nur ein reines Kohlenwasserstoffgerüst. Die beste antioxidative Wirksamkeit zeigen das Astaxanthin und das

Canthaxanthin. Beide Carotinoide tragen Carbonylgruppen in 4 und 4'-Position. Der Einfluss der zusätzlichen Hydroxylgruppen im Astaxanthin scheint in der Druckmessung nicht messbar zu sein. Die nächste Abbildung zeigt die antioxidative hierarchische Abfolge der Carotinoide für die hohen Carotinoidkonzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ M. Die hierarchische Einteilung der Carotinoide beruht auch hier auf den Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten im Zeitintervall 50 bis 70 Minuten ($pO_2 = 150$ Torr):

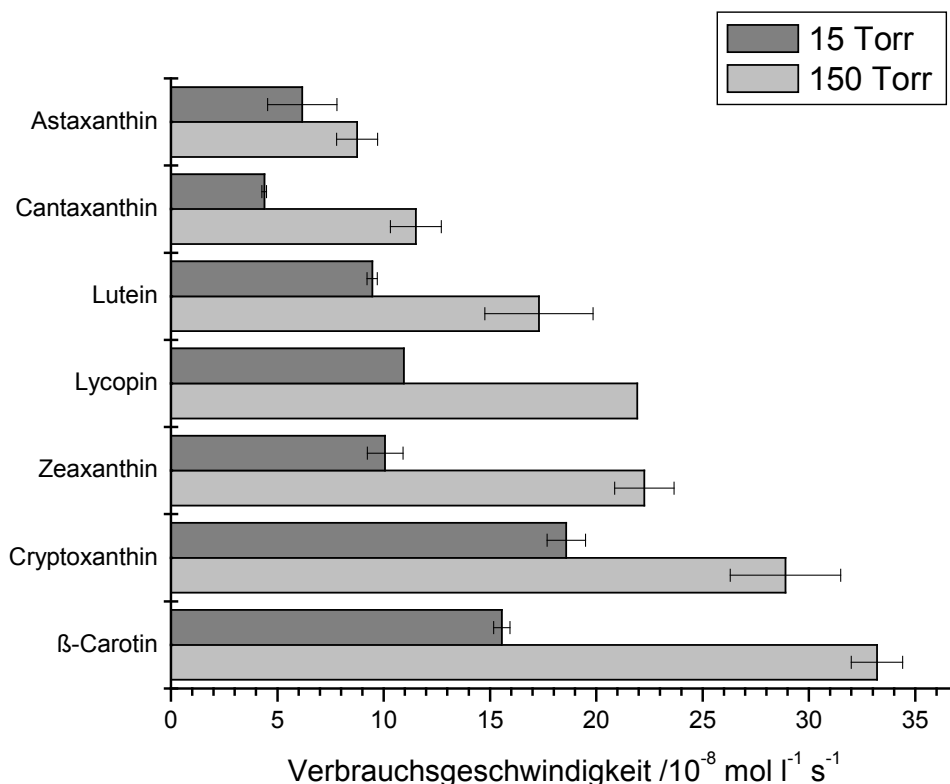


Abbildung 5.11: Vergleich der O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeiten der Carotinoide für eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Bei den hohen Carotinoidkonzentration zeigen β-Carotin und Cryptoxanthin die schlechteste antioxidative Wirksamkeit. Man erkennt, dass Astaxanthin und Canthaxanthin die besten antioxidativen Wirkungen zeigen. Die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin mit zwei Hydroxygruppen zeigen im Rahmen des Messfehlers die gleiche antioxidative Wirksamkeit wie das nicht substituierte Lycopin.

6. Messungen der Cumolhydroperoxidbildung

Um das antioxidative Verhalten der Carotinoide noch besser beschreiben zu können, wurde eine weitere Messmethode angewendet. Bei der hier durchgeführten Messung handelt es sich ebenfalls um eine radikalisch-induzierte Oxidation. Das System setzt sich aus einem zu schützenden Substrat, einem Radikalstarter und einem Carotinoid zusammen. Bei dem zu schützenden Substrat handelt es sich wieder um das Cumol. Als Starter findet das 2,2'-Azobis-(2,4-dimethylvalerodinitril) AMVN **109** Verwendung. Als Antioxidantien wurden die Carotinoide **1**, **67** - **72** eingesetzt. Die allgemeine Anordnung des Meßsystems geht auf Terao^[115] und Schmidt^[116] zurück. Das Mess-System beruht auf der Verfolgung der Cumoloxidation über die quantitative Bestimmung des gebildeten Cumolhydroperoxides, mit Hilfe von HPLC-Untersuchungen. Man kann so die inhibierende Wirkung der Carotinoide auf die Cumolperoxidbildung bei verschiedenen Carotinoidkonzentrationen messen. Die Messung wird in einem Reaktionsgefäß durchgeführt (Abb. 9.2), in welchem die radikalisch induzierte Cumoloxidation abläuft. Aus dem Reaktionsgefäß werden in konstanten Zeitabständen Proben entnommen. Diese Proben werden dann mit Hilfe der HPLC auf ihren Cumolhydroperoxidgehalt untersucht. Die Peroxidbestimmung findet auf einer Silicagelsäule von 6.0 mm Durchmesser und 150 mm Länge statt. Als Laufmittel wird ein Lösungsmittelgemisch aus Hexan/Isopropanol 99 zu 1, mit einer Flussrate von 2 ml/min, verwendet. Der Peroxidgehalt wird UV-Vis-spektroskopisch mit einem Diodenarray Detektor gemessen, welcher der Säule nachgeschaltet ist. Gemessen wird das Cumolhydroperoxid bei einer Messwellenlänge von 254 nm. Zunächst wird die Menge des Cumolhydroperoxides in einer Referenzmessung mit reinem Cumol, Chlorbenzol als Lösungsmittel und dem Radikalstarter bestimmt. Die Referenzprobe hat folgende Zusammensetzung:

- 5 ml Cumol
- 4 ml Chlorbenzol (Lösungsmittel)
- 1 ml einer 0.045 M Lösung von AMVN in Chlorbenzol

Die Substanzen werden in das Probengefäß gegeben, luftdicht verschlossen und auf 37 °C thermostatisiert.

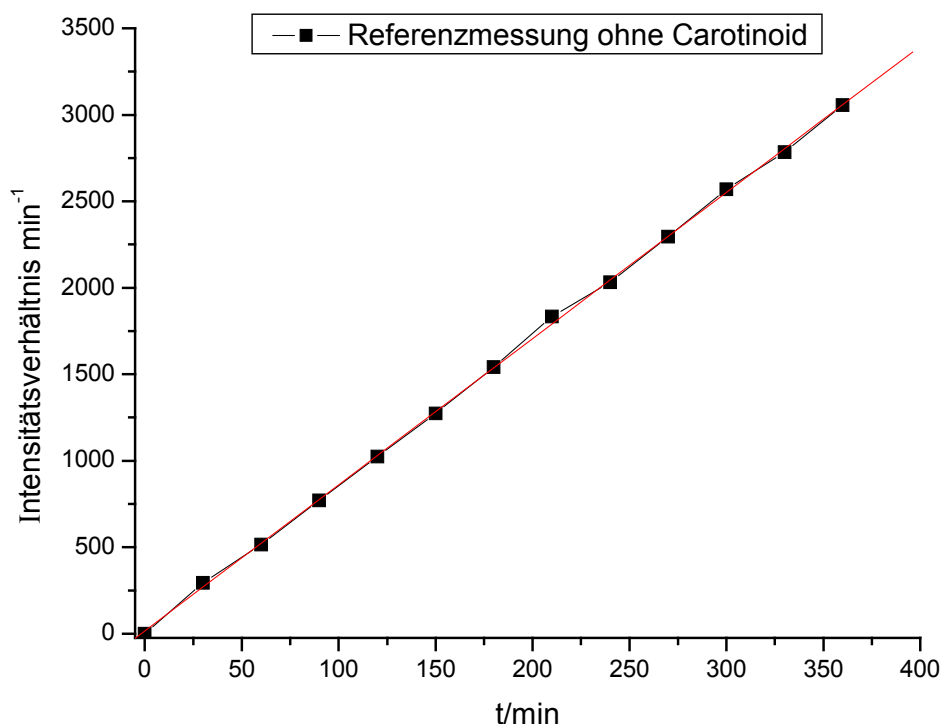


Abbildung 6.1: Peroxidzunahme für reines Cumol bei der Messwellenlänge 254 nm im Referenzexperiment

Da keine quantitative Eichung des HPLC-Mess-Systems stattfindet wird der Peroxidgehalt in Intensitäten $I_0/I \cdot \text{min}^{-1}$ angegeben. Der Peroxidgehalt im Chromatogramm wird über Integration des Cumolhydroperoxidsignals bei 2.3 Minuten bestimmt. Bei der Bestimmung des Peroxidgehaltes wird der Peak von Cumolhydroperoxid 2.285 min von einem Peak bei 2.405 min überlagert. Der zweite Peak stammt von einem Abbauprodukt des Cumolhydroperoxids und ist deshalb dem Anstieg des Cumolhydroperoxids proportional.

Wie von Scherrers^[117] beschrieben, macht man den geringsten Fehler, wenn die Integration über beide Signale erfolgt. Alle Messungen wurden über diese Methode ausgewertet .

Misst man nun den Peroxidgehalt der Cumoloxidation nach Zugabe von Carotinoid, resultieren Messkurven mit geringeren Cumolhydroperoxidanstiegen als im Referenzexperiment. Der Peroxidgehalt dieser Messkurven liegt unterhalb des Anstiegs für die uninhibierte Referenzmessung. Die Auswertung des Experimentes und die Quantifizierung des antioxidativen

Verhaltens der Carotinoide auf die Cumoloxidation wird wie folgt durchgeführt. Es werden Auswertzeitpunkte festgelegt, an denen der entstandene Cumolhydroperoxidgehalt bestimmt wird. Der Peroxidgehalt der entsprechenden Referenzmessung an diesem Auswertzeitpunkt wird als 100% gebildetes Cumolhydroperoxid festgesetzt. Nun wird am gleichen Auswertzeitpunkt der Peroxidgehalt der Carotinoidmessung bestimmt. Als Messwert wird der Quotient des Peroxidgehalt der Referenzmessung in Prozent gegen den Peroxidgehalt der Carotinoidmessung in Prozent angegeben. Bei den gemessenen Carotinoidkonzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ M wird ein Auswertzeitpunkt von 220 Minuten gewählt. Bei den Carotinoidkonzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ M und $2 \cdot 10^{-3}$ M wird ein Auswertzeitpunkt von 360 Minuten gewählt. Die unterschiedlichen Auswertzeitpunkte wurden gewählt, um antioxidative „Langzeit“-Effekte der Carotinoide beschreiben zu können. Für die kleinen Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-4}$ M wurde ein kürzer Messzeitraum festgelegt, da die Carotinoide nach 30 Minuten abgebaut sind. Die Inhibierung der Cumoloxidation beruht dann nur noch auf entsprechenden Abbauprodukten.

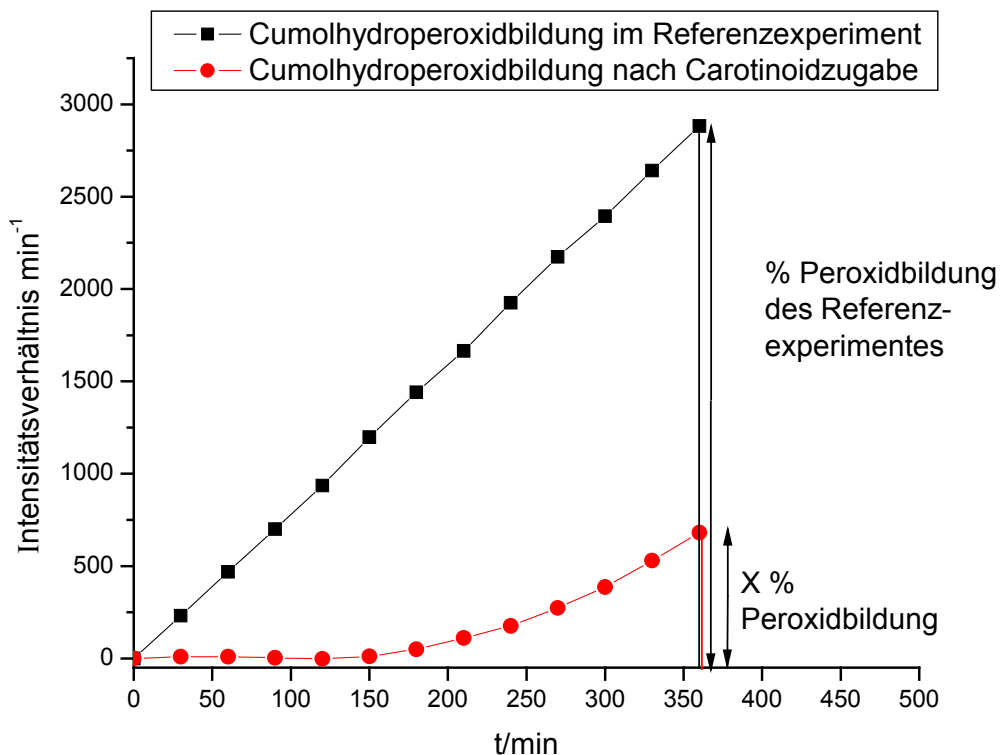


Abbildung 6.2: Auswertverfahren zur inhibierten Peroxidbildung in %

In den folgenden Abbildungen sind die Messergebnisse der inhibierten Cumoloxidation nach Zugabe von Carotinoiden gezeigt.

6.1 Messergebnisse Lycopin

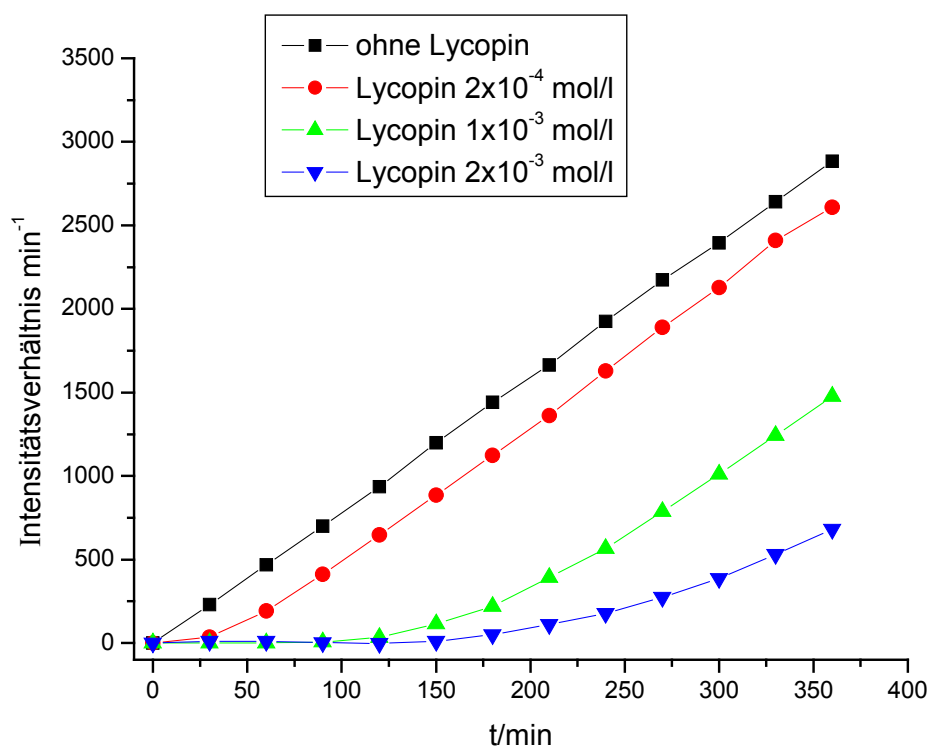


Abbildung 6.3: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene Lycopinkonzentrationen

Tabelle 6.1: % Peroxidbildung für die Lycopinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

Lycopin	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	85 %

Tabelle 6.2: % Peroxidbildung der Lycopinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M / $2 \cdot 10^{-3}$ M

Lycopin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	51 %	24 %

6.2 Messergebnisse Astaxanthin

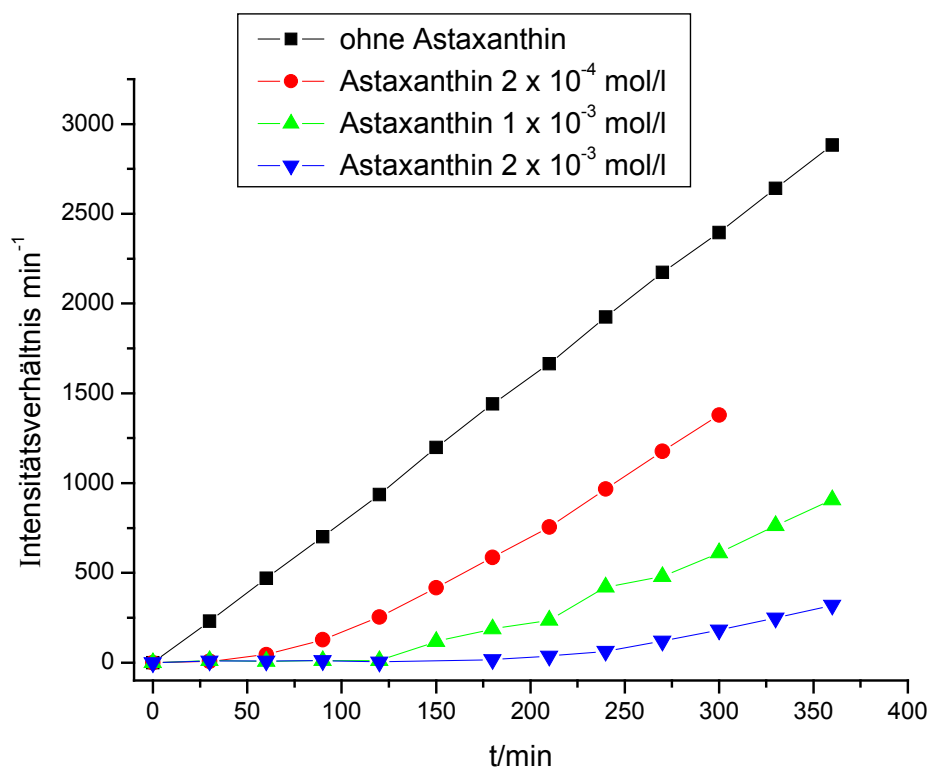


Abbildung 6.4: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene Astaxanthinkonzentrationen

Tabelle 6.3: % Peroxidbildung für die Astaxanthinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

Astaxanthin	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	45 %

Tabelle 6.4: % Peroxidbildung der Astaxanthinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M/ $2 \cdot 10^{-3}$ M

Astaxanthin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	32 %	11 %

6.3 Messergebnisse Canthaxanthin

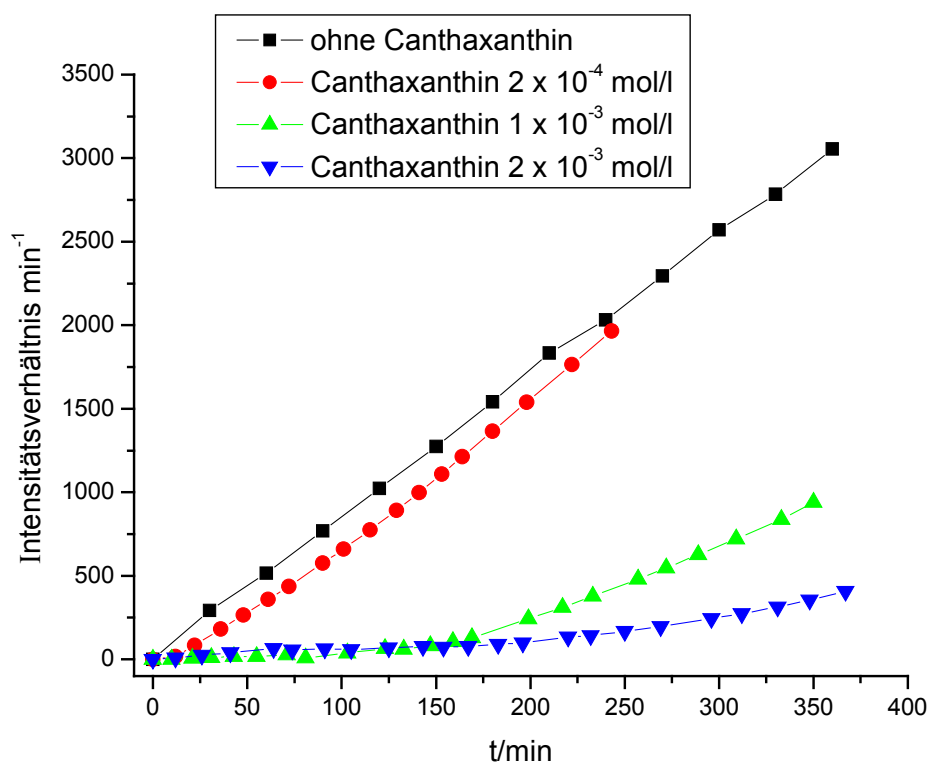


Abbildung 6.6: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene Canthaxanthinkonzentrationen

Tabelle 6.5: % Peroxidbildung für die Canthaxanthinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

Canthaxanthin	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	93 %

Tabelle 6.6: %Peroxidbildung der Canthaxanthinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M / $2 \cdot 10^{-3}$ M

Cantaxanthin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	32 %	13 %

6.4 Messergebnisse Zeaxanthin

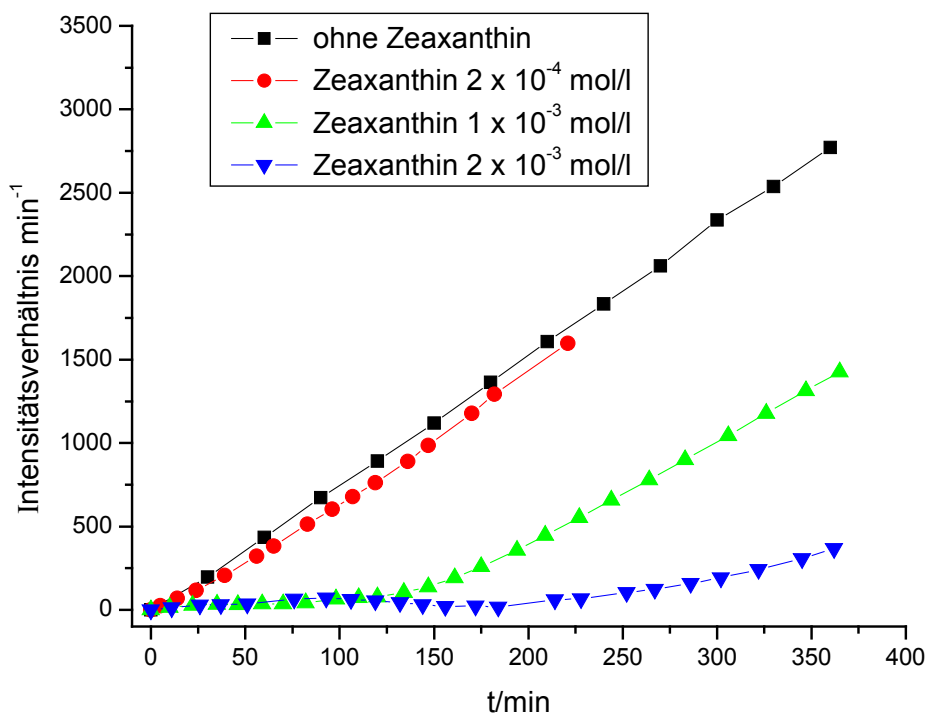


Abbildung 6.7: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene Zeaxanthinkonzentrationen

Tabelle 6.7: % Peroxidbildung für die Zeaxanthinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

Zeaxanthin	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	99 %

Tabelle 6.8: % Peroxidbildung der Zeaxanthinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M/ $2 \cdot 10^{-3}$ M

Zeaxanthin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	46 %	12 %

6.5 Messergebnisse Cryptoxanthin

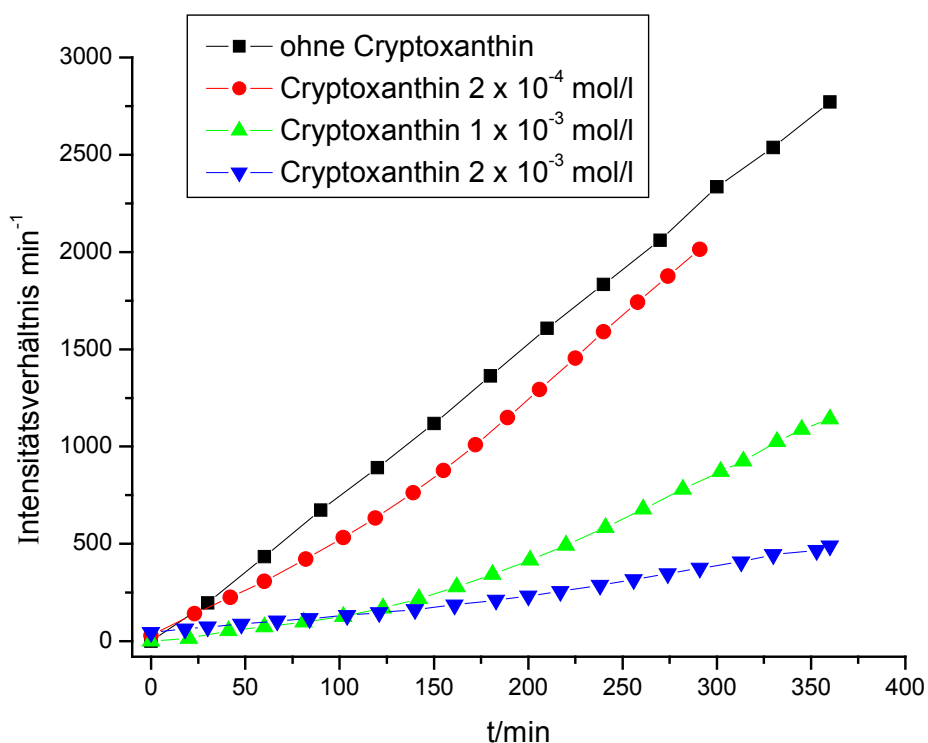


Abbildung 6.8: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene Cryptoxanthinkonzentrationen

Tabelle 6.9: % Peroxidbildung für die Cryptoxanthinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

Cryptoxanthin	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
Prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	85 %

Tabelle 6.10: %Peroxidbildung der Cryptoxanthinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M/ $2 \cdot 10^{-3}$ M

Cryptoxanthin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
prozentuale Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	41 %	18 %

