

**Carotenylflavonoide:
Synthese, Charakterisierung und
photoprotektive Wirkung in humanen
Hautfibroblasten**

Inaugural – Dissertation

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

vorgelegt von

Bachelor of Science Biochemistry Claas Hundsdörfer
aus Wesel

Düsseldorf 2009

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

Referent: Professor Dr. T. J. J. Müller

Koreferent: Professor Dr. W. Stahl

Tag der mündlichen Prüfung:

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin danke ich für die interessante Themenstellung, zahlreiche Gutachten sowie für den mir gewährten Freiraum zur Gestaltung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Stahl danke ich für die Betreuung bei den biochemischen Arbeiten und für die Überlassung eines Laborarbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. T. J. J. Müller danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Meinen Eltern

Meinem Sohn

Im Rahmen dieser Dissertation entstandene Veröffentlichungen:

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

S. Beutner, S. Frixel, H. Ernst, T. Hoffmann, I. Hernandez-Blanco, C. Hundsdoerfer, N. Kiesendahl, S. Kock, H.-D. Martin, B. Mayer, P. Noack, A. Perez-Galvez, G. Kock, R. Scherrers, W. Schrader, S. Sell, W. Stahl, *ARKIVOC* **2007**, 2007, 279

Spectroscopic Properties of Phenolic and Quinoid Carotenoids: A Combined Theoretical and Experimental Study

C. M. Marian, S. C. Kock, C. Hundsdoerfer, H. D. Martin, W. Stahl, E. Ostroumov, M. G. Mueller, A. R. Holzwarth, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 270.

3,3'-Dihydroxyisorenieratin, ein natürliches Carotinoid mit überlegenen antioxidativen und photoprotektiven Eigenschaften

H.-D. Martin, S. Kock, R. Scherrers, K. Lutter, T. Wagener, C. Hundsdoerfer, S. Frixel, K. Schaper, H. Ernst, W. Schrader, H. Görner, W. Stahl, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 406.

3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a Natural Carotenoid with Superior Antioxidant and Photoprotective Properties

H.-D. Martin, S. Kock, R. Scherrers, K. Lutter, T. Wagener, C. Hundsdoerfer, S. Frixel, K. Schaper, H. Ernst, W. Schrader, H. Goerner, W. Stahl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 400.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	UV-Licht und die Haut	1
1.2	Flavonoide und Carotinoide in der Nahrung	3
1.3	Antioxidative Wirkmechanismen	8
1.4	Problemstellung	12
2	Hauptteil.....	15
2.1	Überblick	15
2.2	Syntheseplanung	16
2.3	Synthesen	16
2.3.1	Carotinoidbausteine (BASF1, BASF2, X21)	16
2.3.2	Flavonoidbaustein 1 (X26)	20
2.3.4	Kupplungsreaktionen 1 (X27, X30).....	22
2.3.5	Flavonoidbaustein 2 (X45)	32
2.3.6	Kupplungsreaktionen 2 (X46)	37
2.3.7	Flavonoidbaustein 3 (X72)	42
2.3.8	Kupplungsreaktionen 3 (X73)	47
2.3.9	Synthese der Subchromophore von Verbindung X46	49
2.4	Untersuchung zur Toxizität (Sulforhodamin B (SRB)-Assay).....	56
2.4.1	Methode nach Skehan et al.	56
2.4.2	Ergebnisse des SRB-Assays	56
2.4.3	Diskussion.....	58
2.5	Untersuchung zur Toxizität nach UVA Bestrahlung (UVA-SRB).....	59
2.5.1	Methodik.....	59
2.5.2	Ergebnisse des UVA-SRB	59
2.5.3	Diskussion.....	60
2.6	Hämoxygenase-Induktion durch UVA (HMOX1-Assay)	61
2.6.1	Verwendete Methoden.....	61
2.6.2	Auswahlkriterien für die Verbindungen	61
2.6.3	Ergebnisse.....	62
2.6.4	Diskussion.....	63
2.7	Diskussion der Ergebnisse	65