6.6 Messergebnisse Lutein

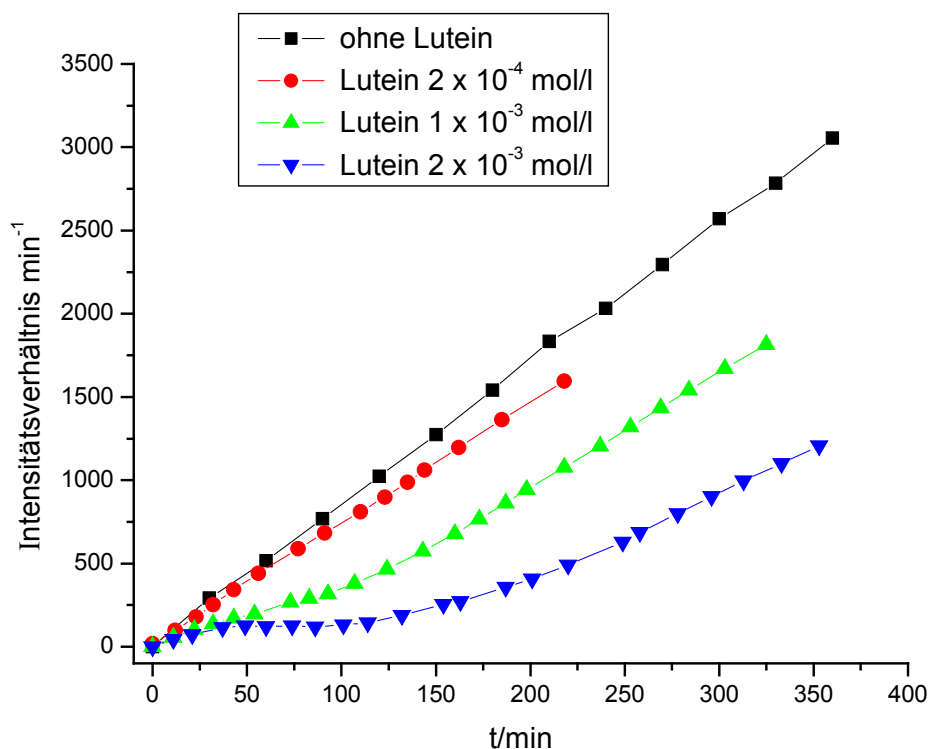


Abbildung 6.9: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene Luteinkonzentrationen

Tabelle 6.11: % Peroxidbildung für die Luteinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

Lutein	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
% Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	86 %

Tabelle 6.12: % Peroxidbildung der Luteinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M / $2 \cdot 10^{-3}$ M

Lutein	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
% Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	66 %	40 %

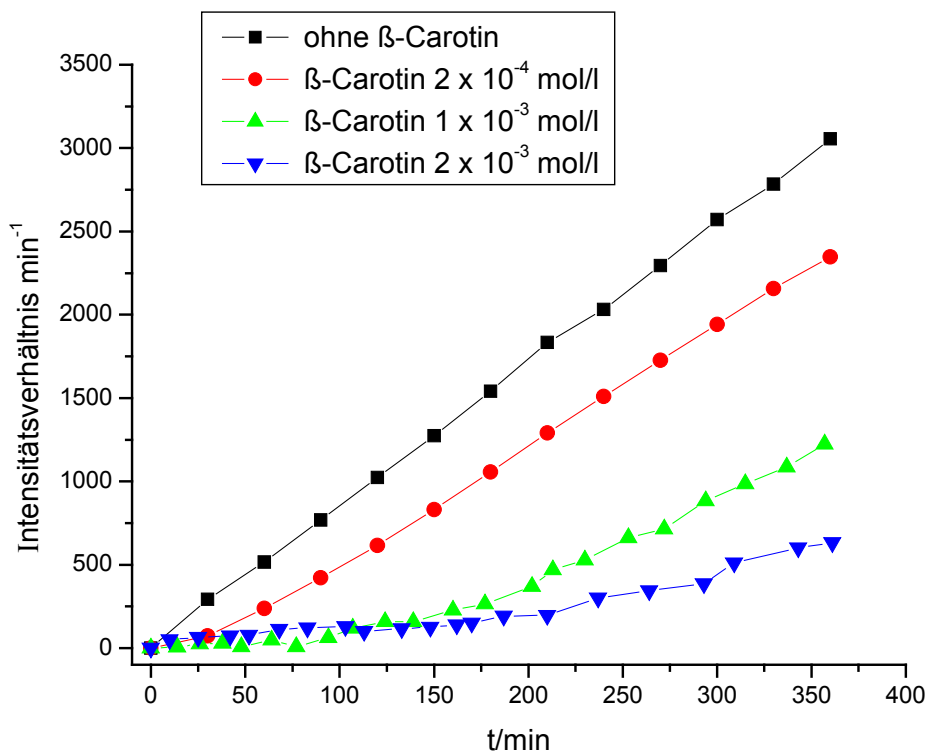
6.7 Messergebnisse β -Carotin

Abbildung 6.10: Gemessene Cumolhydroperoxidanstiege für verschiedene β -Carotinkonzentrationen

Tabelle 6.13: % Peroxidbildung für die β -Carotinkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M

β -Carotin	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Reaktionszeit t/[min]	220
% Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 220 Minuten	72 %

Tabelle 6.14: % Peroxidbildung der β -Carotinkonzentrationen $1 \cdot 10^{-3}$ M / $2 \cdot 10^{-3}$ M

β -Carotin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Reaktionszeit t/[min]	360	360
% Peroxidbildung im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Carotinoid nach 360 Minuten	40 %	21 %

Das nachfolgenden Schaubild zeigt eine hierarchische Anordnung der Carotinoide geordnet nach ihrer antioxidativen Wirksamkeit, in Bezug auf die Inhibierung der Cumoloxidation. Die Anordnung bezieht sich auf die Carotinoidkonzentrationen von $2 \cdot 10^{-3}$ M. Es zeigt sich, dass die carbonylhaltigen Carotinoide Astaxanthin und Cantaxanthin im entsprechenden Messzeitraum die beste antioxidative Wirkung zeigen. Im Gegensatz zur Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit zeigen Hydroxycarotinoide nach 360 Minuten (Messzeitraum) in dieser Meßmethode sehr gute antioxidative Eigenschaften. Eine Ausnahme bildet hier das Lutein. Lutein besitzt im Cumolhydroperoxidexperiment die deutlich schlechteste antioxidative Wirkung. Lycopin und β -Carotin, welche keine funktionellen Gruppen tragen, zeigen im Messzeitraum nur geringe Inhibition der Cumoloxidation.

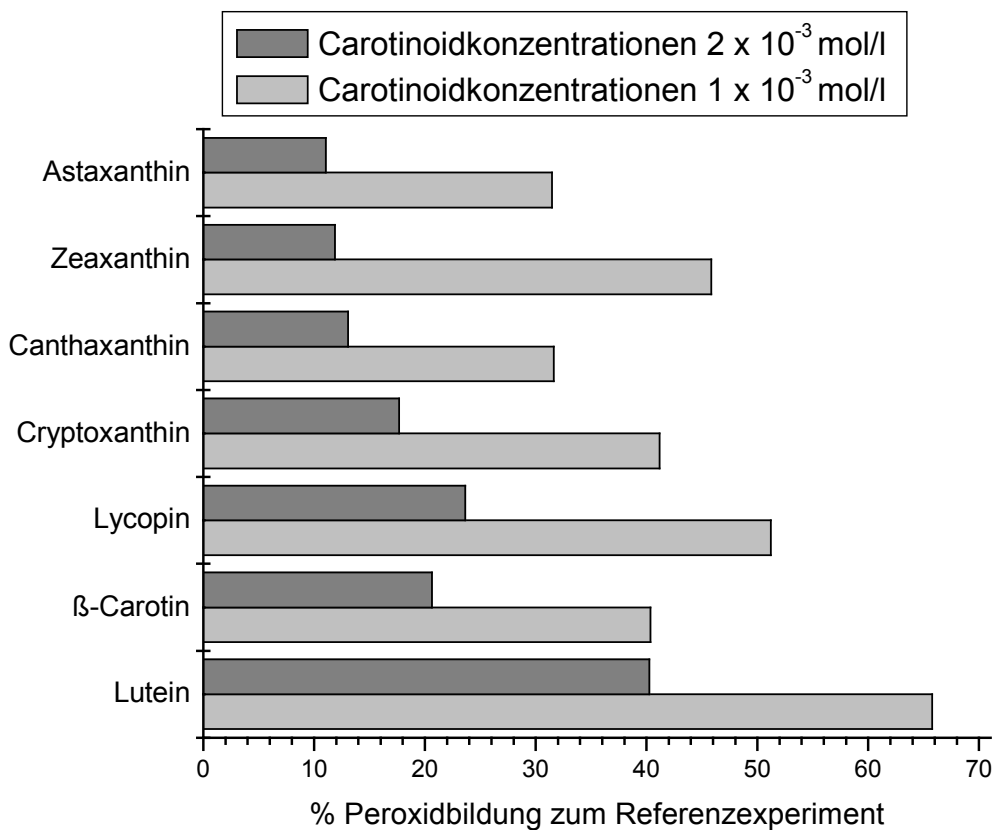


Abbildung 6.11: Antioxidative Wirksamkeit der Carotinoide als verringerte Cumolhydroperoxidbildung in Prozent im Vergleich zum Referenzexperiment

7. Vergleich der Messergebnisse

Die beiden folgenden Tabellen zeigen einen Vergleich der Messergebnisse der Carotinoide **1**, **67-72** in den drei verwendeten antioxidativen Verfahren. In der ersten Tabelle werden die folgenden Messergebnisse verglichen:

Die erste Spalte zeigt die Ergebnisse der Cumolhydroperoxidmethode für die Carotinoidkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-3}$ M bei einer Messdauer von 360 Minuten. Im Vergleich dazu enthält die zweite Spalte die gemessenen Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten für die Carotinoidkonzentrationen von $4 \cdot 10^{-4}$ M bei einem Sauerstoffpartialdruck von 150 Torr. Unter diesen Bedingungen zeigen die Carotinoide in dieser Methode die beste antioxidative Wirksamkeit. Die rechte Spalte enthält die RAA(AUC)-Werte des ABTS-Assays für eine Minute Reaktionsdauer.

Tabelle 7.1: Messergebnisse der 3 Messmethoden (ABTS-Assay, Messung O₂-Verbrauch und Peroxidmethode) bei mittleren Carotinoidkonzentrationen

Carotinoid	% Peroxidbildung nach 360 Minuten	O ₂ -Verbrauchs- geschwindigkeit /10 ⁻⁸ mol/l•s (150 Torr)	RAA(AUC)- Wert [1 min.]
Konzentration	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$4 \cdot 10^{-4}$ M	
Astaxanthin 71	32 %	8.69	(0.41*)
Canthaxanthin 72	32 %	8.73	(0.48*)
β-Carotin 1	40 %	15.54	1.82
Cryptoxanthin 70	41 %	13.87	1.45
Zeaxanthin 69	46 %	10.49	0.79
Lycopin 67	51 %	10.32	2.53
Lutein 68	66 %	13.28	1.42

*= keine Endwerte (AUC-Werte nach 1 Minute Reaktionsdauer)

In Abbildung 7.1 sind die Ergebnisse der Tabelle 7.1 graphisch gezeigt. Die Tabelle 7.2 zeigt die Messergebnisse der hohen Carotinoidkonzentrationen. Auch diese Tabelle enthält in der ersten Spalte die Ergebnisse der Cumolhydroperoxidmethode bei den Carotinoidkonzentrationen von $2 \cdot 10^{-3}$ M und einer Meßdauer 360 Minuten. Die zweite Spalte enthält die gemessenen Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten bei Carotinoidkonzentrationen von

$2 \cdot 10^{-3}$ M und einem Sauerstoffpartialdruck von 150 Torr. Die rechte Spalte enthält die RAA(AUC)-Werte nach vier Minuten Reaktionsdauer.

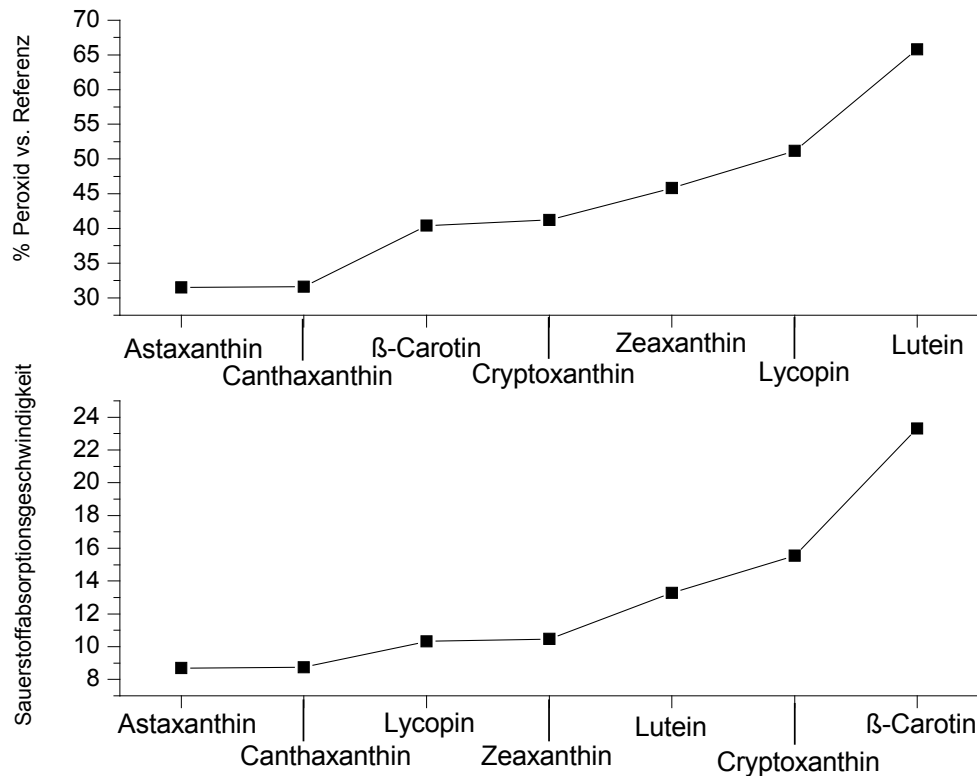


Abbildung 7.1: Auftragung Carotinoide oben in der Peroxidmessung ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/l nach 360 Minuten) und unten gegen die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten in 10^{-8} mol/l·s ($4 \cdot 10^{-4}$ mol/l bei 150 Torr)

Tabelle 7.2: Messergebnisse der 3 Messmethoden (ABTS-Assay, Messung O_2 -Verbrauch und Peroxidmethode) bei hohen Carotinoidkonzentrationen

Carotinoid	% Peroxidbildung nach 360 Minuten	O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit / 10^{-8} mol/l·s (150 Torr)	RAA(AUC)-Wert [4 min.]
Konzentration	$2 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-3}$ M	
Astaxanthin 71	11 %	8.75	(0.49*)
Zeaxanthin 69	12 %	22.26	0.79
Canthaxanthin 72	13 %	11.51	(0.61*)
Cryptoxanthin 70	18 %	28.90	1.45
β -Carotin 1	21 %	33.20	1.78
Lycopin 67	24 %	21.93	2.59
Lutein 68	40 %	17.30	1.42

*= keine Endwerte (AUC-Werte nach 4 Minuten Reaktionsdauer)

Die Abbildung 7.2 zeigt die Ergebnisse der Tabelle 7.2 in graphischer Form.

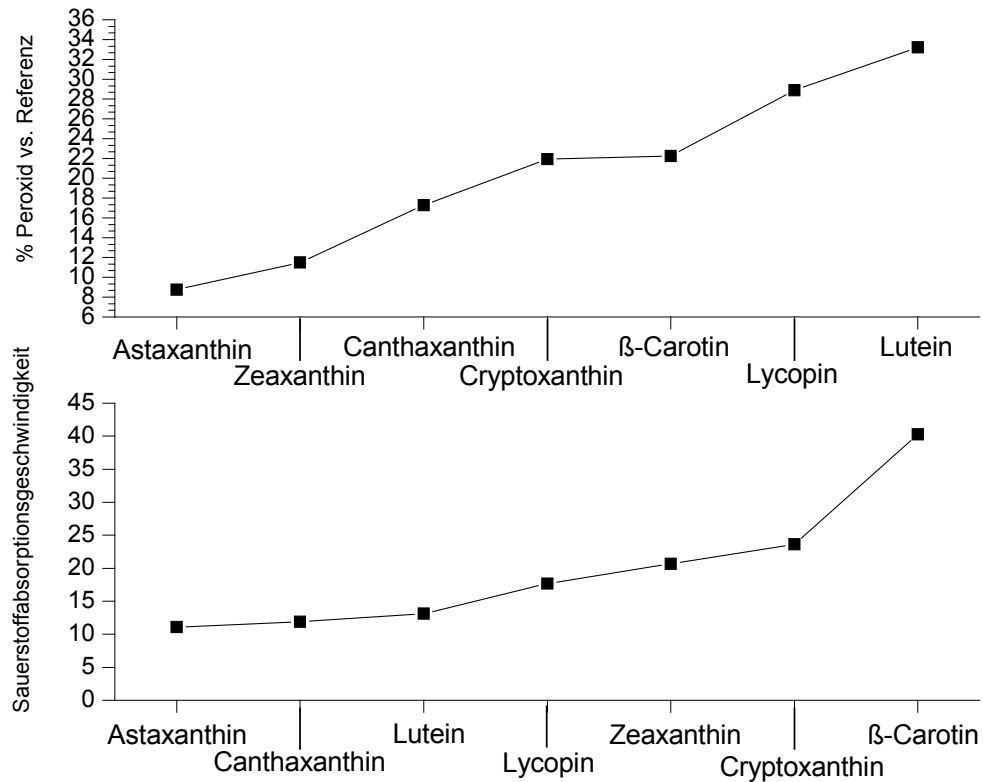


Abbildung 7.2: Auftragung Carotinoide oben in der Peroxidmessung ($2 \cdot 10^{-3}$ mol/l nach 360 Minuten) und unten gegen die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten in 10^{-8} mol/l·s ($2 \cdot 10^{-3}$ mol/l bei 150 Torr)

Fasst man die Ergebnisse der drei verwendeten Messmethoden zusammen erhält man eine hierarchische Abfolge der Carotinoide geordnet nach ihrer antioxidativen Wirksamkeit (beginnend mit der besten antioxidativen Wirksamkeit).

Astaxanthin $\geq$
 Canthaxanthin >
 Zeaxanthin >
 Lycopin >
 Cryptoxanthin $\geq$
 β -Carotin >
 Lutein*

(* aufgrund des schlechten Ergebnisses in der Cumolhydroperoxidmethode)

Man erkennt, dass in sowohl in der Peroxid- und der Sauerstoffverbrauchsmethode die carbonylsubstituierten Carotinoide in hohen und niedrigen Konzentrationen, die besten antioxidativen Wirkungen zeigen. Es folgt eine

Gruppe von Carotinoiden, bestehend aus Zeaxanthin, Lycopin, Cryptoxanthin und β -Carotin, welche eine ähnliche antioxidative Wirksamkeit besitzen. Abhängig von den Reaktionsbedingungen variiert in dieser Gruppe die antioxidative Hierarchie. Eine Ausnahme bildet die schlechte antioxidative Wirksamkeit von Lutein in der Peroxidmethode. Bei einer hierarchischen Einstufung müssen jedoch verschiedene Dinge berücksichtigt werden:

Zunächst besitzen die Messverfahren grundlegend verschiedene Reaktionsbedingungen und Messprinzipien. So ist das Oxidationspotential des delokalisierten Farbstoffradikalkations geringer als die Oxidationspotentiale reaktiver Peroxylradikale (0.68 V zu $> 0.8\text{ V}^{[118]}$). Peroxylradikale können die Polyensysteme aller Carotinoide, auch die der Oxocarotinoide, oxidieren. Zusätzlich müssen bei Reaktionen mit reaktiven Peroxylradikalen Wasserstoffabstraktionsreaktionen berücksichtigt werden.

Ferner müssen bei der Interpretation der jeweiligen Assays die unterschiedlichen Messgrößen zur Beschreibung der Abbaureaktionen berücksichtigt werden. So gibt der RAA(AUC)-Wert nur das Verhältnis an, ob Carotinoide mehr (oder weniger) ABTS-Radikalkationen pro Zeitintervall reduzieren als die Vergleichssubstanz Trolox.

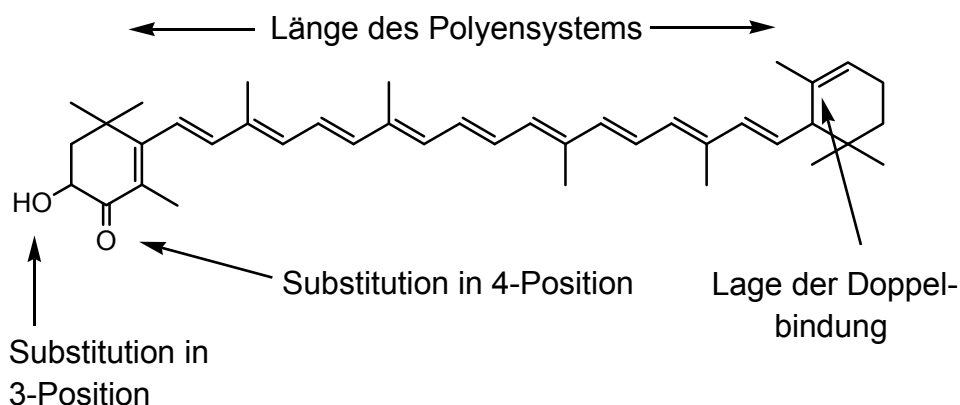
Die RAA(AUC)-Werte lassen sich daher nur indirekt mit den Ergebnissen der Peroxid- und der Sauerstoffverbrauchsmethode vergleichen, da bei diesen Verfahren relative Geschwindigkeiten an Substanzumsätzen in einer bestimmten Reaktionszeit (z.B. in $\text{mol/l}\cdot\text{s}$) verfolgt werden. Zudem sind in beiden Verfahren die Konzentrationen der beteiligten Substanzen und die Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Radikalstarter, Substrat) sehr ähnlich und am besten vergleichbar. Aus diesem Grund werden hauptsächlich die Messergebnisse der Sauerstoffverbrauchsmethode mit der Peroxidmethode verglichen. Nur dort wo die RAA(AUC)-Messungen eindeutige Beiträge liefern, werden die Werte bei der Gesamtdiskussion berücksichtigt.

Aber auch bei den Interpretationen und der Auswertung der Sauerstoffverbrauchsmethode und der Peroxidmethode sind Unterschiede zu beachten. So muss ein gewählter Auswertzeitpunkt nicht dem Endpunkt einer Reaktion in der jeweiligen Messmethode entsprechen. Es sollte zum Zeitpunkt der Auswertung bekannt sein, ob in der Reaktionslösung der Messmethode ein Carotinoid vollständig verbraucht ist, oder ob noch unverbrauchtes Carotinoid

vorhanden ist. Die Sauerstoffverbrauchsmethode wird nach einem kurzen Reaktionsintervall von 50-70 Minuten ausgewertet. Zu diesem Zeitpunkt kann noch unverbrauchtes Carotinoid im Mess-System zugegen sein. Die Peroxidmethode wird dagegen nach einer Reaktionszeit von 360 Minuten ausgewertet. Hier sind alle Carotinoide vollständig abgebaut. Mögliche antioxidative Effekt können nach 360 Minuten nur noch von Carotinoid-abbauprodukten herrühren. Daher ist es sinnvoll die Sauerstoffverbrauchsmethode als „Kurzzeit“-experiment und die Peroxidmethode als „Langzeit“-experiment zu interpretieren.

In der folgenden Diskussion soll geprüft werden, ob sich die antioxidative Wirksamkeit verschieden substituierter Carotinoide in der Sauerstoffverbrauchsmethode und der Peroxidmethode mit Substitutionsmustern in den Carotinoiden korrelieren lässt. Um antioxidative Effekte deutlich zu erkennen, werden hauptsächlich die Messungen der hohen Carotinoidkonzentration ($2 \cdot 10^{-3}$ M) interpretiert. Wahrscheinlich sind bei der Oxidation von Carotinoiden folgende Substitutionen und Einflüsse von besondere Bedeutung:

- Länge des Carotinoid-Polyensystems
- Substitution in 3- und 4- Positionen der Endgruppen (-C=O und -OH)
- Lage der Doppelbindung im Cyclohexen-Ring
- Oxidationsprodukte der Abbaureaktion (Auswertzeitpunkt)
- Wasserstoffabstraktion vs. Additionsreaktion der Peroxylradikale

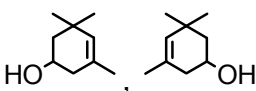
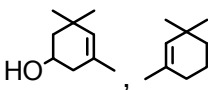
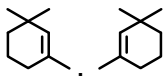


Die hohe antioxidative Wirksamkeit sowohl in der Sauerstoffverbrauchs-, wie auch in der Peroxidmethode lässt sich eindeutig für die schwerer oxidierbaren

carbonylsubstituierten Carotinoide messen. *Indirekt* zeigt dies auch der ABTS-Assay. Dies jedoch nicht über die gemessenen AUC-Werte, sondern über eine verlangsamte Oxidation aufgrund der hohen Carotinoid-Redoxpotentiale. Die Carbonylsubstitution in 4, 4'- Position in Carotinoiden bewirkt eine Steigerung der antioxidativen Wirksamkeit.

Um den Einfluss von Hydroxysubstituenten genauer zu untersuchen, wird das Zeaxanthin (2 Hydroxygruppen) mit Cryptoxanthin (1 Hydroxygruppe) und mit β -Carotin (keine Hydroxygruppe) verglichen. Die drei Carotinoide besitzen ein gleich ausgedehntes Polyensystem.