3	Zusammenfassung / Summary	67
4	Experimentalteil	71
4.1	Synthetische Experimente	71
4.1.1	Allgemeines.....	71
4.1.2	Versuchsbeschreibungen.....	73
4.1.2.1	V1: 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (X6).....	73
4.1.2.2	V2: 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (X21)..	78
4.1.2.3	V3: 2-Acetylphenyl-4-methylbenzoat (X22).....	83
4.1.2.4	V4: 1-(2-Hydroxyphenyl)-3- <i>p</i> -tolylpropan-1,3-dion (X23).....	86
4.1.2.5	V5: 4'-Methylflavon (X24)	89
4.1.2.6	V6: 4'-Brommethylflavon (X25).....	93
4.1.2.7	V7: 4'-Formylflavon (X26).....	96
4.1.2.8	V8: 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (X27)	100
4.1.2.9	V9: 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthiny)flavon (X30)	105
4.1.2.10	V10: 2-Acetyl-4-methylphenyl 4-methoxybenzoat (X39)	110
4.1.2.11	V11: 1-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)-3- <i>p</i> -anisoylpropan-1,3- dion (X40).....	113
4.1.2.12	V12: 4'-Methoxy-6-methylflavon (X41).....	117
4.1.2.13	V13: 4'-Hydroxy-6-methylflavon (X42).....	121
4.1.2.14	V14: 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (X43).....	125
4.1.2.15	V15: 4'-Benzoyloxy-6-((diethoxyphosphoryl)methyl)flavon (X45)	129
4.1.2.16	V16: 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46)	134
4.1.2.17	V17: 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (X69).....	139
4.1.2.18	V18: 5,7,4'-Triacetoxy-3-methylflavon (X70).....	143
4.1.2.19	V19: ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenyl- phosphonium-bromid (X72)	147
4.1.2.20	V20: 3-(11'-Apo- β -carotiny)-5,7,4'-trihydroxyflavon (X73)	152
4.1.2.21	V21: 2-Acetylphenyl 4-methoxybenzoat (X99)	154
4.1.2.22	V22: 1-(2-Hydroxyphenyl)-3- <i>p</i> -anisoylpropan-1,3-dion (X100).....	157
4.1.2.23	V23: 4'-Methoxyflavon (X101)	160
4.1.2.24	V24: 4'-Hydroxyflavon (X102).....	164
4.1.2.25	V25: (11'-Apo- β -carotiny)-benzol (X104)	168

4.2	Biochemische Experimente	173
4.2.1	Material und Methoden.....	173
4.2.1.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	173
4.2.1.2	Inkubation mit Testsubstanzen.....	174
4.2.1.3	Untersuchung zur Toxizität.....	174
4.2.1.4	Bestrahlung mit UVA-Licht.....	175
4.2.1.5	Untersuchung zur Toxizität nach UVA Bestrahlung	176
4.2.1.6	Hämoxygenase-Induktion durch UVA-Strahlung.....	176
4.2.1.6.1	Allgemeines	176
4.2.1.6.2	Herstellen der Zelllysate	176
4.2.1.6.3	Proteinbestimmung nach Bradford	177
4.2.1.6.4	SDS-PAGE	177
4.2.1.6.5	Western-Blot.....	179
4.2.1.6.6	Immunologischer Nachweis der Hämoxygenase.....	180
4.2.1.6.7	Immunologischer Nachweis der Ladekontrolle	180
4.2.1.6.8	Softwaregestützte Auswertung	181
4.2.1.7	Statistik.....	181
4.2.2	Versuchsbeschreibungen	182
4.2.2.1	Toxizitätsmessungen	182
4.2.2.1.1	V _{Tox1} : Zeaxanthin	182
4.2.2.1.2	V _{Tox2} : 4'-(11'-Apo-β-carotiny)flavon (X27)	183
4.2.2.1.3	V _{Tox3} : 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthiny)flavon (X30)	183
4.2.2.1.4	V _{Tox4} : 6-(11'-Apo-β-carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46)	184
4.2.2.1.5	V _{Tox5} : 4'-Hydroxyflavon (X102)	184
4.2.2.1.6	V _{Tox6} : (11'-Apo-β-carotiny)-benzol (X104)	185
4.2.2.2	Toxizitätsmessungen nach UVA Bestrahlung	186
4.2.2.2.1	V _{UVTox1} : Zeaxanthin	186
4.2.2.2.2	V _{UVTox2} : 4'-(11'-Apo-β-carotiny)flavon (X27).....	187
4.2.2.2.3	V _{UVTox3} : 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthiny)flavon (X30).....	188
4.2.2.2.4	V _{UVTox4} : 6-(11'-Apo-β-carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46).....	189
4.2.2.2.5	V _{UVTox5} : 4'-Hydroxyflavon (X102).....	190
4.2.2.2.6	V _{UVTox6} : (11'-Apo-β-carotiny)-benzol (X104)	191