Tabelle 7.3.: Vergleich der Carotinoide Zeaxanthin, Cryptoxanthin und β -Carotin

Meßmethode/ Assay	CumolOOH- Messung	O ₂ -Verbrauchs- messung	ABTS-Assay
Carotinoid	% Peroxid (360 Minuten) $2 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-8} mol/l·s (150 Torr) $2 \cdot 10^{-3}$ M	RAA(AUC)-Wert [4 Min]
Zeaxanthin 	12 %	22.26	0.79
Cryptoxanthin 	18 %	28.90	1.45
β -Carotin 	21 %	33.20	1.78

Es läßt sich folgende antioxidative Hierarchie angeben (auf der linken Seite stehende Carotinoide zeigen sehr gutes antioxidatives Verhalten, welches zur rechten Seite immer schwächer wird):

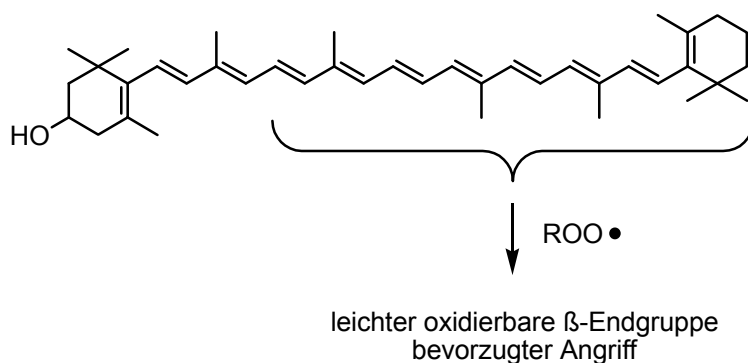


Vergleicht man die Ergebnisse der Sauerstoffverbrauchsmessung mit der Peroxidmethode wird deutlich, dass Cryptoxanthin ein sehr ähnliches antioxidatives Verhalten zum unsubstituierten β -Carotin zeigt (18% zu 21% Peroxid und 28.9 zu 33.2 10^{-8} mol/l·s O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit).

Zeaxanthin zeigt für kurze Reaktionszeiten in der Sauerstoffverbrauchsmessung ein besseres antioxidatives Verhalten als Cryptoxanthin und β -Carotin (28.9 und 33.2 zu 22.3 10^{-8} mol/l·s O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit). Ein deutlich besseres antioxidatives Verhalten als Cryptoxanthin und β -Carotin zeigt Zeaxanthin dagegen für lange Reaktionszeiten in der Cumolhydroperoxidmethode (18% und 21% zu 12% Peroxid). Auch der Vergleich der RAA(AUC)-Werte zeigt, dass der RAA(AUC)-Wert des Cryptoxanthins (1.45) dichter am RAA(AUC)-Wert des β -Carotins (1.78) liegt, als am RAA(AUC)-Wert des Zeaxanthins (0.79). Dies deutet auf eine β -Carotin-ähnliches Oxidationsverhalten des Cryptoxanthins hin. Das oxidative Verhalten von Cryptoxanthin lässt sich am besten wie folgt beschreiben:

Cryptoxanthin wird hauptsächlich über die leichter oxidierbare nicht substituierte β -Endgruppe abgebaut. Die Einführung einer Hydroxyfunktion zeigt für kurze Oxidationszeiten in der Sauerstoffverbrauchsmessung und in der ABTS-Oxidationsmethode nur eine geringe Erhöhung der antioxidativen Wirksamkeit gegenüber dem nicht substituierten β -Carotin. Nach langen Oxidationszeiten kann eine Hydroxygruppe im Cryptoxanthin nicht mehr mit den guten antioxidativen Wirksamkeiten der zwei Hydroxygruppen im Zeaxanthin konkurrieren.

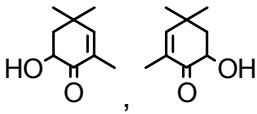
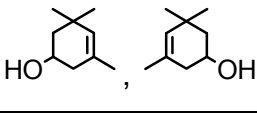
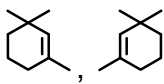
Der Abbau über die weniger stabile β -Endgruppe muss insgesamt schneller ablaufen, sodass sich die inhibierende Wirkung der einzelnen Hydroxygruppe in der Gesamtreaktion nicht mehr zeigt.



Damit kann auch festgehalten werden, dass es keinen einfachen additiven Zusammenhang zwischen der antioxidativen Wirkung und der Anzahl der eingeführten Hydroxygruppen in ein Carotinoid gibt. Vermutlich ist eine unsymmetrische Substitution in einem Carotinoid sogar ungünstig für eine antioxidative Gesamtwirkung.

Die Substitutionsmuster der Carotinoide Astaxanthin, Zeaxanthin und β -Carotin werden miteinander verglichen.

Tabelle 7.4.: Vergleich der Carotinoide Astaxanthin, Zeaxanthin und β -Carotin

Meßmethode/ Assay	CumolOOH- Messung	O ₂ -Verbrauchs- messung	ABTS-Assay
Carotinoid	% Peroxid (360 Minuten) $2 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-8} mol/l•s (150 Torr) $2 \cdot 10^{-3}$ M	RAA(AUC)-Wert [4 Min]
Astaxanthin 	11 %	8.75	(0.49)
Zeaxanthin 	12 %	22.26	0.79
β -Carotin 	21 %	33.20	1.78

Die antioxidative Hierarchie läßt sich wie folgt angeben: (auf der linken Seite stehende Carotinoide zeigen sehr gutes antioxidatives Verhalten, welches zur rechten Seite immer schwächer wird)

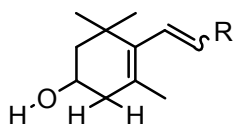


β -Carotin besitzt keine Substituenten in den zyklischen Endgruppen. Durch das Fehlen von Carbonylgruppen besitzen β -Carotin und Zeaxanthin ein geringeres Oxidationspotential als Astaxanthin. β -Carotin und Zeaxanthin sind leichter oxidabel als Astaxanthin. β -Carotin zeigt jedoch, verglichen mit Zeaxanthin, eine höhere Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit (33.20 zu $22.26 \cdot 10^{-8}$ mol/l•s O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit) und auch eine geringere Inhibition in der Cumuloxidation nach 360 Minuten (21% zu 12% Peroxid). β -Carotin und Zeaxanthin besitzen dabei ein gleich ausgedehntes Polyensystem. Um ein unterschiedliches antioxidatives Verhalten zu erklären, muss es einen Einfluß durch die eingeführten Hydroxygruppen geben. Berücksichtigt man, dass die Sauerstoffverbrauchsmessung ein „Kurzzeit“-experiment darstellt (Intervall 50-

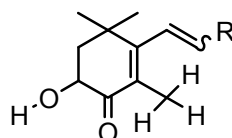
70 Minuten), wird das Astaxanthin in diesem Zeitraum aufgrund des hohen Oxidationspotentials kaum oxidiert. Der langsame Abbau von Astaxanthin zeigt sich in der kleinen Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit von ($8.75 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}\cdot\text{s}$ O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit). Bei Zeaxanthin ist die Abbaureaktion aufgrund des geringeren Oxidationspotentials weiter fortgeschritten und man findet einen schnelleren Sauerstoffverbrauch von ($22.26 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}\cdot\text{s}$ O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit). Noch weiter fortgeschritten ist die Oxidation für das β -Carotin mit einer Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit von ($33.20 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}\cdot\text{s}$ O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit). Nach 360 Minuten sollten Astaxanthin wie auch Zeaxanthin bereits vollständig abgebaut sein. Zu diesem Zeitpunkt wird die Cumuloxidation für beide Carotinoide aber ähnlich stark inhibiert (11% zu 12% Peroxid). Eine Inhibition der Cumuloxidation kann in diesem „Langzeit“-experiment jedoch nur noch über entsprechende Carotinoidabbauprodukte erklärt werden.

Die entstandenen Abbauprodukte besitzen stark verkürzte Polyensysteme (z.B. Retinal, Ionon), welche zunehmend schwerer zu oxidieren sind.

Wasserstoffabstraktionen an sekundären Hydroxylgruppen sollten auch bei hohen Reaktionszeiten nur geringe Unterschiede im antioxidativen Verhalten zwischen Zeaxanthin und Astaxanthin zeigen. Eine H-O-Wasserstoffabstraktion ist deutlich schwerer, als eine Wasserstoffabstraktion an sekundären Methylengruppen der Carotinoid-Endgruppen. Zudem wird die H-O-Wasserstoffabstraktion nicht durch die Länge des Polyensystems (Abbaugrad) beeinflusst. α -hydroxyständige C-H-Wasserstoffatome sind dagegen leichter abstrahierbar. Die H-Abstraktionen im Zeaxanthin verlaufen dabei schneller als die H-Abstraktionen im Astaxanthin. Wasserstoffabstraktionsreaktion in den -C-H-Endgruppen führen zu Kohlenstoff-Radikalen, welche nicht in Konjugation zur Polyenkette stehen.



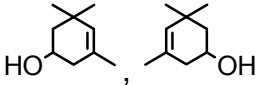
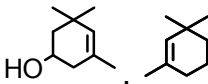
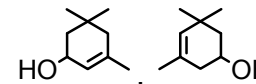
leichter zu abstrahieren



schwerer zu abstrahieren

Um den Einfluss der Hydroxylgruppen weiter quantifizieren zu können, werden die Carotinoide Zeaxanthin, Lutein und Cryptoxanthin miteinander verglichen.

Tabelle 7.5.: Vergleich der Carotinoide Zeaxanthin, Cryptoxanthin und Lutein

Meßmethode/ Assay	CumolOOH- Messung	O ₂ -Verbrauchs- messung	ABTS-Assay
Carotinoid	% Peroxid (360 Minuten) 2•10 ⁻³ M	10 ⁻⁸ mol/l•s (150 Torr) 2•10 ⁻³ M	RAA(AUC)-Wert [4 Min]
Zeaxanthin 	12 %	22.26	0.79
Cryptoxanthin 	18 %	28.90	1.45
Lutein 	40 %	17.30	1.42

Lutein besitzt wie das Zeaxanthin zwei Hydroxygruppen. Einer der Lutein-Cyclohexenringe enthält jedoch eine Doppelbindung, welche nicht in Konjugation zum Luteinpolyensystem steht.

Die drei Carotinoide lassen sich bezüglich ihrer antioxidativen Wirksamkeit nur schwer hierarchisch einordnen.

Von besonderem Interesse ist aber das sehr unterschiedliche Verhalten der beiden Dihydroxycarotinoide Zeaxanthin und Lutein in der Sauerstoffverbrauchs-messung und der Peroxidmethode. So zeigen Zeaxanthin und Lutein sehr ähnliche Sauerstoffabsorptionsgeschwindigkeiten (22.26 zu 17.30 10⁻⁸ mol/l•s O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit). In der Peroxidmethode dagegen ist die antioxidative Wirksamkeit von Lutein erheblich schlechter als die von Zeaxanthin (12% zu 40% Peroxid).

Erneut lassen sich die Ergebnisse am besten verstehen, wenn die Abbaureaktion in Abhängigkeit der Reaktionszeit diskutiert wird.

Betrachtet man im „Kurzzeit“-experiment zunächst die Addition von Peroxylradikalen an das Zeaxanthin- und das Luteinpolyensystem, so sollten

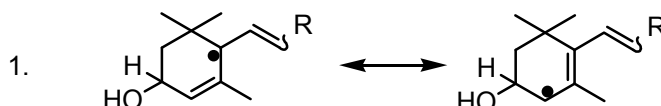
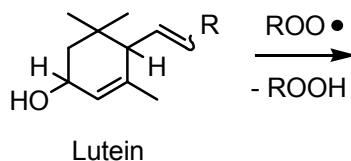
sich nur geringe Unterschiede für die Geschwindigkeiten in der Peroxylradikal-Addition ergeben. Die Additionsreaktionen von Zeaxanthin und Lutein wird anhand der beiden Trimethylcyclohexenyl-Endgruppen **110** (Zeaxanthin) und **111** (Lutein) gezeigt. Lutein besitzt ein um eine Doppelbindung verkürztes Polyensystem. Dadurch sollte Lutein ein etwas höheres Redoxpotential als Zeaxanthin aufweisen. Die Addition von Peroxylradikalen an das Zeaxanthin erfolgt etwas schneller.



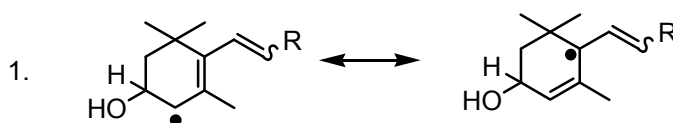
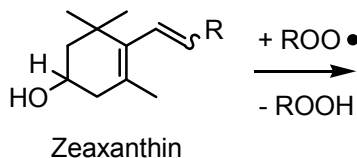
Der Abbau der β -Endgruppe **110** erfolgt über Addition eines Peroxylradikals an 5-Position des Cyclohexenrings. Die Position 5 wird aus 2 Gründen bevorzugt angegriffen. Der sterische Anspruch des Polyenkettensubstituenten in 6-Position der β -Endgruppe ist größer als der sterische Anspruch der Methylgruppe in 5-Position. Zudem ist die Resonanzstabilisierung des an 5-addierten Radikals größer. Die berechnete Bildungswärme des 5-Addukts ist mit -277.9 kJ/mol um 15 kJ/mol energieärmer als die Bildungswärme des 6-Addukts mit -263.2 kJ/mol ^[119]. Peroxylradikale im Lutein sollten bevorzugt an der 4-Position der Endgruppe **111** addieren. Das entstandene Luteinperoxylradikal besitzt keine Resonanzstabilisierung, wie das an 5-Position addierte Peroxylradikal im Zeaxanthin.

Betrachtet man nun die Wasserstoffabstraktion, ergeben sich für Lutein und Zeaxanthin deutlich verschiedene Reaktionen. Die Wasserstoffabstraktion sollte besonders leicht für allylständige Wasserstoffatome sein. In Carotinoiden sind dies die Wasserstoffatome der Methylgruppen in der Polyenkette, sowie die allylischen Wasserstoffatome der Endgruppen. Da beide Carotinoide gleiche Anzahl (und Positionen) an polyenischen Methylgruppen besitzen, sollten unterschiedliche antioxidative Wirksamkeiten auf spezifischen Abstraktionen in den Endgruppen beruhen.

Wasserstoffabstraktionen in der 3-Hydroxy-1,1,5-trimethylcyclohex-4-en-6-yl-Endgruppe (ε -Endgruppe):



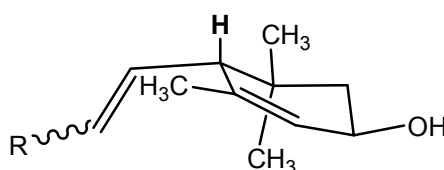
Wasserstoffabstraktion in der 3-Hydroxy-1,1,5-trimethylcyclohex-5-en-6-yl-Endgruppe (β -Endgruppe):



In der Kurzzeitreaktion (O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit) konkurrieren Lutein und Zeaxanthin erfolgreich miteinander. Dies bedeutet für die Abbaureaktion, dass die unterschiedlichen Wasserstoffabstraktionen und Radikaladditionen mit ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeiten ablaufen.

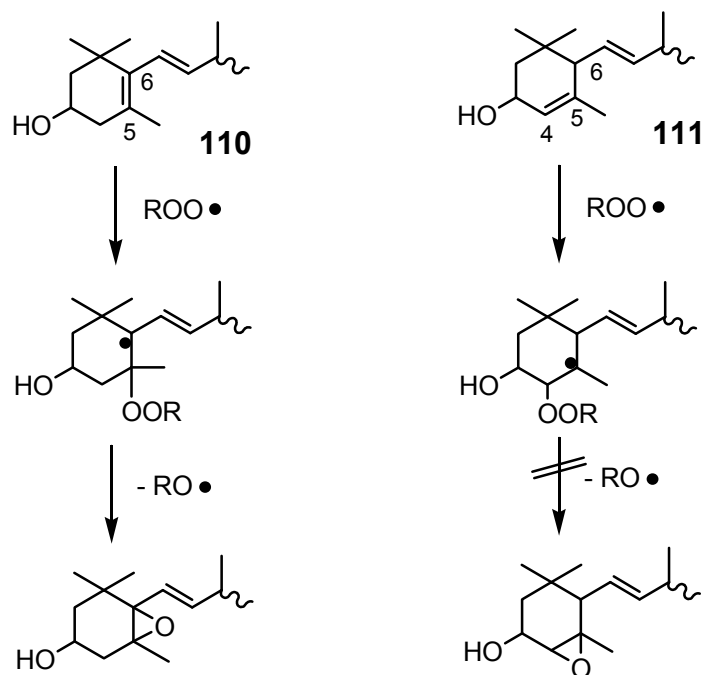
Die Ergebnisse des Langzeitexperiments (Cumolhydroperoxidbildung) zeigen, dass es im Verlauf der Luteinoxidation zu Rückreaktionen bzw. ausbleibenden Reaktionen kommt.

Der weniger effiziente Abbau von Lutein kann möglicherweise über vermehrte Wasserstoffabstraktion in der ε -Luteinendgruppe **111** am doppelt-allylischen Wasserstoffatom 6 (fett) erklärt werden.



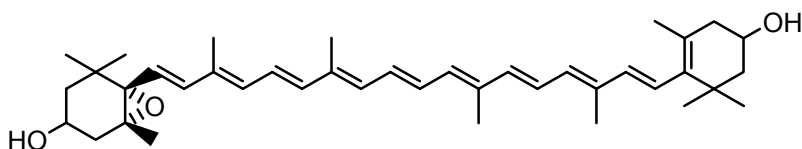
Bei dieser Abstraktionsreaktion entsteht ein Radikal, welches direkt in die Polyenkette des Luteins delokalisieren kann. In Carotinoiden wie Zeaxanthin mit 3-Hydroxy-1,1,5-trimethylcyclohex-5-en-6-yl-Endgruppe (β -Endgruppe) ist diese Endgruppe zu etwa 50° verdreht zur Polyenkette angeordnet. Die 3-Hydroxy-1,1,5-trimethylcyclohex-4-en-6-yl-Endgruppe im Lutein **111** (ε -Endgruppe) ist dagegen am C-Atom 6 sp^3 -hybridisiert. Damit ist **111** deutlich weniger zur Polyenkette verdreht angeordnet, als Endgruppe **110**. Dies hat zur Folge, dass das doppelt-allylische H-Atom 6 (fett) aus sterischen und elektronischen Gründen leicht abstrahiert werden kann. Das entstandene Pentadienyl-Radikal kann nun, aufgrund der fehlenden Verdrehung gut in die Polyenkette delokalisieren. Da Lutein nur eine solche Endgruppe besitzt, zeigen sich die moderate Effizienzen (40% Peroxid) erst bei längeren Reaktionszeiten.

Der Lutein- ε -Endgruppe fehlt zudem eine weitere wichtige antioxidative Reaktion für lange Reaktionszeiten nach Peroxylradikaladdition. β -Endgruppen wie **110** bilden in der Abbaureaktion epoxidtragende Endgruppen aus. In dieser Reaktion wird aus einem reaktiven kettentragenden Peroxylradikal ein weniger reaktives kettentragendes Oxyradikal gebildet. Der ε -Luteinendgruppe **111** scheint dieser Reaktionspfad zu fehlen, vermutlich auch, weil die ε -Endgruppe eine weniger nucleophile Doppelbindung besitzt als die β -Endgruppe.



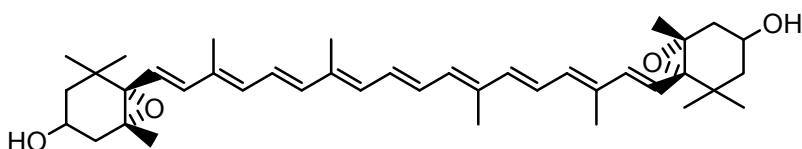
Dass eine 4,5-Epoxidierung im Gegensatz zur 5,6-Epoxidierung nicht möglich ist, wird durch den Nachweis unterschiedlicher Epoxidierungsprodukte der entsprechenden Endgruppen gestützt. So wurden folgende in-vivo und in-vitro Oxidationsprodukte isoliert und beschrieben.

Als Reaktionsprodukte des Zeaxanthins ist sowohl das 5,6- Monoepoxid **112** (Antheraxanthin^[120,121]) bekannt,



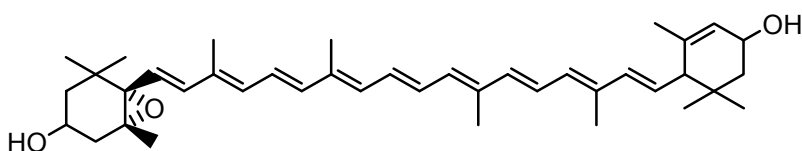
112

als auch das 5,6 - 5',6'-Diepoxid **113** (Violaxanthin^[122,123]).



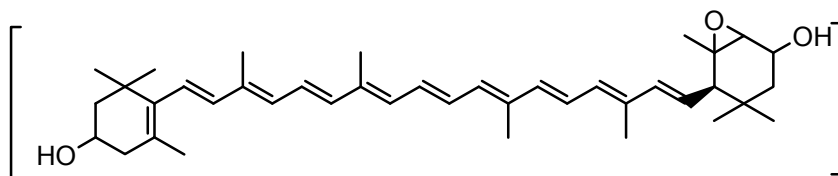
113

Beim Lutein ist dagegen nur das 5,6- Monoepoxid **114** (Taraxanthin^[124,125]) beschrieben.



114

Ein 4,5-Monoepoxid **115** des Luteins wurde bis heute nicht nachgewiesen.

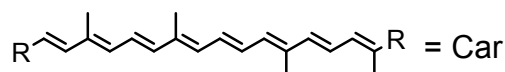


115

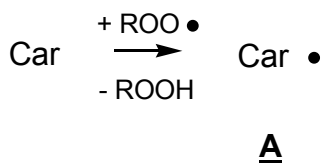
Im Folgenden soll ein Carotinoidabbauschema entwickelt werden, welches das Verhalten von Carotinoiden in radikalischen Abbaureaktionen und die zahlreichen Produkte erklären kann. Für radikalische Reaktion in der Langzeitreaktion wird vorausgesetzt, dass die Carotinoide in einer radikalischen

Kettenreaktion abgebaut werden. Dabei sollte die Addition von Carotinoidperoxyradikalen an das intakte Carotinoidpolyensystem die Hauptreaktion darstellen. Zu späteren Reaktionszeitpunkten sollten die Starterperoxyradikale durch Carotinoidperoxyradikale als Radikalkettenträger ersetzt sein. Weiterhin soll die Bildung der wichtigen Carotinoid-Oxidationsprodukte (Apo-Carotinale und Carotinoidepoxide ^[4,5,6,8,9,10,11]) erklärt werden.

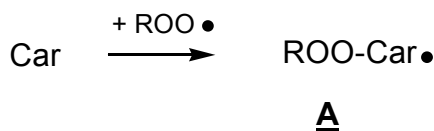
Start des Reaktionsschemas ist die Erzeugung eines kohlenstoffzentrierten Carotinoidradikals A. Dieses kann durch die beiden schon diskutierten Reaktionen der Wasserstoffabstraktion durch (Starter-)Peroxyradikale, oder Addition von (Starter-)Peroxyradikalen gebildet werden. Stellvertretend für eine Vielzahl an möglichen Carotinylnradikalen ist im Schema ein kohlenstoffzentriertes Carotinylnradikal Car• A als Startradikal gezeigt.



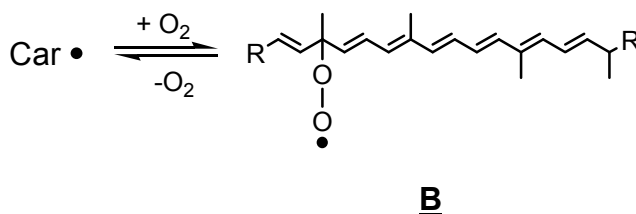
1. Wasserstoffabstraktion (Endgruppe)



2. Radikaladdition

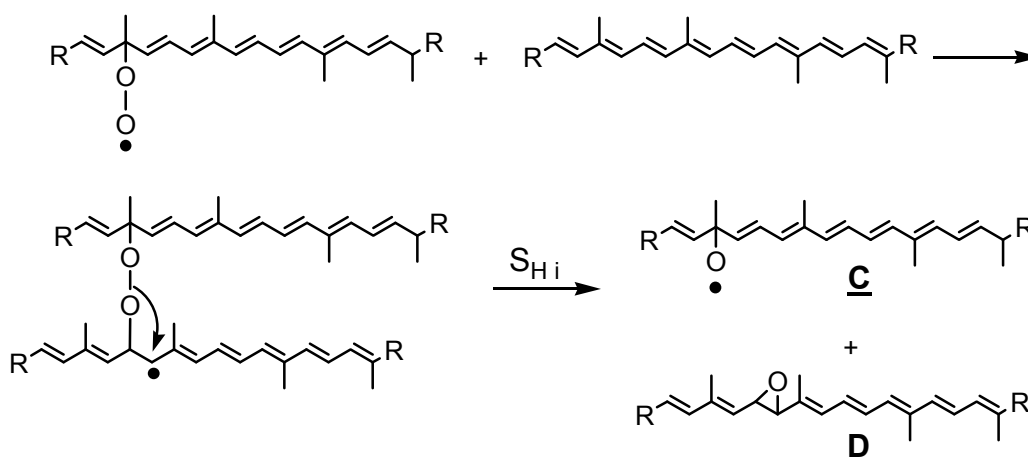


Das kohlenstoffzentrierte Carotinylnradikal A bildet mit Sauerstoff ein Carotinoidperoxyradikal B.

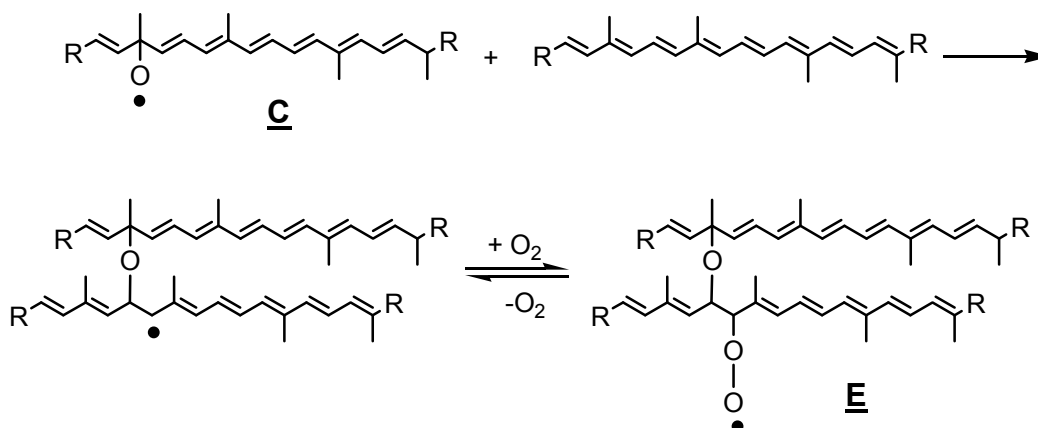


Im nächsten Schritt addiert das Carotinoidperoxyradikal B an ein weiteres Carotinoidmolekül. Erneut bildet sich ein kohlenstoffzentriertes Carotinylnradikal. Dieses zerfällt in einer intramolekularen homolytischen Substitutionsreaktion

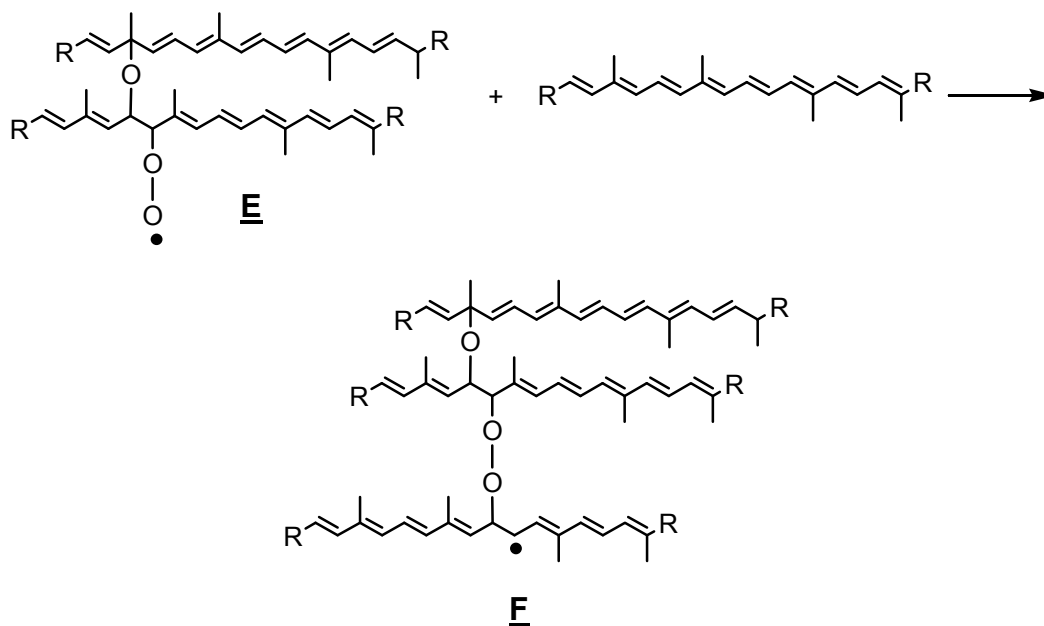
(S_{Hi})^[126] unter Bildung eines Carotinoxylradikals C und eines Carotinoidepoxids D. Das Carotinoidepoxid D stellt ein stabiles Endprodukt dar.



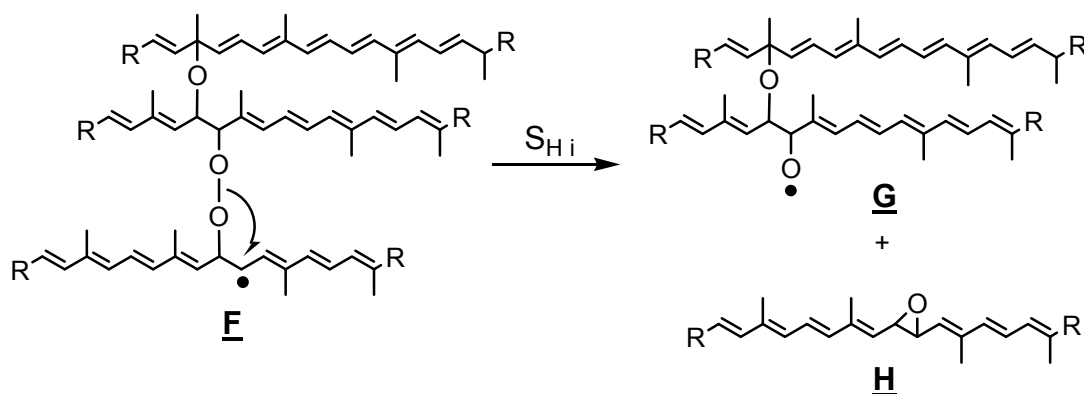
Für ungesättigte Verbindungen, die hauptsächlich über Addition von Radikalen reagieren, stellt die intramolekulare homolytische Substitutionsreaktion S_{Hi} eine der wichtigsten kettenübertragenden Reaktion dar. Erstmals beschrieben wurde sie von Mayo^[127] bei der radikalischen Oxidation von Styrol. Die leicht homolytisch spaltbare O-O-Bindung ($E_a \sim 200$ kJ/mol) generiert ein Carotinoxylradikal C. Dieses Radikal besitzt prinzipiell zwei Reaktionsmöglichkeiten. Das Carotinoxylradikal kann über Wasserstoffabstraktion Alkohole (Car-OH) bilden. Durch das Fehlen von charakteristischen 4,4'-Hydroxycarotinoiden^[5], scheint diese Reaktion unwahrscheinlich. Offenbar reagiert das Carotinoxylradikal C bevorzugt über Addition an ein Carotinoidmolekül. Das intermediäre Carotinylnradikal bildet mit Sauerstoff ein doppelschichtiges Carotinoidperoxyradikal E.



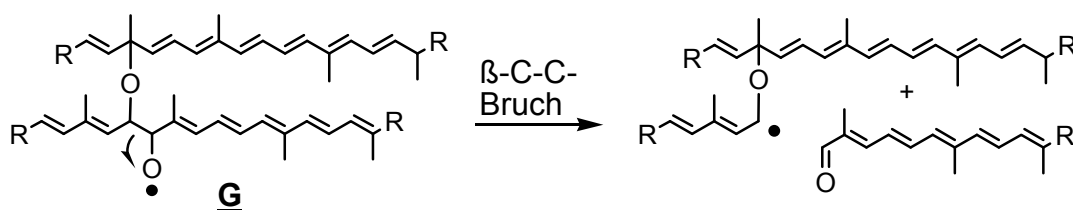
Das dimere Carotinoidperoxyradikal E addiert ein weiteres Molekül Carotinoid unter Bildung eines trimeren Carotinylnradikals F.



Das Carotinylnradikal **E** zerfällt über eine erneute intramolekulare homolytische Substitutionsreaktion (S_{Hi}) in ein dimeres Carotinoxylradikal **G** und in ein weiteres Molekül Carotinepoxid **H**. Damit kann dieses Schema auch die Bildung von oligomeren Carotinoidoxiden bzw. Carotinoidperoxiden erklären, wie sie von Burton^[128] publiziert wurden.

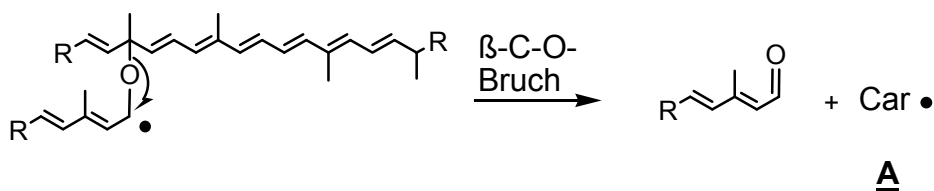


Der weitere Zerfall des Carotinoxylradikal **G** generiert weitere wichtige Carotinoidoxidaionsprodukte.



Über die homolytische Spaltung der Kohlenstoffbindung in Nachbarschaft des Oxyradikals wird ein Molekül Apo-Carotinal erzeugt. Der weitere Zerfall des

Carotinoxylradikals **G** erzeugt ein weiteres Molekül Apo-Carotinal unter Homolyse der benachbarten Kohlenstoff-Sauerstoffbindung.



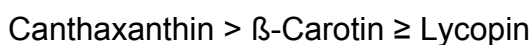
Die Reaktion bildet ein kohlenstoffzentriertes Carotinyradikal Car• **A** zurück, welches als Startradikal einen neuen Carotinoxidationszyklus initiieren kann.

Ein weiterer Vergleich der antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden erfolgt für das offenkettige Lycopin und dem carbonylsubstituierten Canthaxanthin und dem bicyclischen β-Carotin.

Tabelle 7.6.: Vergleich der Carotinoide Canthaxanthin, Lycopin und β-Carotin

Meßmethode/ Assay	CumolOOH- Messung	O ₂ -Verbrauchs- messung	ABTS-Assay
Carotinoid	% Peroxid (360 Minuten) 2·10 ⁻³ M	10 ⁻⁸ mol/l·s (150 Torr) 2·10 ⁻³ M	RAA(AUC)-Wert [4 Min]
Canthaxanthin 	13 %	11.51	(0.61)
β-Carotin 	21 %	33.20	1.78
Lycopin 	24 %	21.93	2.59

Es lässt sich folgende antioxidative Hierarchie angeben:

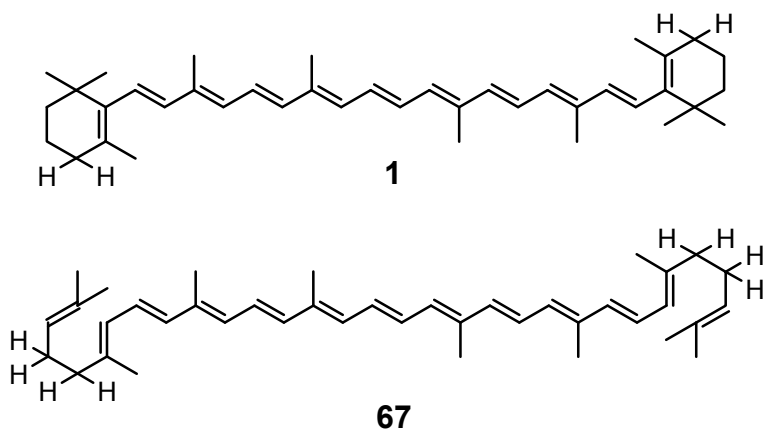


Von diesen drei Carotinoiden besitzt nur Canthaxanthin zwei Carbonylgruppen in 4, 4'-Position. Durch die elektronegativen Carbonylsubstituenten ist die

Elektronendichte im Canthaxanthin-Polyensystem gering. Canthaxanthin besitzt das höchste Redoxpotential der drei Carotinoide. Sowohl in der Sauerstoffverbrauchsmessung, wie auch in der Peroxidmethode besitzt Canthaxanthin die beste antioxidative Wirkung.

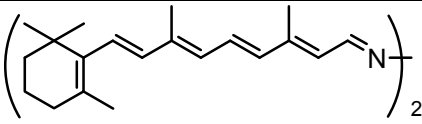
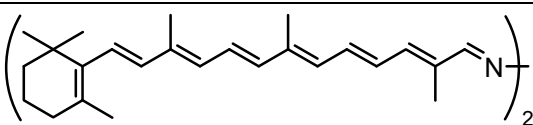
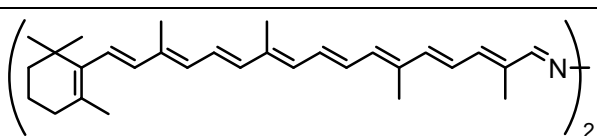
Von besonderem Interesse ist der Vergleich von Lycopin und β -Carotin. Es zeigt sich, dass Lycopin in der Sauerstoffdruckmethode die bessere antioxidative Wirkung gegenüber β -Carotin zeigt. In der Langzeitmessung besitzt β -Carotin eine geringfügig bessere, aber vergleichbare antioxidative Wirkung zum Lycopin. Für lange Oxidationszeiten scheint eine ringförmige Carotinoidstruktur Vorteile zu bieten, indem der Radikalabbau zu stabileren Endprodukten (Apo-Carotinalen und Epoxiden) führt.

Die für kürzere Oxidationszeiten deutlich bessere antioxidative Wirkung des Lycopins entstammt einmal dem niedrigeren Redoxpotential des Lycopins und den vermehrten allylischen Wasserstoffatomen infolge der zwei isolierten Doppelbindungen des Lycopins.



8. Zusammenfassung

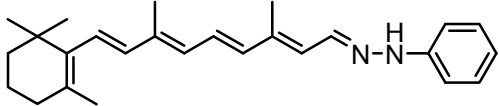
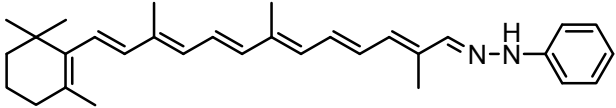
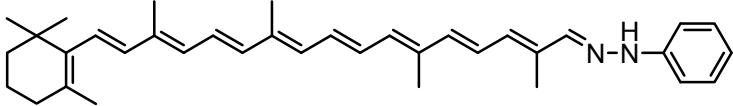
Im synthetischen Teil dieser Arbeit wurden folgende bisher nicht bekannte Carotinoidazine **77**, **78** und **79** dargestellt.

Nr.	Verbindung	λ_{max} (Ethanol)
77		460 nm
78		490 nm
79		518 nm

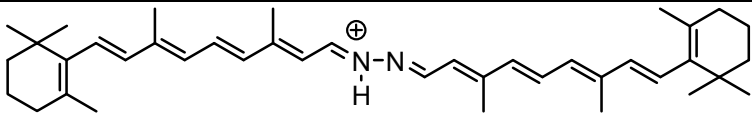
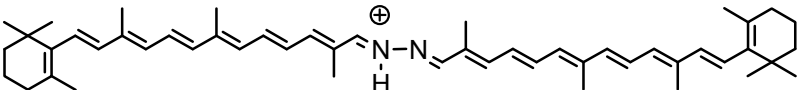
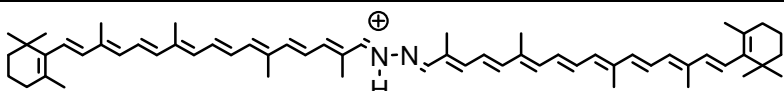
Neben der Analytik der Carotinoidazine wurden insbesondere n/π -Wechselwirkungen in den Molekülen diskutiert, sowie der Einfluss auf die UV-Vis-Spektren der Carotinoidazine. Carotinoidazine zeigen jedoch nur geringfügig bathochromere Absorptionsspektren als die entsprechenden Carotinoide. Mit Hilfe von semiempirischen Berechnungen wurde zunächst das konformative Verhalten an Modellverbindungen und dann an den Carotinoidazinen **77**, **78** und **79** untersucht. Als die stabilsten Konformationen der Carotinoidazine wurden die antiperiplanaren Konformere berechnet. Es sind damit keine n/π^* -Wechselwirkungen in Carotinoidazinen zu berücksichtigen und es gibt nur geringe konformative Einflüsse auf die UV-Vis-Spektren der Carotinoidazine. Bemerkenswert bleibt der geringe Energieunterschied von anti- zu verdrehtem Konformer ($\approx 100^\circ$) im Retinalazin **77** berechnet auf etwa 6 kJ/mol.

Weiterhin wurden die Carotinoidphenylhydrazone **90**, **91** und **92** synthetisiert. Auch bei diesen Molekülen wurde das konformative Verhalten durch semiempirische Berechnungen an der zentralen Stickstoff- und Kohlenstoffbindung untersucht. Anhand von Berechnungen an Modellphenylhydrazonen und Carotinoidphenylhydrazonen konnte gezeigt werden, dass

Phenylhydrazone von komplexen Amino-/Imin- Wechselwirkungen dominiert werden. Auch in Carotinoidphenylhydrazonen existieren damit nur geringe n/ π -Wechselwirkungen. Bei Carotinoidphenylhydrazonen gibt es keinen signifikanten konformativen Einfluß auf die entsprechen Phenylhydrazon UV-Vis-Spektren.

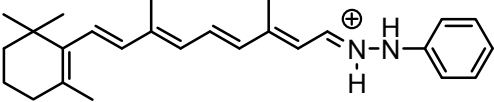
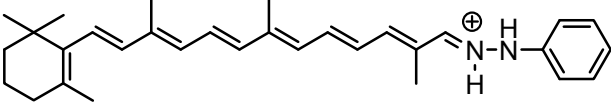
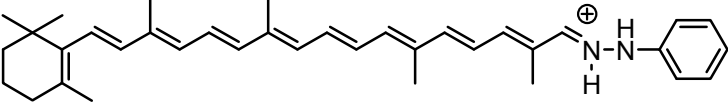
Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ (Hexan)	$\lambda_{\max}$ (CHCl ₃)
90		396 nm	418 nm
91		435 nm	446 nm
92		464 nm	478 nm

Eine weitere spektrale Besonderheit der Carotinoidazine und der Carotinoidphenylhydrazonen ist ihre ausgeprägte Acidochromie. Die bathochromen Absorptionsmaxima der monoprotonierten Carotinoidazine **94**, **95** und **96** wurden bestimmt.

Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ (Ethanol)
94		559.9 nm
95		617.8 nm
96		638 nm*

* = schwerlöslich

Auch die bathochromen Absorptionsmaxima der protonierten Carotinoid-phenylhydrazone **97**, **98** und **99** wurden bestimmt.

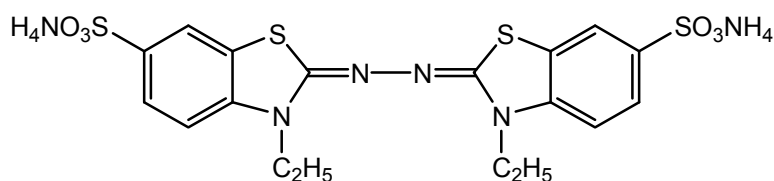
Nr.	Verbindung	$\lambda_{\max}$ (Ethanol)
97		458.4
98		506.0
99		516.7

Die Farbvertiefung in saurem Milieu kann am besten über die Ausbildung von ausgedehnten Polyenkationen erklärt werden. Die ausgebildeten polymethinartigen Strukturen der Carotinoidazine und der Carotinoidphenylhydrazone sind strukturell und energetisch sehr ähnlich. In beiden Systemen kommt es, typisch für polymethinartige Moleküle, im Bereich der positiven Ladung zu einem Ausgleich der Bindungswinkel und Bindungslängen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bathochromie für die azinischen und phenylhydrazonischen Carotinoide energetisch sehr ähnlich ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die antioxidativen Eigenschaften verschiedener Carotinoide mit den folgenden drei Meßmethoden bestimmt:

1. ABTS-Assay

Der ABTS-Assay basiert auf der Ein-Elektronenübertragungsreaktion der Carotinoide auf die blau-grün gefärbten Radikalkationen des Farbstoffes **100**. Diese Reaktion wird spektroskopisch verfolgt.



100

Zudem wurden zwei weitere antioxidative Meßmethoden angewendet, in denen die antioxidative Wirkung der Carotinoide auf die Inhibition der Cumoloxidation gemessen werden.

2. Sauerstoffverbrauchsmessung

3. Cumolhydroperoxidinhibition

In der folgenden Tabelle sind die Carotinoide und die erhaltenen Messergebnisse abgebildet:

Carotinoid	ABTS-Assay RAA(AUC)-Wert [4 Min.]	10^{-8} mol/l·s (150 Torr) Konz. $2 \cdot 10^{-3}$ M	% Peroxidbildung (360 Minuten) Konz. $2 \cdot 10^{-3}$ M
Astaxanthin	(0.49)	8.75	11 %
Canthaxanthin	(0.61)	11.51	13 %
Zeaxanthin	0.79	22.26	12 %
Lutein	1.42	17.30	40 %
Cryptoxanthin	1.45	28.90	18 %
β -Carotin	1.78	33.20	21 %
Lycopin	2.59	21.93	24 %

() = im ABTS-Assay nicht zugängliche Carotinoide

Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde festgestellt, dass der ABTS-Assay nur bedingt für eine Messung von Carotinoiden in einem wässrigen-ethanolischen Medium geeignet ist. Für die carbonylhaltigen Carotinoide Canthaxanthin und Astaxanthin ist der ABTS-Assay, aufgrund ihrer zu hohen Oxidationspotentiale, gänzlich ungeeignet. Für die Durchführung der Messung wurde einige Verbesserungen vorgeschlagen. Dabei ist besonders der exakte Einsatz molekularer Verhältnisse von Farbstoff und Oxidationsmittel hervorzuheben und die Beachtung der stöchiometrischen Reaktionsverhältnisse, insbesondere bei Verwendung von Trolox als Referenzsubstanz. Der ABTS-Assay sollte, aufgrund der Schnelligkeit und des geringen apparativen Aufbaus am besten als antioxidativer Schnelltest verwendet werden.

Die weiteren Meßmethoden, die Sauerstoffverbrauchsmessung und die Cumolhydroperoxidinhibition wurden differenziert interpretiert. Da die Sauerstoffmethode nach dem Reaktionsintervall von 50-70 Minuten

ausgewertet wird, die Cumolhydroperoxidmethode aber nach 360 Minuten, werden beide Messungen bei der Interpretation in Kurzzeit- und Langzeitmessungen unterteilt. Zusätzlich werden bei der Interpretation von Kurz- und Langzeit-Messungen konkurrierende Wasserstoffabstraktionsreaktionen und Radikaladditionsreaktionen unterschieden.

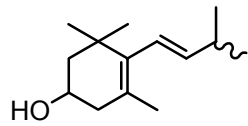
Es wurde eine Korrelation zwischen verschiedenen Substitutionen in Carotinoiden und der antioxidativen Wirkweise im Carotinoid hergestellt. So führt die Carbonylgruppensubstitution in 4 und 4'-Position in den Carotinoiden Astaxanthin und Canthaxanthin zu einer Verringerung der Elektronendichte im Polyensystem. Daher besitzen Astaxanthin und Canthaxanthin hohe Oxidationspotentialen und die besten antioxidativen Wirksamkeiten, da sie höhere Stabilitäten in Oxidationsprozessen aufweisen und länger als Antioxidantien zu Verfügung stehen.

Carotinoide, welche in 3 und 3'-Position Hydroxygruppen tragen, zeigen durchschnittlich gute antioxidative Wirksamkeiten. Dabei stehen die Hydroxygruppen nicht in Konjugation zum polyenischen Doppelbindungssystem. Hydroxygruppen zeigen ihre volle antioxidative Wirksamkeit erst zu späten Reaktionszeitpunkten, da die Hydroxyfunktionen in den entsprechenden Polyenabbauprodukten erhalten sein können, und ihre antioxidative Wirksamkeit auch zu späteren Reaktionszeitpunkten zeigen.

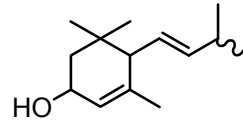
Cryptoxanthin trägt nur eine Monohydroxysubstitution. Die antioxidative Wirksamkeit liegt zwischen der antioxidativen Wirksamkeit von β -Carotin und der Wirksamkeit der Dihydroxyverbindung Zeaxanthin. Es besteht aber kein einfacher additiver Zusammenhang zwischen der Anzahl von Hydroxygruppen und der antioxidativen Wirkung von Hydroxy-Carotinoiden.

Der Vergleich zwischen β -Carotin und Lycopin zeigt, dass Carotinoide mit zyklischen Endgruppe gelegentlich etwas bessere antioxidative Wirksamkeit besitzen können als Carotinoide mit offenkettigen Endgruppen, was wahrscheinlich mit der Stabilität der Carotinoide selbst und ihrer Abbauprodukte zusammenhängt. In Redoxprozessen mit 1-Elektronentransfer dominiert allerdings das Lycopin mit überlegener reduzierender Wirkung.

Der Vergleich zwischen Zeaxanthin und Lutein zeigt, dass Carotinoide mit ϵ -Endgruppen in Langzeitreaktionen deutlich schlechteres antioxidatives Verhalten zeigen, als Carotinoide mit β -Endgruppen.

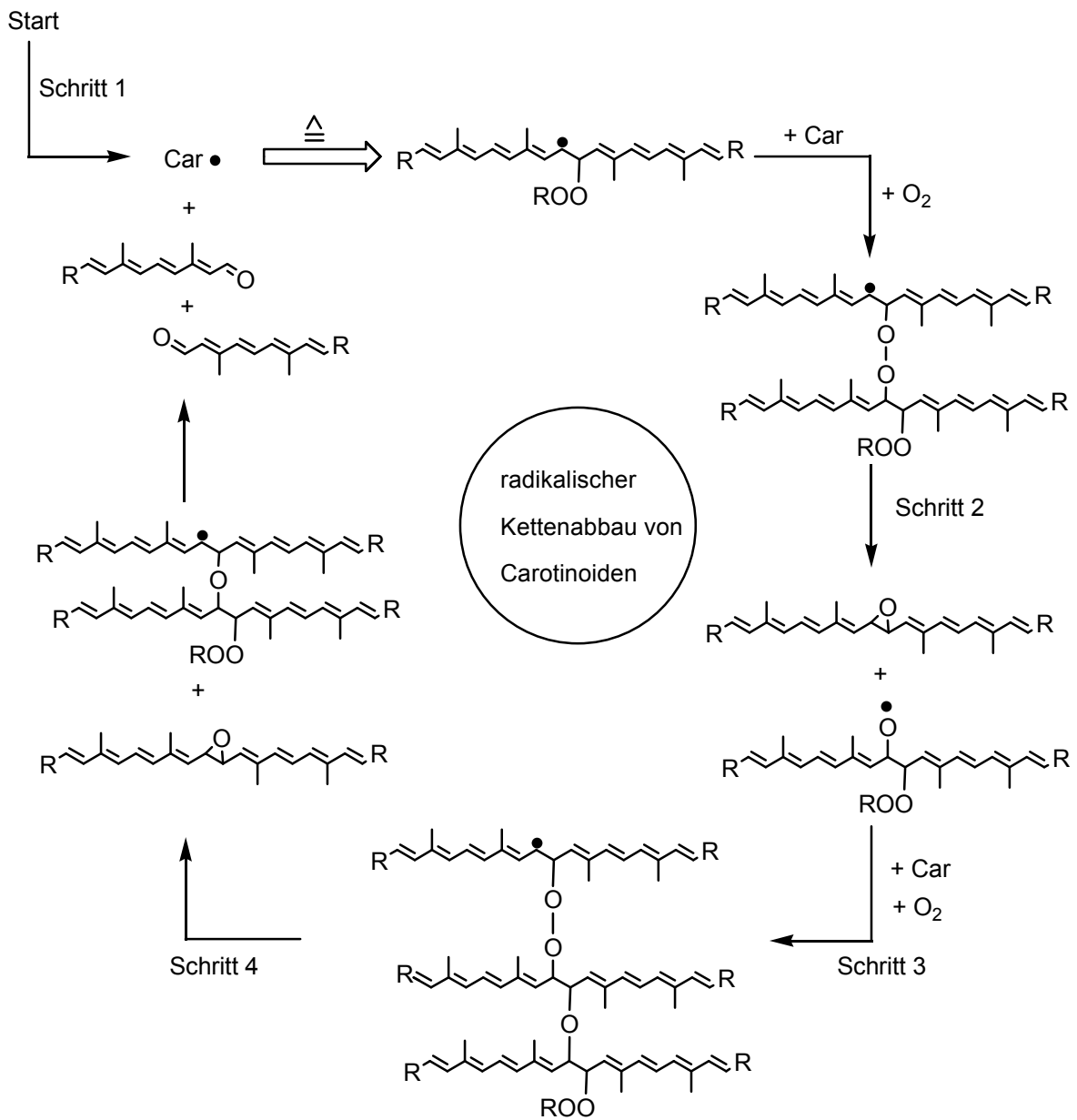


β -Endgruppe



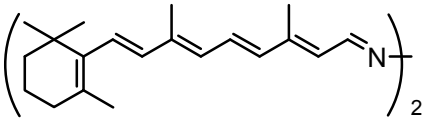
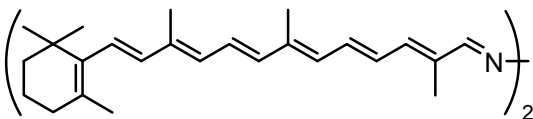
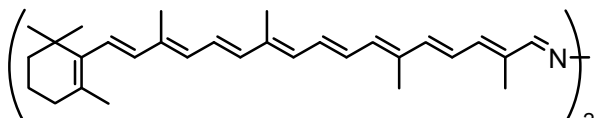
ϵ -Endgruppe

Es wird das folgende Carotinoidabbauschema vorgestellt, welches versucht den radikalischen Abbau von Carotinoiden möglichst umfassend zu zeigen, mit der Bildung von stabilen Oxidationsprodukten, wie Epoxiden und Apo-Carotinalen, sowie Oligomeren.



9. Abstract:

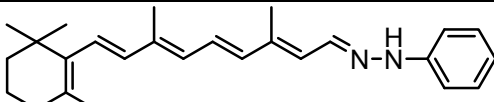
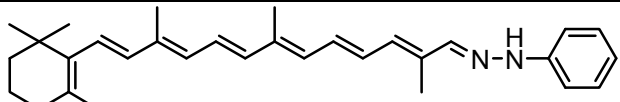
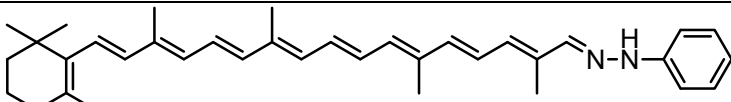
This thesis presents a synthetic route leading to a new class of nitrogen containing carotenoids, the carotenalylidene hydrazones **77**, **78** and **79**.

No.	carotenalylidene hydrazones (-azines)	λ_{max} (ethanol)
77		460 nm
78		490 nm
79		518 nm

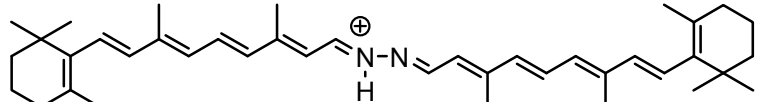
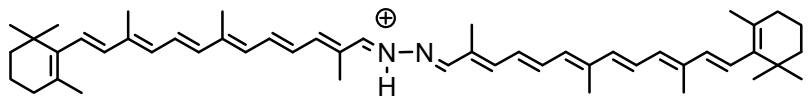
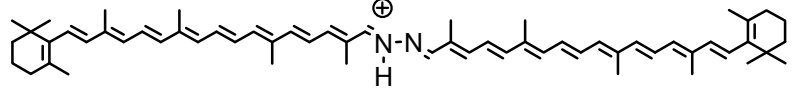
The synthesized carotenalylidene hydrazones are characterized by NMR- and IR-spectroscopy. Their electron spectra arouse special interest, in particular the influence of possible n/π -interactions leading to bathochromic shifts of the ultraviolet absorption. It is shown, that the UV-Vis-spectra of carotenalylidene hydrazones exhibit only slight absorption shifts to longer wavelength, compared to carotenoids that do not contain a nitrogen atom in the polyene chain. To estimate conformational geometries, semiempirical MNDO calculations of carotenalylidene hydrazones **77**, **78** and **79** were performed, taking into account small model compounds like formaldazines. The theoretical calculations with optimized geometries show that the most stable carotenalylidene hydrazone geometry has an antiperiplanar conformation. Within this conformation, no n/π -interactions have to be considered. The antiperiplanar and the gauche conformer (i.e. dihedral angle $\varphi \approx 100^\circ$ around the central azine-bond) of retinalazine **77** have a remarkably small energy difference of 6 kJ/mol only.

Furthermore the carotenoid phenylhydrazones **90**, **91** and **92** are synthesized. In order to determine the conformational geometries and behaviour of carotenoid phenylhydrazones, again semiempirical MNDO calculations with optimized geometries are performed. As shown for the carotenalylidene hydrazones, the

carotenoid phenylhydrazones exhibit no remarkable n/π -interactions and do not show relevant shifts to longer wavelengths. The conformational geometries in phenylhydrazones are dominated by miscellaneous amine-/imine-interactions with almost no influence arising from n/π -interactions. As in carotenalylidene hydrazones no significant conformational or geometric effect on UV-absorbances is observed.

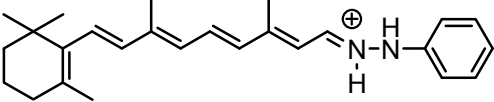
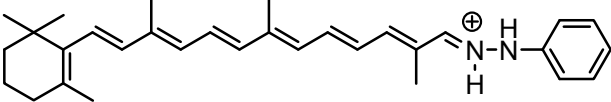
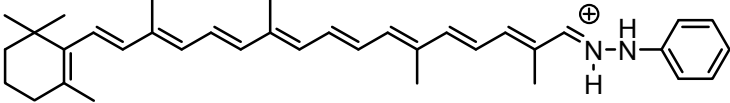
No.	carotenoid phenylhydrazones	$\lambda_{\max}$ (hexane)	$\lambda_{\max}$ (CHCl ₃)
90		396 nm	418 nm
91		435 nm	446 nm
92		464 nm	478 nm

Carotenalylidene hydrazones and carotenoid phenylhydrazones display a distinctive acidochromic behavior. The following table lists the bathochromic absorptions of the mono-protonated carotenalylidenehydrazones **94**, **95** and **96**.

No.	mono-protonated carotenalylidene hydrazones	$\lambda_{\max}$ (ethanol)
94		559.9 nm
95		617.8 nm
96		638 nm*

* = poorly soluble

The resulting bathochromic absorptions of the mono-protonated carotenoid phenylhydrazones **97**, **98** and **99** are shown in the following table.

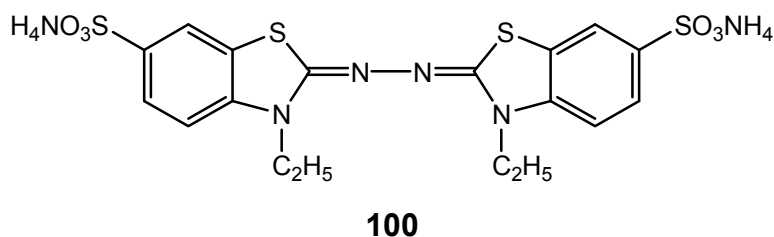
No.	mono-protonated carotenoidphenylhydrazones	$\lambda_{\max}$ (ethanol)
97		458.4
98		506.0
99		516.7

The bathochromic shift in acidic media is due to a highly delocalised positive charge along the polyene chain adjacent to the protonated azine-group. Mono-protonated carotenalydene hydrazones and carotenoid phenylhydrazones show structural, as well as energetical, very similar mono-cations, with partial alternation of bond length and bond angles. These features are characteristic for polymethine-like structures.

In the second part of this thesis, the antioxidative properties of seven different carotenoids in three different antioxidative assays are investigated.

[1] ABTS-Assay

The antioxidant activity of the carotenoids in the ABTS-Assay is characterised by their relative ability to scavenge the ABTS radical cations in a one-electron oxidation reaction. The reduction of the blue-green coloured ABTS radical cation to the colourless ABTS **100** is monitored by UV-Vis spectrometry.



In addition two other assays assessing the antioxidative properties of carotenoids are utilized:

[2] Measurement of the relative rate of oxygen uptake[3] Inhibition of cumolhydroperoxide formation

Both assays use the radical-trapping antioxidant behavior of carotenoids and their inhibiting effect in an azo compound-initiated cumene oxidation. The following table shows the antioxidative properties of the seven carotenoids measured in the three different assays:

carotenoid	[1] ABTS-assay RAA(AUC)-Value [4 min.]	[2] dO_2/dt 10^{-8} mol/l•s (150 Torr) conc. $2 \cdot 10^{-3}$ M	[3] amount of peroxide in % [360 min.] conc. $2 \cdot 10^{-3}$ M
astaxanthin	(0.49)	8.75	11 %
canthaxanthin	(0.61)	11.51	13 %
zeaxanthin	0.79	22.26	12 %
lutein	1.42	17.30	40 %
cryptoxanthin	1.45	28.90	18 %
β -carotene	1.78	33.20	21 %
lycopene	2.59	21.93	24 %

() = in the ABTS-assay, measurement of this values is not suitable, see below.

The ABTS-assay is a very restricted method assessing antioxidant properties of lipophilic carotenoids in aqueous-ethanolic media, due to their poor solubility in aqueuos media. The two carotenoids canthaxanthin and astaxanthin are not assessable in the ABTS-assay, because of their low reducing ability towards ABTS radical cations indicated by their high redox potentials. Thermodynamically only compounds with a redox potential lower than that of ABTS radical cations ($E = 0.68$ V) can react with $ABTS^{\bullet+}$. To avoid any mismeasurement, an improved experimental procedure of the ABTS-assay is suggested. Especially the correct chemical preparation of ABTS radical cations and the use of correct stoichiometric proportions of the nonradical dye relative to the dye oxidizing agent is pointed out, as well as the assay specific stoichiometry ratio of the reaction of two moles of ABTS radical cations reduced by only one mole of trolox. With respect to this uncertainties, the main

application of the ABTS-assay should be an antioxidant quick-test, due to its operational simplicity.

The other two methods, the relative rate of oxygen uptake and the inhibition of cumolhydroperoxide formation, provide more reliable information towards antioxidative behaviour of carotenoids. The rate of oxygen uptake is evaluated in the time interval of 50 and 70 minutes, whereas the inhibition of cumene-hydroperoxide formation is evaluated at a time point of 360 minutes. Because of two different long-lasting reaction periods, these methods are divided into short-term and long-term measurements. In addition to the time-dependence a second distinction, involving different reaction mechanisms is made. Thus, the hydrogen abstraction and the radical addition mechanisms are discussed in correlation to different substituents in carotenoids.

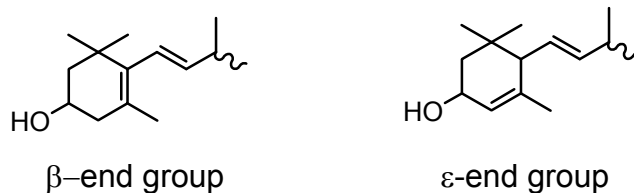
To some extent C4 keto groups in astaxanthin and canthaxanthin transfer electron density from the polyene chain to the electron-withdrawing carbonyl groups, so that the carotenoid redox potential is enhanced. Therefore astaxanthin and canthaxanthin have an increased oxidative stability and longer life times.

C3 hydroxyl group bearing carotenoids show an average antioxidative activity, compared to the xanthophylls. The hydroxyl groups are not in conjugation with the polyene chain; therefore the stability of polyene radicals is not affected. Hydroxyl groups can exhibit long time antioxidative activities, because they are highly stable and their function as hydrogen donors remains unchanged, even in short carotenoid degradation products after long reaction times.

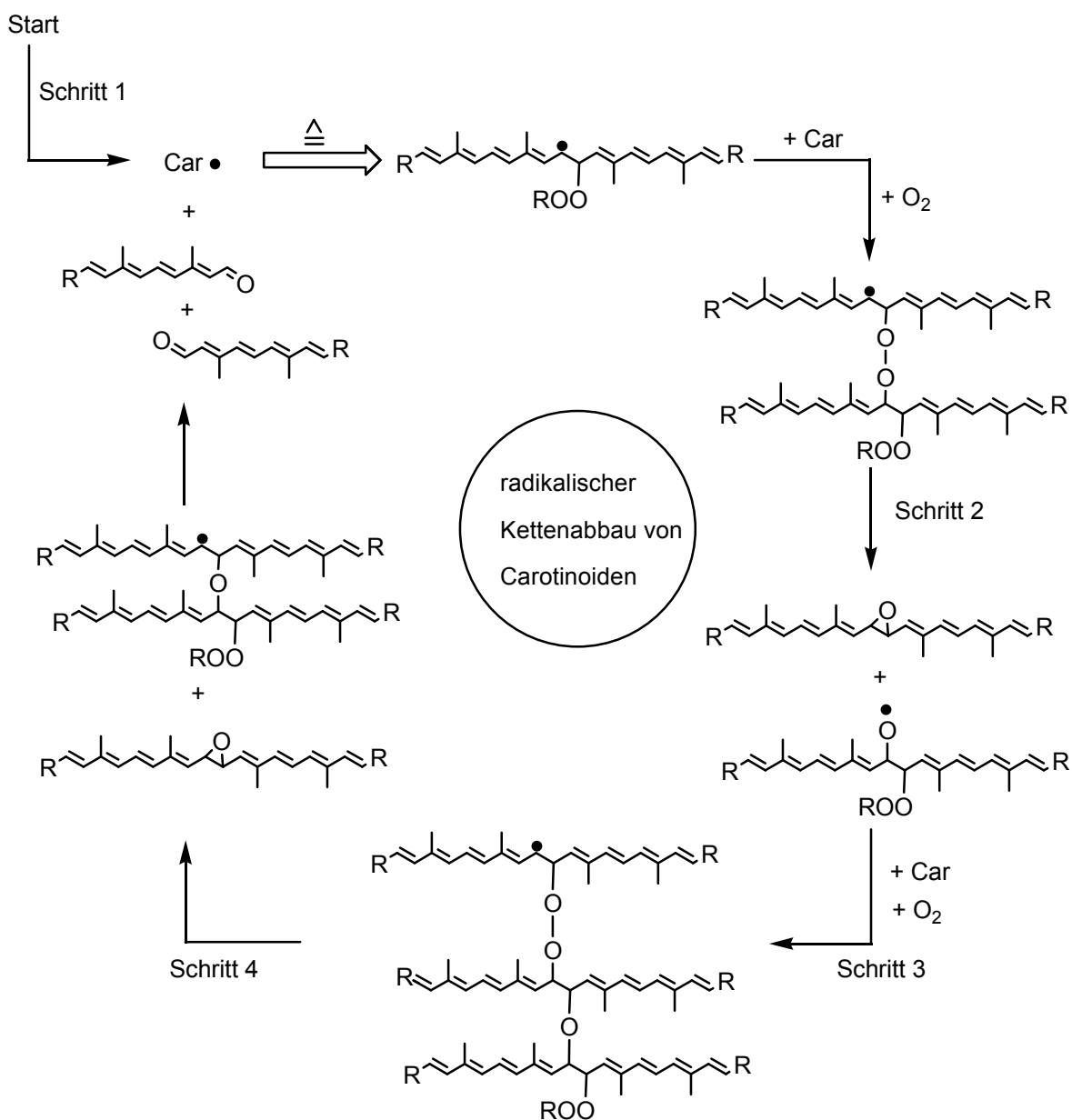
Cryptoxanthin bears only one hydroxyl group. The antioxidant activity of cryptoxanthin is between β -carotene (no hydroxyl group) and zeaxanthin (two hydroxyl groups). A prediction of the antioxidative contribution for each carotenoid substituent is facile, because the substituent effects do not have a simple additive character. As a consequence, it is not possible to establish an antioxidative activity increment system.

The comparison of β -carotene with cyclic β -endgroups towards lycopene with open and acyclic ψ -endgroups shows that cyclic β -endgroups provide a better antioxidative effect than acyclic ψ -endgroups. But in one-electron oxidation reactions, lycopene shows a superior reducing property. The comparison of zeaxanthin and lutein shows that in long-term oxidations a higher antioxidant activity is measured for β -endgroup-containing carotenoids, than for

carotenoids with ε -endgroups. This effect can be attributed to a favoured hydrogen abstraction position at C6 in ε -endgroups.



The following oxidative carotenoid degradation cycle is proposed, which can explain general carotenoid oxidation pathways together with the formation of many carotenoid oxidation products, for example epoxides, apo-carotenoids and oligomeric oxidation products.



10. Experimenteller Teil

10.1 Allgemeines

Zur Charakterisierung wurden folgende Geräte benutzt:

IR-Spektroskopie:

- Perkin Elmer 710 B

FT-IR-Spektroskopie:

- Brucker Vektor 22

Kernresonanzspektroskopie:

- $^1\text{H-NMR}_{60}$: VARIAN EM 360 A

- $^1\text{H-NMR}_{300}$: VARIAN VXR 300

- $^1\text{H-NMR}_{500}$ und $^{13}\text{C-NMR}_{125}$: Bruker DRX 500

- $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{122}$: VARIAN VXR 300

UV-Vis-Spektren:

- Zeiss DMS 21 113 Q III

- Beckmann Einstrahl-Photometer OS 40

Schmelzpunkte (unkorrigiert):

- Thermovar, Reichert und Büchi SMP 20

Massenspektroskopie:

- Varian MAT 311A, 70eV, bis 300 °C Quelltemperatur

- Bruker Ultraflex TOF, Maldi (als Matrix wurde verwendet: DHB
(2,5-Dihydroxybenzoesäure))

Dünnschichtchromatographie:

- DC-Aluminiumträgerfolien Kieselgel 60, Schichtdicke 0.2 mm, F₂₅₄, Fa. Merck

- DC-Aluminiumträgerfolien Florisil® Schichtdicke 0.15-0.25 mm, Fa. Merck

- DC Aluminiumoxid, Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Fa. Merck

Säulenchromatographie

- Kieselgel 60, 0.04-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM, Säulenmaße: $\varnothing = 80$
mm, Länge 500 mm

HPLC:

- Hewlett Packard Chemstation Pumpe 1050, 1040M DAD
YMC Säule SIL-ASP 150 S-5 μ M

GC-MS:

- GC: Hewlett-Packard 5890 HP OV-1-FS Säule
- MS: Hewlett-Packard 5970, 70 eV

Danksagung

Für die Durchführung der Messungen danke ich:

$^1\text{H-NMR}_{300}$:	Frau M. Beuer und Herrn Dr. A. Steigel
$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{200}$:	Herrn P. Behm
UV-Vis:	Frau I. Menzel und Herrn Dr. S. Beutner
IR-Spektren:	Frau I. Menzel und Frau H. Webers
HPLC:	Herrn Dr. M. Schmidt und Herrn R. Scherrers
Massenspektren:	Herrn R. Bürgel und Herrn Dr. P. Tommes

Der BASF-AG Ludwigshafen danke ich für die freundliche Zurverfügungstellung der Carotinoide: Canthaxanthin, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin und Lutein
Herrn Dr. J. Benade und Herrn Dr. M. Schmidt danke ich für die immer freundliche Laborzusammenarbeit. Herrn Priv. Doz. Dr. K. Schaper danke ich für die Hilfe bei der Lösung zu verschiedenen chemischen Problemen. Herrn Dr. H. Dickopp für die geduldige Beantwortung meiner zahllosen synthetischen Fragenstellungen. Besonderen Dank schulde ich meiner lieben und geduldigen Bürokollegin Henrike Kolbe. Herrn Prof. Dr. Robin Walsh, University of Reading UK, danke ich für Diskussionen und Modelle der komplexen β -Carotin-Radikalkettenreaktion.

10.2 Durchführung des ABTS-Assays

10.2.1 Herstellung der ABTS^{•+}-Lösung

Der ABTS-Assay wurde nach einer Hausversuchsvorschrift von Dr. Perez-Galvez durchgeführt. Dabei wurden folgende Lösungen hergestellt:

Ansatz zur Herstellung der ABTS-Lösung: M_R (ABTS **100**) = 548.7g/mol

Einwaage 37,7 mg ABTS entsprechend $6.87 \cdot 10^{-5}$ mol.

Mit $6.87 \cdot 10^{-5}$ mol gelöst in 4.91 ml Wasser erhält man eine 14 mM Lösung (Lösung 1).

Ansatz zur Herstellung der Kaliumperoxodisulfat-Lösung: M_R ($K_2S_2O_8$) = 270.3 g/mol

Einwaage 66.2 mg $K_2S_2O_8$ entsprechend $2.45 \cdot 10^{-4}$ mol.

Mit $2.45 \cdot 10^{-4}$ mol gelöst in 50 ml Wasser erhält man eine 4.9 mM Lösung (Lösung 2).

Herstellung der ABTS^{•+}-Messlösung:

5 ml der Lösung 1 und 5 ml der Lösung 2 werden zusammengegeben und mindestens 36 h, bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht, zur Reaktion gebracht. 1 ml dieser ABTS^{•+}-Lösung wird in 130 ml Ethanol verdünnt. Von dieser Lösung werden 1 ml in die Messküvette (10 mm) gegeben, man erhält eine 42.5 μ M Lösung. (diese Konzentration entspricht dann einer optimal zu messenden Absorbanz von 0.7)

10.2.2 Herstellung der Trolox-Lösungen

Herstellung der Trolox-Lösung: (M_R ($C_{14}H_{18}O_4$ **62**) = 250.29 g/mol)

Einwaage 13.9 mg Trolox entsprechend $5.56 \cdot 10^{-5}$ mol

Mit $5.56 \cdot 10^{-5}$ mol gelöst in 10 ml Wasser erhält man eine 5.56 mM Lösung (Lösung 3).

Herstellung der Trolox-Stammlösungen:

Eine Trolox-Stammlösungen wird hergestellt, indem die Trolox-Lösung (Lösung 3) auf 2 mM verdünnt wird, es gilt: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$

$$5.56 \text{ mM} \cdot V_1 = 2 \text{ mM} \cdot 1 \text{ ml} \quad V_1 = 360 \text{ } \mu\text{l} (0.360 \text{ ml})$$

Verdünnung 360 μl Trolox-Lösung + 640 μl Ethanol (gesamt 1 ml)

10 μl dieser 2 mM Trolox-Stammlösung werden in die 10 mm ABTS-Messküvette gegeben. Damit ergibt sich eine effektive Messkonzentration:

$$10 \text{ } \mu\text{l} \text{ werden auf } 1010 \text{ } \mu\text{l} \text{ verdünnt entsprechend} \quad 2 \text{ mM} / 101 = 19.8 \text{ } \mu\text{M}$$

Im Rahmen des Verdünnungsfehlers entspricht die Konzentration in der Messküvette damit einer Trolox-Effektivkonzentration von etwa 20 μM .

Alle weiteren Trolox-Lösungen werden durch Verdünnung der 2 mM Lösung auf die jeweils halbe Konzentration hergestellt.

Tabelle 10.1.: Verwendete Verdünnung der Trolox-Lösungen

Verdünnung der 2 mM Lösung auf ein Gesamtvolumen	Effektivkonzentration [μM] an Trolox
2 mM / 101 μl	19.8 $\mu\text{M} \approx 20 \text{ } \mu\text{M}$
1 mM / 101 μl	9.90 $\mu\text{M} \approx 10 \text{ } \mu\text{M}$
0.5 mM / 101 μl	4.95 $\mu\text{M} \approx 5 \text{ } \mu\text{M}$

Die 15 μM Troloxlösung wird hergestellt, indem die Trolox-Lösung (Lösung 3) auf 1.5 mM verdünnt wird, es gilt: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$

$$5.56 \text{ mM} \cdot V_1 = 1.5 \text{ mM} \cdot 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = 270 \text{ } \mu\text{l} (0.270 \text{ ml})$$

Verdünnung 270 μl Trolox-Lösung + 730 μl Ethanol (gesamt 1 ml)

10 μl dieser 1.5 mM Trolox-Stammlösung werden in die 10 mm ABTS-Messküvette gegeben. Es resultiert folgende effektive Messkonzentration:

Tabelle 10.2.: Verwendete Verdünnung der 15 μM Trolox-Lösungen

Verdünnung der 1.5 mM Lösung auf ein Gesamtvolumen	Effektivkonzentration [μM] an Trolox
1.5 mM / 101	14.9 $\mu\text{M} \approx 15 \text{ } \mu\text{M}$

10.2.3 Herstellung der Carotinoid-Lösungen

Herstellung der Carotinoid-Lösungen (in Ethanol):

Tabelle 10.3.: Einwaagen zur Herstellung der Carotinoid-Lösungen

Carotinoid	Einwaage [mg]	M _R [g/ mol]	[mol]	Gelöst in 10 ml Ethanol
β-Carotin	33.6	536.44	$6.26 \cdot 10^{-5}$	6.26 mM
Lycopin	21.8	536.44	$4.06 \cdot 10^{-5}$	4.06 mM
Lutein	23.8	568.87	$4.18 \cdot 10^{-5}$	4.18 mM
Zeaxanthin	23.0	568.87	$4.04 \cdot 10^{-5}$	4.04 mM
Cryptoxanthin	23.8	552.87	$4.31 \cdot 10^{-5}$	4.31 mM
Astaxanthin	22.8	596.84	$3.82 \cdot 10^{-5}$	3.82 mM
Canthaxanthin	23.2	596.84	$4.11 \cdot 10^{-5}$	4.11 mM

Verdünnung der Carotinoide:

Die Carotinoid-Stammlösungen werden hergestellt, indem die Carotinoid-Lösungen auf 2 mM verdünnt werden, es gilt: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$

Beispiel β-Carotin:

$$6.26 \text{ mM} \cdot V_1 = 2 \text{ mM} \cdot 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = 320 \text{ } \mu\text{l} \text{ (0.320 ml)}$$

Verdünnung 320 μl β-Carotin-Lösung + 680 μl Ethanol (1 ml)

Tabelle 10.4.: Verdünnungen zur Herstellung der 2 mM Carotinoid-Lösungen

Carotinoid	Carotinoid [mM]	Carotin-Lösung [μl]	Ethanol [μl]
β-Carotin	6.26	320 μl	680 μl
Lycopin	4.06	360 μl	640 μl
Lutein	4.18	478 μl	521 μl
Zeaxanthin	4.04	494 μl	506 μl
Cryptoxanthin	4.31	465 μl	535 μl
Astaxanthin	3.82	524 μl	476 μl
Canthaxanthin	4.11	486 μl	513 μl

Tabelle 10.5.: Verdünnung der 2 mM Carotinoidlösungen auf die jeweils halbe Konzentration.

Verdünnung der 2 mM Lösung auf ein Gesamtvolumen	Effektivkonzentration [μM] an Carotinoid
2 mM /101	19.8 μM $\approx$ 20 μM
1 mM /101	9.90 μM $\approx$ 10 μM
0.5 mM /101	4.95 μM $\approx$ 5 μM
0.05 mM /101	0.49 μM $\approx$ 0.5 μM

Verdünnungsreihe für die Herstellung der Messlösung der Carotinoide:

10 μl der 2 mM Stammlösung entsprechen 20 $\mu\text{mol/l}$ effektiver Konzentration in der Küvette. Diese Lösung wird somit direkt in die ABTS-Messküvette gegeben. Die anderen Messlösungen müssen über weitere Verdünnung hergestellt werden. 10 μl der 2 mM Stammlösung werden um die Hälfte verdünnt, dies entspricht einer effektiven Konzentration von 10 μM . Nochmaliges verdünnen um die Hälfte ergibt eine Lösung mit der effektiven Konzentration von 5 μM . Wird diese Lösung um ein zehntel verdünnt ergibt sich eine effektiv Konzentration von 0.5 μM . Die Zugaben in die Messküvette erfolgen immer mit einem Volumen von 10 μl .

Tabelle 10.6.: Übersicht der erhaltenen RAA(AUC)-Werte

Antioxidans	RAA(AUC)-Wert [1 min]	RAA(AUC)-Wert [4 min]
Trolox	1.00	1.00
Lycopin	2.53	2.59
β -Carotin	1.82	1.78
Cryptoxanthin	1.45	1.45
Lutein	1.41	1.42
Zeaxanthin	0.79	0.79
nicht zugänglich		
Cantaxanthin	0.48[*]	0.61[*]
Astaxanthin	0.41[*]	0.49[*]

10.3 Durchführung Druckmessung der Sauerstoffabnahme

Der Sauerstoffverbrauch wird in einer Apparatur, entsprechend der nachstehenden Abbildung, durchgeführt.

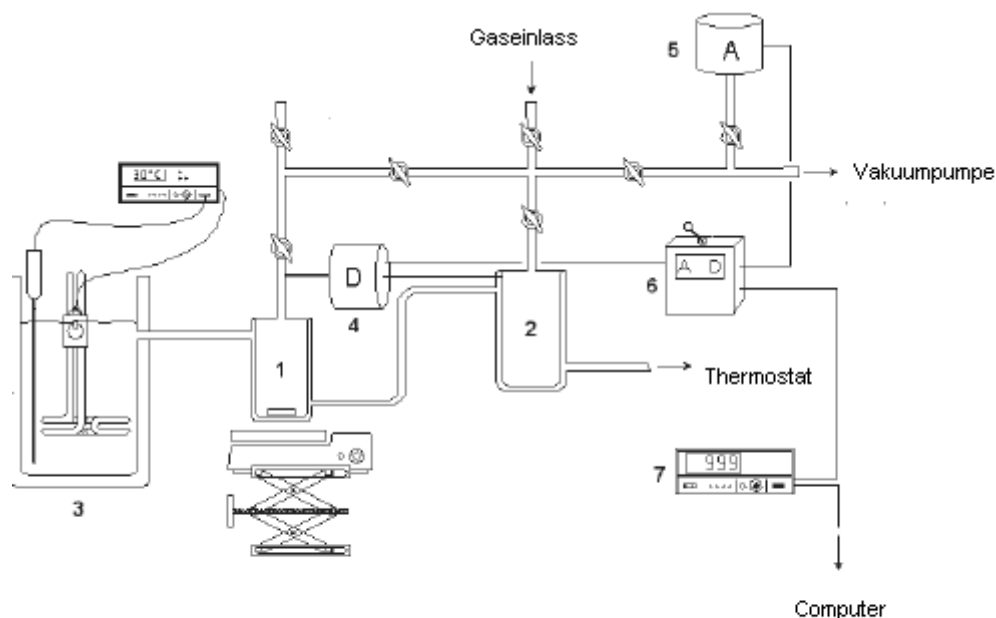


Abbildung 10.1: Schematische Darstellung der Messapparatur

- 1 doppelwandiges Reaktionsgefäß (thermostatisiert)
- 2 doppelwandiges Referenzgefäß (thermostatisiert)
- 3 Thermostat
- 4 Differenzdruckaufnehmer MKS Baratron, Type 223B, Pressure Transducer
- 5 Absolutdruckaufnehmer MKS Baratron, Typ 122A
- 6 Schalter, um von differentieller auf absolute Druckmessung umzuschalten
- 7 digitales Anzeige-Instrument

Zunächst wird die gesamte Messapparatur dreimal sekuriert und anschließend mit der gewünschten Sauerstoffgasmischung beschickt. Die Reaktionslösungen werden außerhalb der Apparatur gemischt und über ein Septum in das Reaktionsgefäß 1 gegeben. Die Absperrhähne des Referenz- und des Reaktionsgefäßes zur Restapparatur werden geschlossen. Über den

Absolutdruckaufnehmer wird der Aussendruck bestimmt und notiert. Über den Computer wird die Messung gestartet, wobei die digitalisierten Messwerte der Drucknehmer aufgezeichnet werden. Das Reaktions- und Referenzgefäß werden durch einen Thermostaten konstant auf einer Temperatur von 30°C gehalten. Die bei der Messung erhaltenen Sauerstoffdruck-Zeit-Kurven zeigen in den ersten Minuten einen Anstieg des Druckes im Reaktionsgefäß. Dieser anfängliche Anstieg des Druckes ist auf das Entgasen der Lösungsmittel Cumol und Chlorbenzol zurückzuführen. Mit fortschreitender Reaktion nehmen die Sauerstoffdruckkurven dann ab. Um die Messdaten zu vergleichen, wird der Maximalwert der anfänglichen Druckerhöhung auf 760 Torr gesetzt. Zur Sicherheit werden alle Messungen mindestens zweimal durchgeführt. Zur weiteren Auswertung werden zwischen 50 und 70 min die Steigungen der einzelnen Meßkurven bestimmt. Die Werte der Steigungen werden mit dem Faktor $665.7 \text{ (M} \cdot \text{min)} / (\text{s} \cdot \text{Torr})$ multipliziert, der sich aus der Umrechnung der Einheiten nach Frixel ergibt. So werden Oxidationsgeschwindigkeiten für das Zeitintervall 50 bis 70 Minuten mit der Einheit 10^{-8} M/s erhalten. Aus den so errechneten Daten werden die Mittelwerte gebildet. Die Auftragung der Oxidationsgeschwindigkeiten gegen die entsprechende Antioxidanskonzentration ergibt Graphen, aus denen sich ablesen läßt, wie die antioxidative Fähigkeit des einzelnen Carotinoids einzustufen ist.

10.3.1 Herstellung der Sauerstoffdruck-Messlösungen

Das Messgefäß wird mit

- 1) 5 ml reinem Cumol
 - 2) 4 ml Carotinoid-Lösung (Carotinoid gelöst in Chlorbenzol)
 - 3) 1 ml Starterlösung
- befüllt.

Herstellung der Cumol-Lösung:

Cumol (M_R (Cumol) = 120.09 g/mol)

Es wird reines Cumol verwendet. 5 ml reines Cumol entsprechen einer Konzentration von 3.57 M (≈ 3.6 M).

Starter-Lösung: (AMVN **109** $C_{14}H_{24}N_4$ = 248.2 g/mol)

Mit 5.5843 g ($2.25 \cdot 10^{-2}$ mol) AMVN in 50 ml Chlorbenzol gelöst erhält man eine $4.5 \cdot 10^{-1}$ M Lösung. Dieser Lösung werden 1 ml entnommen und in das Reaktionsvolumen von 10 ml verdünnt, man erhält eine Konzentration von $4.5 \cdot 10^{-2}$ M.

Tabelle 10.7.: Carotinoid-Einwaagen zur Herstellung der Carotinoid-Masslösung:

Carotinoid	M_R (g/mol)	Einwaage (mg)	Konzentration der Masslösung 1 (gelöst in 50 ml Chlorbenzol)
β -Carotin	536.44	134.161	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M
Lycopin	536.44	134.182	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M
Lutein	568.87	142.197	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M
Zeaxanthin	568.87	142.149	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M
Cryptoxanthin	552.87	138.207	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M
Canthaxanthin	596.84	149.252	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M
Astaxanthin	564.84	141.234	$5.0 \cdot 10^{-3}$ M

Tabelle 10.8.: Verdünnungen der Carotinoid-Masslösung 1

x ml Masslösung 1	Verdünnung Masslösung 1 mit x ml reinem Chlorbenzol	Konzentration der Masslösung 2
25 ml $5.0 \cdot 10^{-3}$ M	25 ml	$2.5 \cdot 10^{-3}$ M
10 ml $5.0 \cdot 10^{-3}$ M	40 ml	$1.0 \cdot 10^{-3}$ M
25 ml $1.0 \cdot 10^{-3}$ M	25 ml	$5.0 \cdot 10^{-4}$ M
1 ml $1.0 \cdot 10^{-3}$ M	9 ml	$1.0 \cdot 10^{-4}$ M
1 ml $5.0 \cdot 10^{-4}$ M	9 ml	$5.0 \cdot 10^{-5}$ M

Es werden jeweils 4 ml Carotinoid-Masslösung 2 in 10 ml Reaktionslösung gegeben mit den Endkonzentrationen der Tabelle 9.9.

Tabelle 10.9.: Carotinoid-Endkonzentrationen

4 ml Masslösung 2 oder Masslösung 1	Konzentration der Carotinoide in der Reaktionslösung
$5.0 \cdot 10^{-3}$ M 1	$2.0 \cdot 10^{-3}$ M
$2.5 \cdot 10^{-3}$ M 2	$1.0 \cdot 10^{-3}$ M
$1.0 \cdot 10^{-3}$ M 2	$4.0 \cdot 10^{-4}$ M
$5.0 \cdot 10^{-4}$ M 2	$2.0 \cdot 10^{-4}$ M
$1.0 \cdot 10^{-4}$ M 2	$4.0 \cdot 10^{-5}$ M
$5.0 \cdot 10^{-5}$ M 2	$2.0 \cdot 10^{-5}$ M

Verwendete Gase:

150 Torr 50 l Gasbombe

synthetische Luft mit einem Sauerstoffanteil ≈ 20 Vol % O_2

15 Torr 10 l Gasbombe (Air Liquide Best.Nr. KON3G)

Luft für medizinische Zwecke mit einem Sauerstoffanteil ≈ 2 Vol % O_2

10.4 Durchführung der Cumolhydroperoxidbestimmung

Der Cumolhydroperoxid-Assay wird in einem Reaktionsgefäß, wie es die nachstehende Abbildung zeigt, durchgeführt.

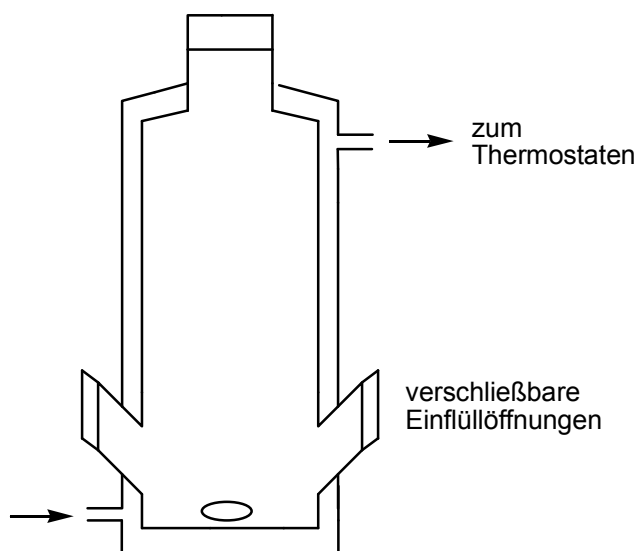


Abbildung 10.2: Reaktionsgefäß für den Cumolhydroperoxid-Assay

In dem Reaktionsgefäß aus Braunglas wird die radikalisch-induzierte Oxidation von Cumol in Gegenwart von Sauerstoff (Partialdruck 150 Torr) durchgeführt. Werden zusätzlich Carotinoide als Antioxidantien zugegeben führt das zu einer verminderten Bildung an Cumolhydroperoxid. Das Reaktionsgefäß hat ein Innenvolumen von ca. 500 ml und wird mit einem Thermostaten auf eine Temperatur von 36 °C gehalten. Über die verschleißbaren Einfüllöffnungen werden alle 10 min Proben entnommen und Mithilfe einer HPLC wird der Cumolhydroperoxidgehalt bestimmt. Als HPLC wurde ein Hewlett Packard System 1040M der Serie II benutzt. Es wurde eine 20 µl Probenschleife verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde durch eine YMC Kieselgel-Säule aufgetrennt. Als Laufmittel wird n-Hexan/Isopropanol im Verhältnis 99:1 eingesetzt. Die Detektion des Cumolhydroperoxids erfolgt UV-Vis-spektroskopisch mittels einem Dioden Array Detektor (DAD). Das Signal von Cumolhydroperoxid wird bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

Verwendete Komponenten:

Hewlett Packard HPLC 1040 M Serie II

HPLC-DAD-Detektor-System

YMC Kieselgelsäule SIL-ASP 150 x 6 mm S 5 μ M 60 Å

Laufmittel n-Hexan/Isopropanol 99:1 Flussrate 2ml/min

Die verwendeten Reaktionslösungen und Stammlösungen (Carotinoid, Starter und Cumol) sind identisch zu denen bei der Sauerstoffdruckmessung verwendeten Lösungen.

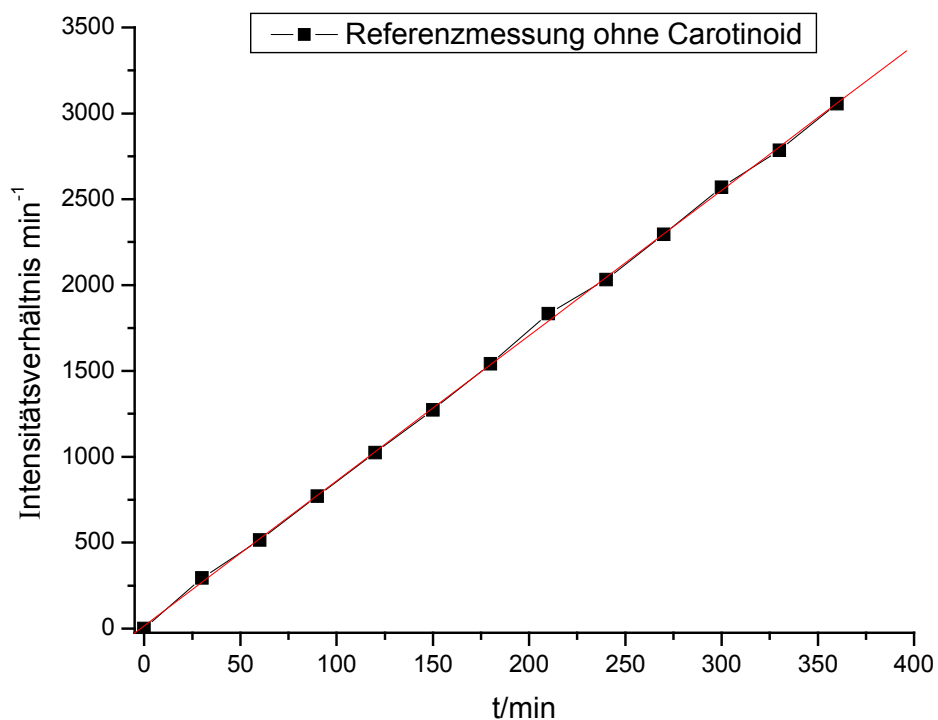


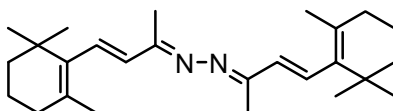
Abbildung 10.3: Anstieg der Cumolhydroperoxidmenge im Referenzexperiment

10.5 Versuchsbeschreibungen

Anmerkung: Die Namensgebung der Azine erfolgt nach IUPAC-Nomenklatur of Organic Chemistry (Rule: P 56.3.2) indem Azine als substituierte Hydrazine aufgefasst werden. Es soll darauf hingewiesen werden, dass für die Nomenklatur der Azine sehr häufig andere Namen (z.B. Buten-2-on-azin), sowie Trivialnamen verwendet werden.

Versuch1:

Darstellung von β -Jononazin **75**



1,2-Bis-[(4-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)but-3-en-2-yliden]hydrazin

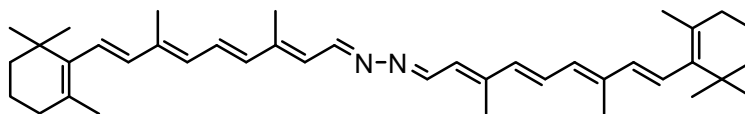
In einem 50 ml Kolben mit Rückflußkühler werden 5.0 g (26 mmol) β -Jonon **6** (frisch destilliert) in 20 ml absolutem Ethanol vorgelegt. Dann werden vorsichtig 2.3 ml (48 mmol) Hydrazinhydrat in mehreren Portionen zugegeben. Wird die Reaktionslösung zu warm (Reaktionstemperatur sollte 60 °C nicht überschreiten) muss gekühlt werden. Nach der Hälfte der zugegeben Menge an Hydrazinhydrat, wird der Ansatz mit wenigen Tropfen konzentrierter Essigsäure versetzt, dann wird die zweite Hälfte an Hydrazinhydrat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird im Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird mit Ether extrahiert. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit n-Hexan als Laufmittel gereinigt. Man erhält eine blaßgelbe Flüssigkeit.

Ausbeute: 1.2 g (3.2 mmol) 25%

Sdp: n.b. da Polymerisation

Massenspektrum **75** Finnigan MAT 70 eV, EI, Pt 90 °C:

m/z (%): 379 (2) $[M-1]^+$, 204 (7) $[(C_{13}H_{20}N_2)]^+$, 189 (13) $[M/2-1]^+$, 177 (100) $[(C_{13}H_{20})]^+$, 149 (12) $[(C_{11}H_{17})]^+$, 137 (11), $[(C_{10}H_{16}-1)]^+$, 135 (20) $[(C_{10}H_{16}-2)]^+$, 123 (32) $[(C_9H_{15})]^+$, 109 (21) $[(C_8H_{12})]^+$, 91 (14) $[(C_6H_6-CH_3)]^+$, 43 (33) $[(C_3H_6)]^+$.

Versuch 2:Darstellung von Retinalazin **77**

1,2-Bis-[3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenyliden]hydrazin

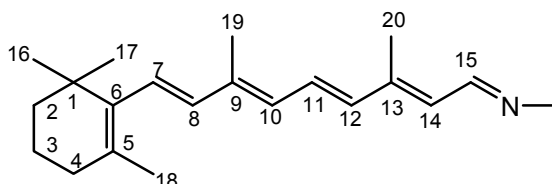
In einem 50 ml Kolben mit Rückflußkühler werden 1.14 g (4.0 mmol) Retinal **81** in 3 ml (32 mmol) Essigsäureanhydrid suspendiert. Zu dieser Lösung werden vorsichtig 3 ml (21 mmol) 100%iges Hydrazinhydrat gegeben. Zeigen sich braune Verfärbungen an der Eintropfstelle (Oxidation) muss das Hydrazinhydrat langsamer zugegeben werden, oder die Reaktionsmischung muss gekühlt werden. Nach beendeter Zugabe wird etwa 1 h nachgerührt. Die erhaltenen orange-roten Kristalle werden abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.90 g (1.6 mmol) 81%

Smp.: 165 °C

[Lit.: 189 °C ^[129]]

Verwendete Carotinoid-Bezifferung:



¹H-NMR 300 MHz **77** (CDCl₃, TMS)

δ [ppm] = 1.03 (s, 12H, 16-H, 16'-H und 17-H, 17'-H), 1.44-1.49 (m, 4H, 2-H und 2'-H), 1.59-1.62 (m, 4H, 3-H und 3'-H), 1.72 (s, 6H, 18-H und 18'-H), 2.00 (s, 6H, 20-H und 20'-H), 2.03-2.11 (m, 4H, 4-H und 4'-H), 2.12 (s, 6H, 19-H und 19'-H), 6.18 (d, ³J=15.7 2H, 8-H und 8'-H), 6.21 (d, ³J=12.2 2H, 10-H und 10'-H), 6.29 (d, ³J=16.1 2H, 7-H und 7'-H), 6.35 (d, ³J=14.9 2H, 12-H und 12'-H), 6.38 (d, ³J=10.6 2H, 14-H und 14'-H), 6.90 (dd, ³J=11.5 und ³J=15.0 2H, 11-H und 11'-H), 8.65 (d, ³J=10.4 2H, 15-H und 15'-H).

^{13}C -NMR 75 MHz **77** (CDCl_3 , TMS)

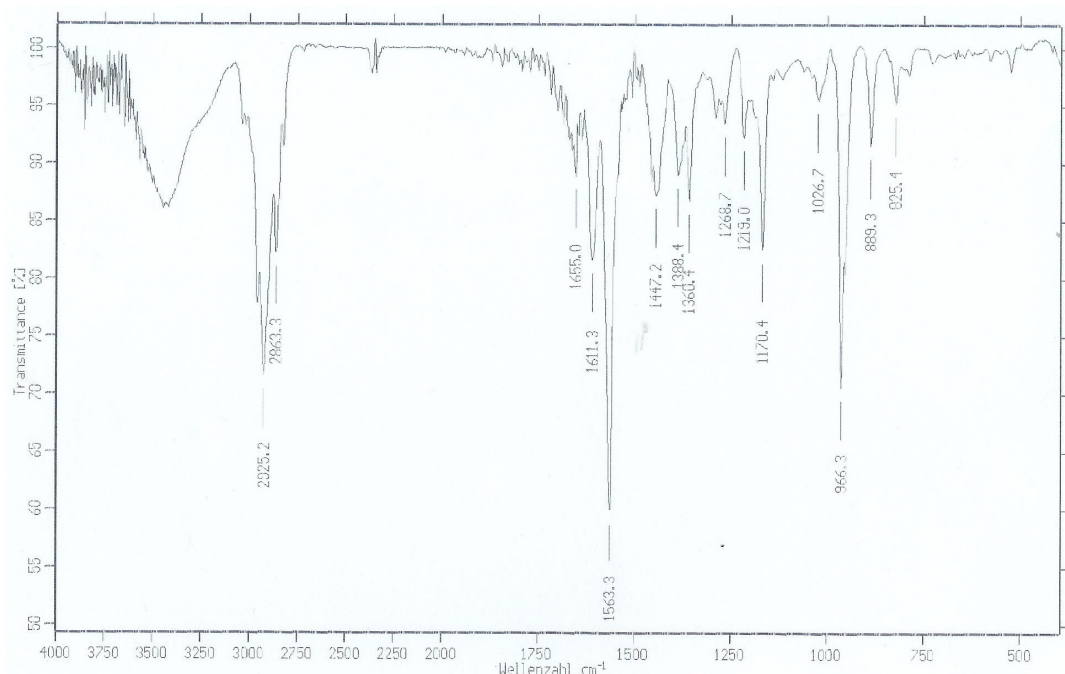
δ [ppm] = 12.89 (20-C und 20'-C), 13.30 (19-C und 19'-C), 19.22 (3-C und 3'-C), 21.77 (18-C und 18'-C), 28.98 (16-C, 17-C und 16'-C, 17'-C), 33.14 (4-C und 4'-C), 34.27 (1-C und 1'-C), 39.63 (2-C und 2'-C), 127.05 (12-C und 12'-C), 128.32 (10-C und 10'-C), 128.93 (11-C und 11'-C), 130.03 (7-C und 7'-C), 130.06 (5-C und 5'-C), 135.92 (14-C und 14'-C), 137.41 (8-C und 8'-C), 137.75 (9-C und 9'-C), 139.00 (6-C und 6'-C), 147.15 (13-C und 13'-C), 160.15 (15-C und 15'-C).

UV-Vis-Daten (Ethanol): λ_{max} ($\log \varepsilon$) = 460.4 (4.83) nm

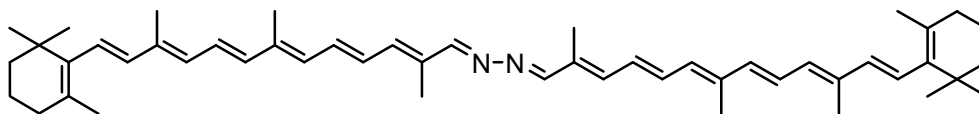
Massenspektrum **77** Finnigan MAT FAB/NBA:

m/z (%): 566 (14) $[\text{M}+2]^+$, 537 (3) $[\text{M}-(\text{CH}_3)_2]^+$, 374 (2) $[(\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_2)]^+$, 307 (8) $[(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2-1)]^+$, 282 (7) $[\text{M}/2]^+$, 240 (5) $[(\text{C}_{18}\text{H}_{26}-1)]^+$, 173 (12) $[(\text{C}_{13}\text{H}_{20}-1)]^+$, 154 (36) $[(\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}-2)]^+$, 135 (20) $[(\text{C}_{10}\text{H}_{16}-2)]^+$, 123 (100) $[(\text{C}_9\text{H}_{15})]^+$.

IR-Spektrum **77** (KBr-Pressling):



$\tilde{\nu}$ (Zuordnung) = 3450 (-N-H Valenz unassoziiert), 2925 (=C-H Valenz), 2863 (-CH₃ -CH₂- Valenzen), 1655, 1611 (-C=C Valenz), 1563 (-C=N Valenz), 1447, 1360 (-C-H Deformation), 1170 (-N=C- Deformation), 996 (=C-H Deformation) cm^{-1} .

Versuch 3:Darstellung von C₂₅-Aldehydazin **78**

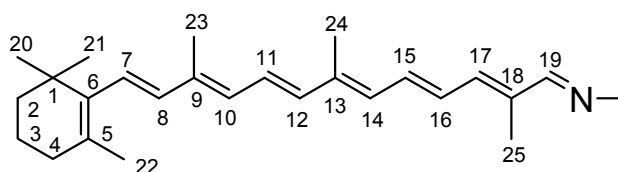
1,2-Bis-([2,7,11-trimethyl-13-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)trideca-2,4,6,8,10,12-hexaenyliden])hydrazin

In einem 50 ml Kolben mit Rückflußkühler werden 1.2 g (3.4 mmol) C₂₅-Aldehyd [2,7,11-trimethyl-13-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)trideca-2,4,6,8,10,12-hexenal] **82** in 2.7 ml (27 mmol) Essigsäureanhydrid suspendiert. Zu dieser Lösung werden vorsichtig 0.83 ml (17 mmol) 100%iges Hydrazinhydrat gegeben. Während der Zugabe wird die Reaktionsmischung gekühlt. Nach beendeter Zugabe wird 3 h nachgerührt. Die erhaltenen violett-roten Kristalle werden abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.81 g (1.2 mmol) 68%

Smp.: 178 °C

Verwendete Carotinoid-Bezifferung:



¹H-NMR 300 MHz **78** (CDCl₃, TMS)

δ [ppm] = 1.03 (s, 12H, 20,20'-H und 21,21'-H), 1.45-1.49 (m, 4H, 2-H und 2'-H), 1.58-1.66 (m, 4H, 3-H und 3'-H), 1.72 (s, 6H, 22-H und 22'-H), 1.98 (s, 6H, 25-H und 25'-H), 2.02 (s, 6H, 24-H und 24'-H), 2.00-2.06 (m, 4H, 4-H und 4'-H), 2.10 (s, 6H, 23-H und 23'-H), 6.13 (d, ³J=16.1 2H, 8-H und 8'-H), 6.16 (d, ³J=12.8 2H, 10-H und 10'-H), 6.21 (d, ³J=17.0 2H, 7-H und 7'-H), 6.35 (d, ³J=15.1 2H, 14-H und 14'-H), 6.37 (d, ³J=15.0 2H, 12-H und 12'-H), 6.60 (d, 2H, 6-H und 6'-H), 6.73 (dd, ³J=15.6 und ³J=11.5 2H, 11-H und 11'-H), 6.75 (d, ³J=14.8 2H, 17-H und 17'-H), 6.86 (dd, ³J=14.9 und ³J=11.5 2H, 15-H und 15'-H), 8.12 (s, 2H, 19-H und 19'-H).

^{13}C -NMR 75 MHz **78** (CDCl_3 , TMS)

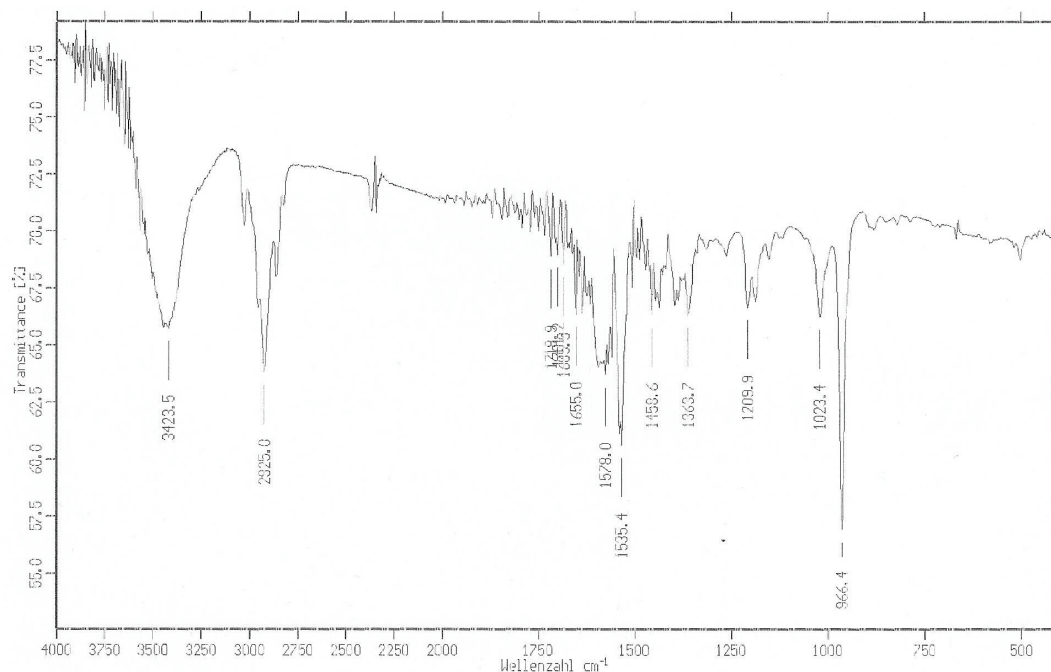
δ [ppm] = 12.01 (25-C und 25'-C), 12.82 (24-C und 24'-C), 12.97 12.01 (23-C und 23'-C), 19.26 (3-C und 3'-C), 21.78 (22-C und 22'-C), 28.99 (20,20'-C und 21,21'-C), 33.13 (4-C und 4'-C), 34.28 (1-C und 1'-C), 39.64 (2-C und 2'-C), 126.40 (16-C und 16'-C), 127.25 (12-C und 12'-C), 128.65 (11-C und 11'-C), 129.06 (5-C und 5'-C), 130.62 (14-C und 14'-C), 131.62 (10-C und 10'-C), 133.80 (15-C und 15'-C), 134.25 (18-C und 18'-C), 136.80 (7-C und 7'-C), 137.02 (13-C und 13'-C), 137.65 (8-C und 8'-C), 137.86 (9-C und 9'-C), 139.21 (6-C und 6'-C), 140.14 (17-C und 17'-C), 165.46 (19-C und 19'-C).

UV-Vis-Daten (Ethanol): λ_{max} [nm] lg ϵ 490.0 (4.90)

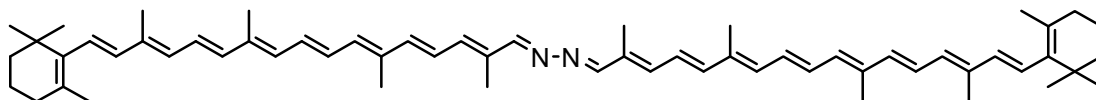
Massenspektrum **78** Finnigan MAT FAB/NBA:

m/z (%): 697 (4) $[\text{M}]^+$, 460 (6), 406 (7) $[\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{C}_3\text{H}_4]^+$, 350 (22) $[\text{M}/2+1]^+$, 329 (33) $[\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2-2]^+$, 307 (100) $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2]^+$, 289 (67) $[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2]^+$, 273 (10) $[\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}]^+$, 242 (9) $[\text{C}_{18}\text{H}_{26}]^+$, 215 (7) $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}]^+$.

IR-Spektrum **78** (KBr-Pressling):



$\tilde{\nu}$ (Zuordnung) = 3423 (-N-H Valenz unassoziiert), 2925 (-CH₃ -CH₂- Valenz), 1718, 1685 (-C=C Valenz), 1578 (-C=N Valenz), 1458, 1363 (C-H Deformation), 1209 (-N=C-H Deformation), 966 (=C-H Deformation) cm^{-1} .

Versuch 4:Darstellung von C₃₀-Aldehydazin **79**

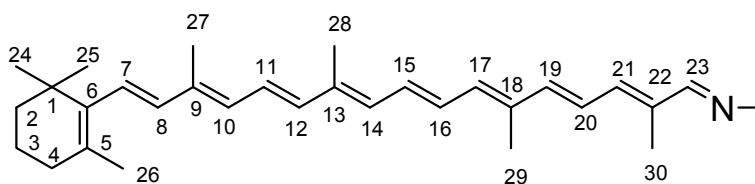
1,2-Bis-[[2,6,11,15-tetramethyl-17-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)heptadeca-2,4,6,8,10,12,14,16-octaenyliden]]hydrazin

In einem 50 ml Kolben mit Rückflußkühler werden 0.8 g (1.9 mmol) C₃₀-Aldehyd [2,6,11,15-tetramethyl-17-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)heptadeca-2,4,6,8,10,12,14,16-octaenal] **83** in Ethanol vorgelegt. In einem weiteren 50 ml Kolben werden 0.56 g (3.8 mmol) Phthalsäureanhydrid in 15 ml Ethanol suspendiert. Es werden wenige Tropfen Wasser zugegeben, sodass annähernd alles Anhydrid umgewandelt ist und kein Bodensatz im Glaskolben vorhanden ist. Zu dieser Lösung werden 0.20 ml (4.0 mmol) 100%iges Hydrazinhydrat gegeben. Der Inhalt des Kolbens wird in einer Portion zur Aldehydkomponente gegeben. Nach Zugabe wird die Reaktionsmischung auf 45 °C erwärmt und für etwa 48 h gerührt. Die erhaltenen dunkelroten Kristalle werden abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.19 g (0.2 mmol) 24%

Smp.: 189°C

Verwendete Carotinoid-Bezifferung:



¹H-NMR 300 MHz **79** (CDCl₃, TMS)

δ [ppm] = 1.03 (s, 12H, 24,24'-H und 25,25'-H), 1.44-1.49 (m, 4H, 2-H und 2'-H), 1.60-1.64 (m, 4H, 3-H und 3'-H), 1.72 (s, 6H, 26-H und 26'-H), 1.99 (s, 6H, 30-H und 30'-H), 2.07 (s, 6H, 28-H und 28'-H), 2.09 (s, 12H, 27,27'-H und 29,29'-H), 2.01-2.11 (m, 4H, 4-H und 4'-H), 6.10-6.43 (m, 14H, 8,8'-H und 10,10'-H und 12,12'-H und 14,14'-H und 17,17'-H und 21,21'-H), 6.49-6.75 (

m, 14H, 11,11'-H und 15,15'-H und 16,16'-H und 19,19'-H und 20,20'-H), 8.22 (s, 2H, 23,23'-H).

^{13}C -NMR 75 MHz **79** (CDCl_3 , TMS)

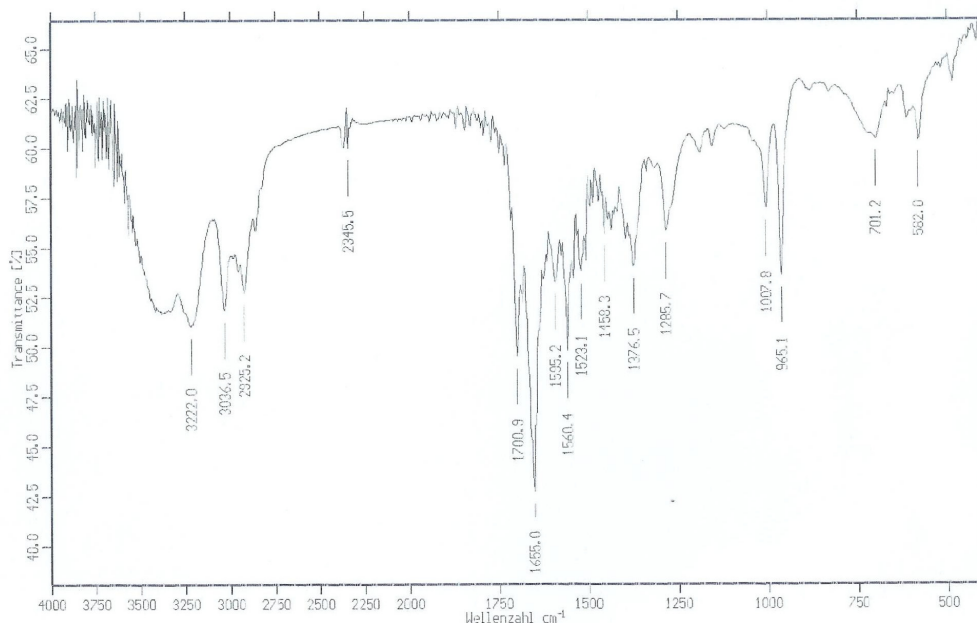
Aufgrund der Schwerlöslichkeit der Substanz wird nur der Peak der Imin-Kohlenstoffe zugeordnet: δ [ppm] = 175.91 (23-C und 23'-C).

UV-Vis-Daten (Ethanol): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 518.6 (1.90) nm.

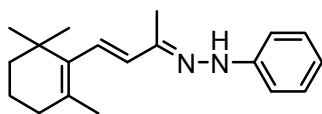
Massenspektrum **79** Bruker MALDI TOF in CHCl_3 LDI:

m/z: 829.863 $[\text{M}]^+$, 414.265 $[\text{M}/2]^+$ (erwartet 829.632)

IR-Spektrum **79** (KBr-Pressling):



$\tilde{\nu}$ (Zuordnung) = 3222 (-N-H Valenz assoziiert), 3036 (=C-H Valenz), 2925 (-CH₃ -CH₂- Valenz), 1700 und 1655 (-C=C Valenz), 1560 (C=N Valenz), 1458 und 1376 (-C-H Deformation), 1285 (-N=C-H Deformation), 965 (=C-H Deformation) cm^{-1} .

Versuch 5:Darstellung von β -Jononphenylhydrazon **88**

1-[4-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)but-3-en-2-yliden]-2-phenylhydrazin

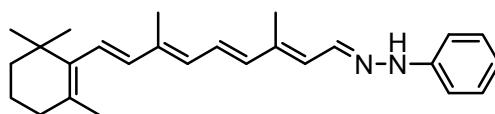
In einem 50 ml Kolben werden 0.76 g (4.0 mmol) frisch destilliertes β -Jonon **6** in 15 ml Ethanol gelöst vorgelegt. Dann wird in einer Portion 0.39 ml (4.0 mmol) Phenylhydrazin (frisch destilliert) zugegeben. Die Lösung wird mit einem Tropfen Essigsäure versetzt und 6 h bei einer Badtemperatur von 50 °C gerührt. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer entfernt und als Rückstand erhält man ein braunes Öl. Die Substanz wird an Kieselgel mit dem Laufmittel Hexan/Chloroform/Essigsäureethylester 88/9/3 chromatographiert ($R_{t \text{ Platte}}=0.6$). Wahlweise kann auch an Aluminiumoxid (neutral) mit Ethanol als Eluens ($R_{t \text{ Platte}}=0.9$) chromatographiert werden. Man erhält ein gelbes Öl.

Ausbeute: 0.81 g (2.9 mmol) 72%

Sdp: n.b. da Polymerisation

Massenspektrum **88** Finnigan MAT 70 eV EI, Pt. 40°C:

m/z (%): 281 (5) $[M-1]^+$, 265 (6) $[M-CH_3]^+$, 192 (3) $[M-(NH-Ph)]^+$, 177 (66) $[M-(N_2H-C_6H_6)]^+$, 149 (7) $[(C_{11}H_{17})]^+$, 135 (22) $[(C_{10}H_{16})-1]^+$, 123 (100) $[(C_9H_{15})]^+$, 91 (14) $[(HN-C_6H_6)]^+$, 77 (24) $[(C_6H_6)]^+$, 69 (11) $[(C_4H_{10})]^+$, 43 (66) $[(C_3H_6)]^+$.

Versuch 6:Darstellung von Retinalphenylhydrazon **90**

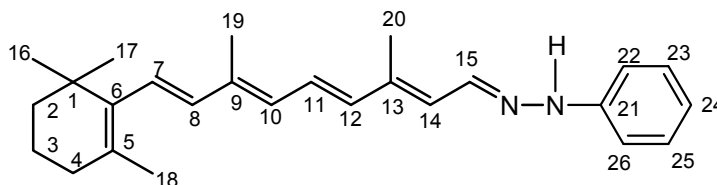
1-[3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenyliden]-2-phenylhydrazin

In einem 50 ml Kolben werden 0.52 g (1.8 mmol) Retinal **81** in 20 ml Ethanol gelöst vorgelegt. Dann wird in einer Portion 0.18 ml (1.8 mmol) Phenylhydrazin (frisch destilliert) zugegeben. Die Lösung wird 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die gelben Kristalle werden abfiltriert. Die Zugabe von wenig Essigsäure zur Mutterlauge ist nur dann erforderlich, wenn sich nach 24 h aus der abfiltrierten Lösung weiterhin Kristalle abscheiden. Das Filtrat wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.39 g (1.0 mmol) 58%

Smp.: 122°C

Verwendete Carotinoid-Bezifferung:



$^1\text{H-NMR}$ 500 MHz **90** (CDCl_3 , TMS)

δ [ppm] = 1.03 (s, 6H, 16-H und 17-H), 1.45-1.49 (m, 2H, 2-H), 1.60-1.64 (m, 2H, 3-H), 1.72 (s, 3H, 18-H), 1.97 (s, 3H, 19-H), 1.99 (s, 3H, 20-H), 2.02-2.07 (m, 2H, 4-H), 6.13 (d, $^3J=15.9$ 1H, 8-H), 6.16 (d, $^3J=13.0$ 1H, 10-H), 6.20 (d, $^3J=16.6$ 1H, 7-H), 6.36 (d, $^3J=14.9$ 1H, 12-H), 6.69 (dd, $^3J=11.3$ und $^3J=14.8$ 1H, 11-H), 6.80-6.86 (m, 1H, 24-H), 7.00-7.09 (m, 2H, 23-H und 25-H), 7.23-7.27 (m, 2H, 22-H und 26-H), 7.73 (d, $^3J=10.1$ 1H, 14-H), 7.90 (d, $^3J=11.1$ 1H, 15-H), 7.93 (br, 1H, N-H).

^{13}C -NMR 125 MHz **90** (CDCl_3 , TMS)

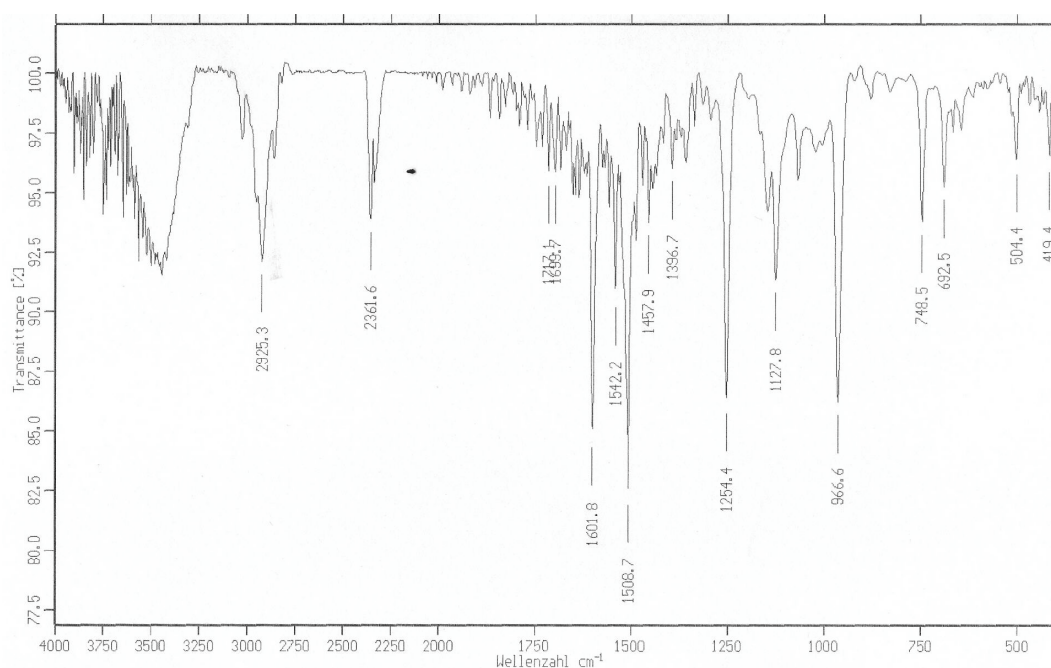
δ [ppm] = 12.78 (19-C), 12.89 (20-C), 19.28 (3-C), 21.77 (18-C), 28.99 (16-C und 17-C), 33.13 (4-C), 33.29 (1-C), 39.64 (2-C), 112.67 (22-C und 26-C), 119.99 (24-C), 129.28 (23-C und 25-C), 129.51 (12-C), 129.59 (11-C), 130.49 (5-C), 134.77 (8-C), 135.88 (10-C), 137.08 (14-C), 137.69 (13-C), 137.87 (6-C), 144.39 (21-C), 144.50 (15-C).

UV-Vis-Daten (Hexan): λ_{max} ($\log \varepsilon$) = 396.8 (5.02) nm.

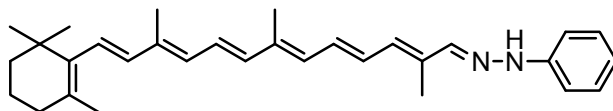
Massenspektrum **90** Finnigan MAT 70 eV EI, Pt. 80 °C:

m/z (%): 374 (14) $[\text{M}]^+$, 284 (54) $[\text{M}-(\text{NH}-\text{Ph}-2)]^+$, 223 (21) $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2-2]^+$, 197 (33) $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2]^+$, 185 (37) $[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$, 171 (100) $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2]^+$, 159 (54) $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2]^+$, 145 (58) $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2]^+$, 133 (47) $[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2]^+$, 119 (57) $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2]^+$, 106 (58) $[\text{N}_2\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6]^+$, 91 (57) $[\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_6]^+$, 77 (47) $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$, 69 (26) $[(\text{C}_4\text{H}_{10})]^+$, 43 (33) $[(\text{C}_3\text{H}_6)]^+$

IR-Spektrum **90** (KBr-Pressling):



$\tilde{\nu}$ (Zuordnung) = ~ 3500 (-N-H Valenz assoziiert), 2925 (-CH₃ -CH₂- Valenz), 2361 (-C=N- Valenz), 1699, 1601 (-C=N Valenz), 1508 (C=C Valenz), 1457, 1396 (-C-H Deformation), 1254 (=N-H Deformation), 966 (=C-H Deformation), 748 (=C-H Deformation arom.) [cm^{-1}].

Versuch 7:Darstellung von C₂₅-Aldehydphenylhydrazon **91**

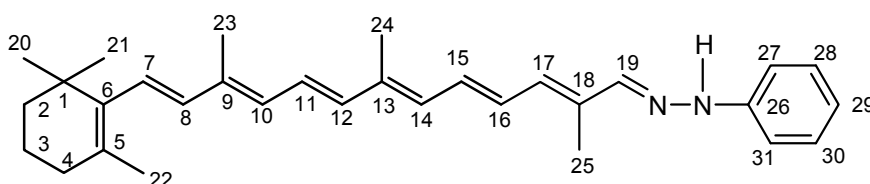
1-[2,7,11-trimethyl-13-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)trideca-2,4,6,8,10,12-hexaenyliden]-2-phenylhydrazin

In einem 50 ml Kolben werden 0.70 g (2.0 mmol) C₂₅-Aldehyd [2,7,11-trimethyl-13-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)trideca-2,4,6,8,10,12-hexaenal] **82** in 20 ml Ethanol (nicht vollständig gelöst) vorgelegt. Dann wird in einer Portion 0.20 ml (2.0 mmol) Phenylhydrazin (frisch destilliert) zugegeben. Die Lösung wird 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Reaktionsansatz werden 1 ml Essigsäure gegeben. Nach Zugabe beginnt sich das Produkt langsam abzuscheiden. Die erhaltenen orangen Kristalle werden abfiltriert. Das Filtrat wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.58 g (1.3 mmol) 66%

Smp.: 160°C

Verwendete Carotinoid-Bezifferung:



¹H-NMR 500 MHz **91** (CDCl₃, TMS)

δ [ppm] = 1.03 (s, 6H, 20-H und 21-H), 1.45-1.49 (m, 2H, 2-H), 1.60-1.64 (m, 2H, 3-H), 1.72 (s, 3H, 22-H), 1.97 (s, 3H, 23-H), 1.98 (s, 3H, 24-H), 2.09 (s, 3H, 25-H), 2.09-2.22 (m, 2H, 4-H), 6.15-6.34 (m, 3H, 7-H, 8-H, 10-H), 6.62-6.69 (m, 3H, 12-H, 16-H, 17-H), 6.84-6.91 (m, 1H, 11-H), 7.05 (d, ³J=12.4 1H, 14-H), 7.22-7.7.28 (m, 1H, 29-H), 7.36-7.40 (m, 2H, 27-H und 31-H), 7.42-7.48 (m, 2H, 28-H und 30-H), 7.78 (d, ³J=10.6 1H, 15-H), 8.05 (d, ³J=10.7 1H, 19-H), 8.14 (br, 1H, N-H).

^{13}C -NMR 125 MHz **91** (CDCl_3 , TMS)

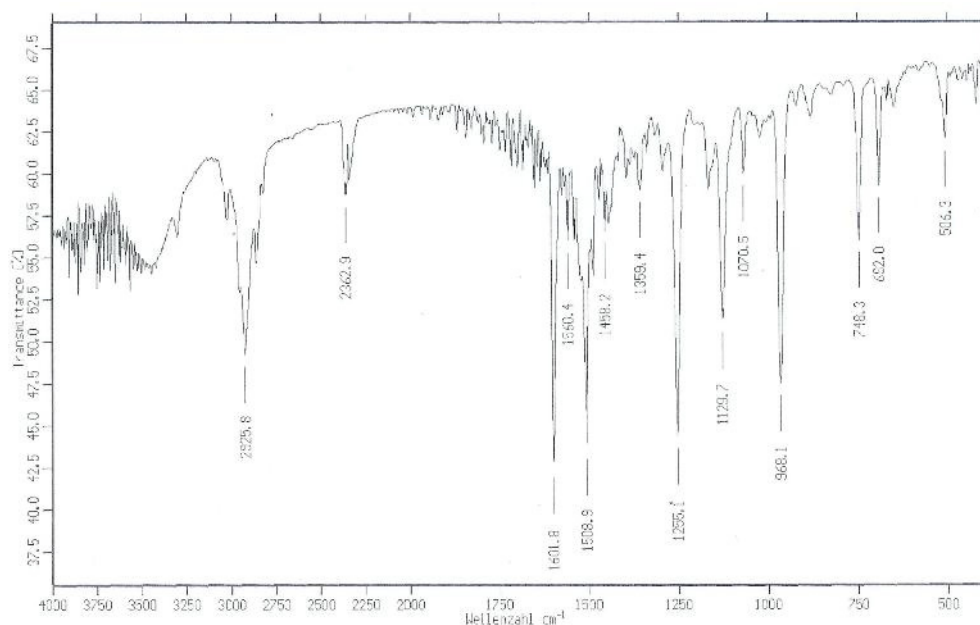
δ [ppm] = 12.73 (23-C), 12.82 (24-C), 12.89 (25-C), 19.28 (3-C), 21.78 (22-C), 28.99 (20-C und 21-C), 33.13 (4-C), 33.29 (1-C), 39.64 (2-C), 112.61 (27-C und 31-C), 119.92 (29-C), 125.58 (7-C), 127.02 (10-C), 127.67 (12-C), 128.75 (17-C), 129.06 (14-C), 129.51 (28-C und 30-C), 129.77 (16-C), 130.49 (5-C), 134.77 (8-C), 135.88 (11-C), 136.60 (15-C), 137.07 (6-C), 137.54 (9-C), 137.69 (13-C), 138.53 (18-C), 141.05 (28-C), 144.39 (19-C).

UV-Vis-Daten (Hexan): λ_{max} (log ϵ) = 435.6 (4.92) nm.

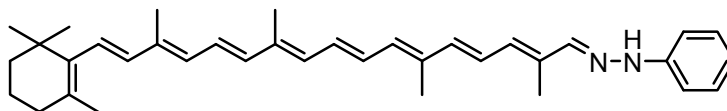
Massenspektrum **91** Finnigan MAT 70 eV EI, Pt. 250°C:

m/z (%): 440 (84) $[\text{M}]^+$, 348 (83) $[\text{M}-(\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_6)]^+$, 332 (18) $[\text{M}-(\text{N}_2\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6)-2]^+$, 256 (16) $[\text{C}_{19}\text{H}_{27}]^+$, 223 (27) $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2]^+$, 210 (65) $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}-2]^+$, 171 (93) $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2]^+$, 158 (89) $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2]^+$, 145 (100) $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2]^+$, 134 (44) $[\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2+2]^+$, 119 (67) $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2]^+$, 105 (58) $[\text{N}_2-\text{C}_6\text{H}_6]^+$, 92 (89) $[\text{N}-\text{C}_6\text{H}_6]^+$, 76 (45) $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$, 69 (42) $[(\text{C}_4\text{H}_{10})]^+$, 43 (29) $[\text{C}_3\text{H}_6]^+$

IR-Spektrum **91** (KBr-Pressling):



$\tilde{\nu}$ (Zuordnung) = ~ 3500 (-N-H Valenz assoziiert), 2925 (-CH₃ -CH₂- Valenz), 2362 (-C=N-N- Valenz), 1601 (-C=N Valenz), 1508 (C=C Valenz), 1458, 1359 (-C-H Deformation), 1255 (C=N- Deformation), 968 (=C-H Deformation), 748 (=C-H Deformation arom.) [cm^{-1}].

Versuch 8:Darstellung von C₃₀-Aldehydphenylhydrazon **92**

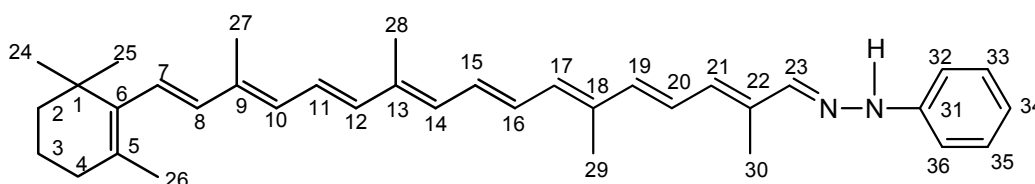
1-[2,6,11,15-tetramethyl-17-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)heptadeca-2,4,6,8,10,12,14,16-octaenyliden]-2-phenylhydrazin

In einem 50 ml Kolben werden 1.0 g (2.4 mmol) C₃₀-Aldehyd [2,6,11,15-tetramethyl-17-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)heptadeca-2,4,6,8,10,12,14,16 - octa-enal] in 15 ml Ethanol suspendiert vorgelegt. Dann wird in einer Portion 0.25 ml (2.4 mmol) Phenylhydrazin (frisch destilliert) zugegeben. Die Lösung wird 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 ml Essigsäure beginnt sich das Produkt abzuscheiden. Der Ansatz wird für 24 h stehen gelassen, dann werden die roten Kristalle abfiltriert und das Filtrat wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.8 g (1.6mmol) 66%

Smp.: 172°C

Verwendete Carotinoid-Bezifferung:



¹H-NMR 500 MHz **92** (CDCl₃, TMS)

δ [ppm] = 0.96 (s, 6H, 24-H und 25-H), 1.38-1.45 (m, 2H, 2-H), 1.52-1.57 (m, 2H, 3-H), 1.65 (s, 3H, 26-H), 1.89 (s, 6H, 28-H und 29-H), 1.90 (s, 3H, 27-H), 1.93-1.96 (m, 2H, 4-H), 2.04 (s, 3H, 30-H), 6.05-6.12 (m, 3H, 7-H, 8-H und 10-H), 6.17-6.22 (m, 2H, 12-H und 14-H), 6.84-6.91 (d, ³J=14.9 1H, 11-H), 6.80-6.86 (m, 4H, 14-H, 16-H, 32-H und 36-H), 6.74-6.80 (m, 1H, 34-H), 6.95-7.00 (m, 2H, 33-H und 35-H), 7.15-7.20 (m, 3H, 19-H, 21-H und 17-H), 7.29-7.32 (d, ³J=14.8 1H, 20-H), 7.42-7.47 (d, ³J=18.8 1H, 23-H), 7.93 (br, 1H, N-H).

^{13}C -NMR 125 MHz **92** (CDCl_3 , TMS)

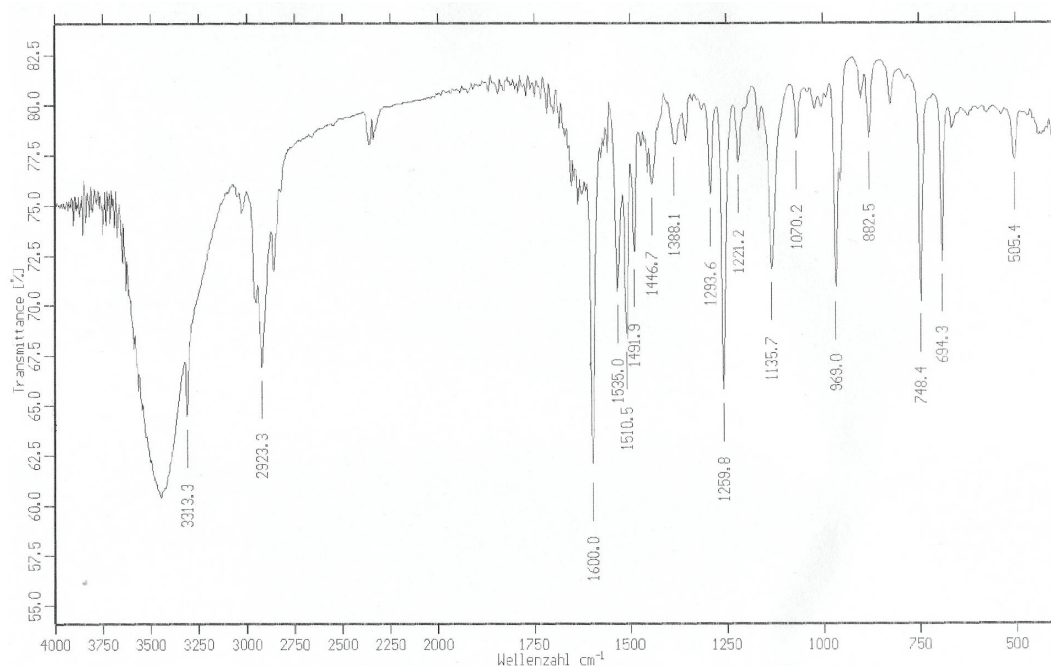
δ [ppm] = 12.54 (28-C), 13.18 (27-C und 29-C), 13.26 (30-C), 19.66 (3-C), 22.18 (26-C), 29.39 (24-C und 25-C), 33.53 (4-C), 34.69 (1-C), 40.05 (2-C), 113.01 (32-C und 35-C), 120.26 (34-C), 124.83 (7-C), 125.70 (10-C), 127.11 (12-C), 129.11 (33-C und 36-C), 130.27 (11-C), 130.99 (21-C), 131.22 (5-C), 132.76 (14-C), 133.48 (8-C), 133.89 (16-C), 134.06 (20-C), 136.63 (15-C), 137.31 (17-C), 137.31 (19-C), 137.56 (6-C), 138.14 (13-C), 138.23 (18-C), 138.31 (9-C), 138.95 (22-C), 143.05 (31-C), 145.07 (23-C).

UV-Vis-Daten (Hexan): λ_{max} ($\log \varepsilon$) = 464.4 (4.50) nm.

Massenspektrum **92** 70 eV EI, Pt. 200 °C:

m/z (%): 506 (7) $[\text{M}]^+$, 413 (15) $[\text{M}-(\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_6)]^+$, 348 (9) $[\text{C}_{26}\text{H}_{35}]^+$, 333 (18) $[\text{C}_{25}\text{H}_{34}-1]^+$, 276 (15) $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}]^+$, 236 (22) $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2-2]^+$, 224 (20) $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2]^+$, 210 (55) $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}]^+$, 196 (20) $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$, 185 (22) $[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$, 170 (52) $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2]^+$, 158 (66) $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2]^+$, 145 (81) $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2]^+$, 121 (67) $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2-2]^+$, 105 (59) $[\text{N}_2-\text{C}_6\text{H}_6]^+$, 93 (100) $[\text{N}-\text{C}_6\text{H}_7]^+$, 77 (47) $[\text{C}_6\text{H}_6]^+$, 69 (44) $[(\text{C}_4\text{H}_{10})]^+$, 55 (27) $[(\text{C}_4\text{H}_7)]^+$, 43 (18) $[\text{C}_3\text{H}_6]^+$.

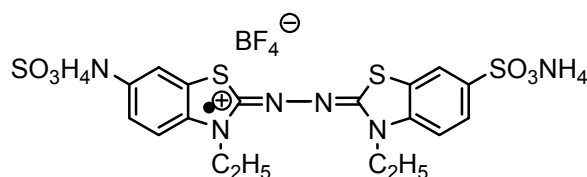
IR-Spektrum **92**:



$\tilde{\nu}$ (Zuordnung) = 3350 (-N-H Valenz assoziiert), 2923 (-CH₃ -CH₂- Valenz), 2350 (-C=N-N- Valenz), 1600 (-C=N Valenz), 1535,1510 (C=C Valenz), 1446,1388 (-C-H Deformation), 1259 (=N-N-H Deformation), 969 (=C-H Deformation), 748 (=C-H Deformation arom.) [cm⁻¹].

Versuch 9:

Darstellung von Radikalsalz **106**:



In einem 50 ml Kolben werden 0.55 g (1 mmol) 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6,6'-diammoniumsulfonat (ABTS) in 25 ml Dimethylformamid gelöst. Unter sachtem Erwärmen werden 0.27 g (1 mmol) Kaliumperoxodisulfat in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Die Kaliumperoxodisulfat-Lösung wird warm (40°C) zu der ABTS-Lösung getropft. Dabei verfärben sich die Lösungen tiefblau. Nach vollständiger Zugabe der Kaliumperoxodisulfat-Lösung wird die Mischung filtriert. Das Filtrat wird mit 0.28 g (2.5 mmol) NaBF₄ in 5 ml DMF versetzt. Es fallen blaue Kristalle aus. Die Kristallisation wird etwa 5 Stunden im Kühlschrank vervollständigt. Die erhaltenen Kristalle werden mit einem Gemisch aus 30 Vol.% Dimethylformamid und 70 Vol.% konzentrierter Essigsäure gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 0.51 g (0.8 mmol) 77% (MW.: 665.55 g/mol)

Smp: 187°C (Lit.^[68]: 186-190°C)

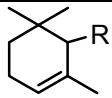
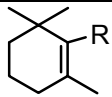
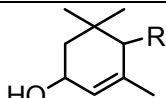
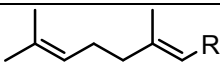
UV-Vis-Spektrum:

Ethanol: $\lambda_{\max}$ [nm] (log ϵ) = 345 (0.0), 415 (3.46), 734 (1.11)

Tabelle: Verwendete biochemische Abkürzungen

Abkürzungsverzeichnis	
ROS	R eaktive o xxygen s pecies
ELISA	E nzyme-linked-immunosorbent- a ssay
PGF	P rostaglandin Typ- F
TBAR	T hiob a rbituric-acid
MN	M ononuclease
SVPD	S nake V enom P eroxidase
TRAP	T otal R adical-trapping A ntioxidant P arameter
ORAC	O xxygen R adical A bsorption C apacity
TEAC	T rolox e quivalent a ntioxidant c apacity
AOA	A ntioxidant A ctivity
DPPH	1,1'- D iphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)- h ydrazinyl
AUC	A rea u nder C urve
RAA	R elative A ntioxidant A ctivity
PBS	P hosphate b uffered S aline

Tabelle: IUPAC-Nomenklatur^[1] (Rule 3.2 Prefixes for End-group designation) der Carotinoid-Endgruppen.

Carotinoid-Endgruppen-Nomenklatur	
α -Endgruppe	
β -Endgruppe	
ε -Endgruppe	
ψ -Endgruppe	

11. Literatur

- [1] IUPAC Commission on the Nomenclature of Biological Chemistry *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 83, 5583-5590.
- [2] Peto R., Doll R., *Nature* **1981**, 290, 201-208.
- [3] Stringer M. D., Goroy P. G., Freemann A., Kakkar V. V.,
Br. J. Med. **1989**, 298, 281-284.
- [4] McCord J. M., *New Eng. J. Med.* **1985**, 312, 159-163.
- [5] Lunec J., Halloran S. P., White A. G., Dormandy T. L.,
J. Rheumatol. **1981**, 8, 233-245.
- [6] Connors T. A., Slater T. F. (Eds.) S.143 in Eicosanoids,
Lipidperoxidation and Cancer, Springer Verlag Berlin **1989**.
- [7] Burton G. W., Ingold K. U., *Science* **1984**, 224, 569-573.
- [8] Mordí R. C., Walton J. C., Burton G. W., Ingold K. U., Hughes L., Lindsay
D. A., *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4203-4206.
- [9] Liebler D. C., Kennedy T. A., *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 290-295.
- [10] Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M., Niki E.,
Arch. Biophys. Biochem. **1995**, 323, 137-147.
- [11] Palozza P., Nriensky N.I., *Free Radical Biol. Med.* **1991**, 11, 407-414.
- [12] Handelman G. J., van Kuijk F. J. G. M., Chatterje A., Krinsky N. I.,
Free Radical Biol. Med. **1991**, 10, 427-437.
- [13] Kanasawud P., Crouzet J. C., *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 237-243.
- [14] Yanisheva N. V, Aitzmüller K., Raneva V. G.,
Fett/Lipid **1998**, 100(10), 444-462.
- [15] Rice-Evans C. A., Sampson J., Bramley P. M., Holloway D. E.,
Free Rad. Res. **1997**, 26, 381-398.
- [16] El-Tinay A .H., Chichester C. O., *J. Org.Chem.* **1970**, 35(7), 2290-2293.

- [17] Yamauchi R., Miyake N., Inoue H., Kato K.,
J. Agric. Food Chem. **1993**, 41, 708-713.
- [18] Pfander H., Zürcher M., Niggli U.A., Steck A.,
Tetrahedron Lett. **1997**, 38(45), 7853-7856.
- [19] Pfander H., Zürcher M., *Tetrahedron* **1999**, 55, 2307-2310.
- [20] Frei B., Yamamoto Y., Niclas D., *Anal. Biochem.* **1988**, 175(1), 120-130.
- [21] Akasaka K., Ohrui H., Meguro H.,
J. Chrom. Biomed. Applications **1993**, 617(2), 205-211.
- [22] Kortytowski W., Bachowski G. J., Girotti A. W.,
Anal. Biochem. **1993**, 213, 111-119.
- [23] Gutteridge J. M. C., *Free Rad. Res. Comms.* **1986**, 1, 173-184.
- [24] Bird R. P., Hung S. S. O., Hadley M., *Anal. Biochem.* **1983**, 128, 240-244.
- [25] Therasse J., Lemannier F.,
J. Chrom. Biomed. Applications **1987**, 413, 237-241.
- [26] Roberts II L. J., Morrow J. D., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 808-820.
- [27] Halliwell B., *Cardiovasc. Res.* **2000**, 47, 410-416.
- [28] Basu S., *Free Radical Res.* **2004**, 38, 105-122.
- [29] Collins A. R., Cadet T., Moller L., Poulsen H. E., Vina J.,
Arch. Biochem. Biophys. **2004**, 423, 57-65.
- [30] Halliwell B., *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 968-974
- [31] Douki T., Delatour T., Paganon F., Cadet J.,
Chem. Res. Toxicol. **1996**, 9, 1145-1149.
- [32] Genox Corp. 1414 Key Highway Baltimore MD 21230 USA 8-Oxod G Elisa.
- [33] Collins A. R., Duthie S. J., Dobson V. L.,
Carcinogenesis **1993**, 14, 1733-1735.
- [34] Randerath K., Reddy M. V., Gupta R. C.,
Proc. Natl. Acad. Sci. **1993**, 78(10), 6126-6129.

- [35] Liuzzi M., Weinfeld M., Paterson M. C., *J. Biol. Chem.*
J. Biol. Chem **1989**, 264(11), 6355-6363.
- [36] Lunec J., Griffiths H.R., Measuring in vivo oxidative Damage
A practical Approach Wiley & Sons Chichester **2000**.
- [37] Routledge M. N., Lunec J., Bennett N., Jones G. D. D.,
Carcinogenesis **1999**, 20(3), 503-507.
- [38] Izumi Y., Chibata I., Itoh T., *Angew. Ch (dt.)*. **1978**, 90, 187-194.
- [39] Enderlin J., *Phys. Rev. Lett.* **1999**, 83, 3804-3807.
- [40] Murai A., Tachikawa Y.,
Z. Lebensm. und Forschung A **1965**, 127(5), 283-291.
- [41] Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A.,
Ahm B., Shaltiel S., Stadtman R., *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 464-478.
- [42] Degenhardt T. P., Thorpe S. R., Baynes J. W.,
Cell. Molec. Biol. **1998**, 44, 1139-1145.
- [43] Zhang H., Joseph J., Feix J., Hogg N., Kalyanaraman B.,
Biochemistry **2001**, 40(25), 7675-7686.
- [44] Ingold K. U., *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 1-9.
- [45] Wayner D. D. M., Burton G. W., Ingold K. U., Barclay L. R. C., Locke S. J.,
Biochem. Biophys. Acta **1987**, 924(3), 408-419.
- [46] Whitehead T. P., Thorpe G. H. G., Maxwell S. R. J.,
Nature **1983**, 305, 158-159.
- [47] Blois M. S., *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
- [48] Cao G. Alessio H. M., Cutler R. G.,
Free Radical Biol. Med. **1993**, 14, 303-313.
- [49] Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinthan V., Milner A.,
Clin. Sci. **1993**, 84, 407-412.

- [50] Beilstein Band E V 18.2 „Radicals in solution“ Springer Verlag **1994**.
- [51] Whitehead T. P., Thorpe G. H. G, Maxwell S. R. J.,
Anal. Chim. Acta **1992**, 266, 265-277.
- [52] Easten P. M., Simmonds A. C., Ask R., Egorov A. M., Candeias L. P.,
J. Am. Chem. Soc. **1996**, 118, 6619-6624.
- [53] Ohnishi M., Morishita H., Iwahashi H., Toda S., Shirataki M., Kimura M.,
Kido R., *Phytochemistry* **1994**, 36, 579-589.
- [54] Zhuang Q. K., Scholz F., Pragst F.,
Electrochemistry Communication **1999**, 1, 406-411.
- [55] DeLange R. J., Glazer A. N., *Anal. Biochem.* **1989**, 177, 300-306.
- [56] Curtius, Tiemann *J. prakt. Chemie* **1891**, 44, 161.
- [57] Appenroth K., Reichenbacher M., Paetzold R.,
Tetrahedron **1981**, 37, 569-573.
- [58] Ogilvie J. F., Horne D. G., *J. Phys. Chem.* **1968**, 48, 2248-2252.
- [59] Overberger C. G., Bilech H., Finestone A. B., Lilker J., Herbert J.,
J. Am. Chem. Soc. **1953**, 75, 2078-2090.
- [60] Kuhn R., Hoffer A., *Chem.Ber.* **1930**, 63(8), 2164-2174.
- [61] Inhoffen H. H., Leibner G., *Liebigs Ann. Ch.*, **1951**, 575(1), 105-111.
- [62] Houben-Weyl „Methoden der organischen Chemie“ Band 7 S.95
Thieme Verlag **1953**.
- [63] Pasha M. A., Nanjundaswamy H. M., *Synth. Commu.* **2006**, 36, 3161-3171.
- [64] Inhoffen H. H., Bohlmann F., *Liebigs Ann. Ch.*, **1951**, 573(1), 1-9.
- [65] Dissertation Broszeit, G. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1997**.
- [66] Heilbronner E., Bock H., Das HMO-Modell und seine Anwendungen
Verlag Chemie Weinheim **1968**.
- [67] Pople J. A., Beveridge D. L., Approximate Molecular Orbital Theory
McGraw Hill New York **1970**.

- [68] Dewar M. J. S., *J. Am. Chem. Soc* **1977**, 99, 4899-4905.
- [69] Allinger N. J., Sprague J. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 3893-3901.
- [70] Hagen K., Bondybey V., Hedberg K.,
J. Am. Chem. Soc **1977**, 99, 1365-1369.
- [71] Cole K. C., Oglive J. F., *Can. J. Spectrosc.* **1975**, 20, 162-166.
- [72] Mannfors B., Koskinen J. T., Pieilä L. O., Ahjopalo L.,
J. Mol. Struct. (Theochem) **1997**, 393, 39-58.
- [73] Euler W. B., Schmitz B. K., *J. Comput. Chem.* **1994**, 15(10), 1163-1175.
- [74] Bock C. W., George P., Trachtman M.,
J. Comput. Chem **1984**, 5(4), 395-410.
- [75] Kwon Y., Kwon O., Choo J., Sunghwan K.,
J. Mol. Struct. (Theochem) **2004**, 685, 185-189.
- [76] Rademacher P., Kirste K., Poppek P., *Chem. Ber.* **1984**, 117, 1061-1068.
- [77] Houben-Weyl „Methoden der organischen Chemie“ Band 10/2 S. 458
Thieme Verlag **1987**.
- [78] Organikum Deutscher Verlag der Wissenschaften S.307 Berlin **1990**.
- [79] Pacansky J., McLean A. D., Miller M. D., *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 90-98.
- [80] Benassi R., Taddei F., *J. Chem. Soc. Perkin Trans II* **1985**, 1629-1632.
- [81] Pople J. A., Hehre W. J., Radom L.,
J. Am. Chem. Soc. **1972**, 94(5), 1496-1504.
- [82] Rademacher P., Pfeffer H. U., *J. Chem Res. (M)* **1979**, 2501-2509.
- [83] Salem A. A., El-Taher S., *Struct. Chem.* **1998**, 9(3), 169-177.
- [84] Sorensen T. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5075-5084.
- [85] Kispert L. D., Grant J. L., Kramer V. J., Ding R.,
J. Am. Chem. Soc. **1988**, 110, 2151-2157.

- [86] Lafferty J., Roach A., Sincliar R. S., Truscott T. G., Land E. J.,
J. Chem. Soc. Farad. Trans I **1997**, 73, 416-429.
- [87] Hünig S., Balli H., Conrad H., Schott A., *Liebigs Ann. Ch.* **1964**, 676, 36-51.
- [88] Hünig S., Balli H., Conrad H., Schott A., *Liebigs Ann. Ch.* **1964**, 676, 52-65.
- [89] Koleva I., Niederländer H. A. G., van Beek T. A.,
Anal. Chem. **2001**, 73, 3373-3381.
- [90] Miller N. J., Rice-Evans C., *Methods Enzymol.* **1994**, 234, 279-293.
- [91] van den Berg R., Haenen G. R., van den Berg H., Bast A.,
Food Chem. **1999**, 66, 511-517.
- [92] Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P., Rice-Evans C. A.,
Free Rad. Bio. Med. **1999**, 26(9/10), 1231-1237.
- [93] Ziplies M. F., Lee W. A., Bruice T. C.,
J. Am. Chem. Soc. **1987**, 108, 4433-4456.
- [94] Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H., *Life Science* **2004**, 74, 2157-2184.
- [95] Schlesier K., Harvat M., Böhm V., Bitsch R.,
Free Rad. Res. **2002**, 36(2), 177-187.
- [96] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans
C.A., *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26, 1231-1237.
- [97] Cano A., Hernandez-Ruiz F., Garcia-Canovas M., Acosta M., Arnao M. B.,
Phytochem. Anal. **1998**, 9, 196-205.
- [98] Yu T.W., Ong C.N., *Anal. Biochem.* **1999**, 275, 217-233.
- [99] Kunze, Udo Grundlagen der qualitativen Analyse Thieme Verlag **1986**.
- [100] Wolfenden B. S., Willson R. L.,
J. Chem. Soc. Perkin Trans II **1982**, 805-808.
- [101] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B.,
Free Rad. Res. **1995**, 22, 375-384.
- [102] Privatmitteilung Perez-Galvez.

- [103] Geletii Y. V., Blavoine G. G. A., Efimov O. N., Kulikova V. S.,
Russian J. Bioorganic Chem. **2002**, 28, 551-563.
- [104] Janata J., Williams M. B., *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 1178-1183.
- [105] Thomas M. J., Bielski B. H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3315-3319.
- [106] Liu D., Gao Y., Kispert L. D., *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 488, 140-150.
- [107] Martin H.-D., Ruck C., Schmidt M., Sell S., Beutner S., Mayer B., Walsh
Pure Appl. Chem. **1999** 71(12), 2253-2262.
- [108] Jeevarajan J. A., Kispert L. D., *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 411, 57-66.
- [109] Han R. M., Tian Y. X., Wu Y. S., Wang P., Ai Y. C., Zhang J. P., Skibstedt
L. H., *Photochem. Photobio.* **2006** 82(2), 538-546.
- [110] Scott S. L., Wen-Jang C., Bakac A., Espenson J. H.,
J. Phys. Chem. **1993** 97(25), 6710-6714.
- [111] Silber S., Dissertation Universität Düsseldorf **1988**
- [112] Frost A. A., Pearson R. G., Kinetik und Mechanismen homogener
Chemischer Reaktionen Verlag Chemie Weinheim **1964**.
- [113] Martin H.-D., C.Jäger, Ruck C., Schmidt M., Walsh R., Paust J.,
J. Prakt. Chem. **1999**, 341, 302-308.
- [114] Frixel S., Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2002**.
- [115] Terao J., *Lipids* **1989**, 24, 659-661.
- [116] Schmidt M., Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2001**.
- [117] Scherrers R., Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2005**.
- [118] Koppenpool W. H., *FEBS Lett.* **1990**, 264, 165-167.
- [119] Samokyszyn V. M., Freyaldenhoven M. A., Chang H. C., Freemann J. P.,
Compadre R. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10(11), 795-801.
- [120] Märki-Fischer E., Buchecker R., Eugster C. H., Englert G., Noack K.,
Vecchi M., *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65(7), 2198-2211.

- [121] Karrer P., Jucker E., Rutschmann J., Steinlin K.,
Helv. Chim. Acta **1945**, 28(1), 427-436.
- [122] Haugan J. A., Lianen-Jensen S., *Acta Chem. Scan.* **1994**, 48, 769-778.
- [123] Molnar P., Szabolcs J., Radics L., *Phytochem.* **1986**, 25, 195-199.
- [124] Goodwin T. W. *Ann. Rev. Nutr.* **1986**, 6, 273-297.
- [125] Schiedt K., Lianen-Jensen S., Pfander H. (Ed), Carotinoids: Isolation and
Analysis Vol. 1A s. 81-108 Birkhäuser Basel **1995**.
- [126] Porter N. A., Cudd A. M., Miller R. W., McPhail A. T.,
J. Am. Chem. Soc. **1980**, 102(1), 414-416.
- [127] Mayo F. R., Van Sickle D. E., Arluck R. M., Syz M. G.,
J. Am. Chem. Soc. **1967**, 89, 967-984.
- [128] Burton G., Daroszewski J., Phipps J. U.S. Patent No 5.475.006 **1995**.
- [129] Miki T., Hara Y., *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **1962**, 10, 922-926.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig durchgeführt und abgefasst habe. Als Hilfsmittel wurden nur die angegebenen Quellen verwendet.

Düsseldorf, den

Stefan Sell