4.2.2.3	Hämoxygenase-Induktion durch UVA.....	192
4.2.2.3.1	V _{HMOX1} : 6-(11'-Apo-β-carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46).....	192
4.2.2.3.2	V _{HMOX2} : 4'-Hydroxyflavon (X102).....	193
4.2.2.3.3	V _{HMOX3} : (11'-Apo-β-carotiny)-benzol (X104).....	195
5	Literatur.....	197
6	Substanzverzeichnis.....	201

Abkürzungsverzeichnis

*	Markierung für einen statistisch signifikanten Unterschied zweier Mittelwerte im Rahmen der Messunsicherheit (t-Test)
AIBN	2,2'-Azo-bis-(isobutyronitril)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
C ₁₅ -Zea-P-Salz	12-Apo-(R)-zeaxanthinyl-12-phosphonium-chlorid (BASF 1)
C ₂₅ -Aldehyd	12'-Apo-β-carotinal (BASF 2)
C ₂₅ -P-Salz	12'-Apo-β-carotiny-12'-triphenyl-phosphonium-bromid (X21)
CDCl ₃	deutertes Chloroform
COSY	Correlated Spectroscopy
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
¹³⁵ DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer (Θ = 135°)
DIT	Dithranol (Matrixsubstanz MALDI)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deutertes Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission number (numerische Enzymnomenklatur der NC-IUBMB, http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Et ₂ O	Diethylether
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Rinderserum
FTICR-MS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (^{2&3} J _{H-C} -Kopplungen)
HMOX	Hämoxygenase
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (¹ J _{H-C} -Kopplungen)
HMTA	Hexamethylentetraamin (Urotropin, 1,3,5,7-Tetraazaadamantan)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography

HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IR	Infrarot
Da	Dalton (hier: 1 Da = 1 g/mol, eigentlich: 1Da = 1.661*10 ⁻²⁷ kg)
M	molar, mol / l
MeOD	deuteriertes Methanol
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NHN	Normalhöhennull (ehemals Normalnull, NN)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
P-Salz	Triphenylphosphonium-halogenid (-bromid oder -chlorid)
RDA	Retro-Diels-Alder
R _f	Retentionsfaktor
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SAR	Structure-Activity-Relationship (Struktur-Wirkungs-Beziehung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRB	Sulforhodamin B
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-VIS	Ultraviolettes und sichtbares Licht
v/v	Volumenprozent
w/w	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 UV-Licht und die Haut

Die schädigende Wirkung von ultravioletter (UV) Strahlung auf die menschliche Haut ist seit langem bekannt. UV-Licht ruft photooxidative Reaktionen hervor, welche schädigend für Biomoleküle (DNS, Proteine, Lipide etc.) sind und die Integrität und Stabilität von Zellen und Geweben negativ beeinflussen. Es wird angenommen, dass photooxidativer Stress bei der Bildung bestimmter Arten von Hautkrebs, vorzeitiger Hautalterung und Sonnenbrand eine wichtige Rolle spielt. Molekularer Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Peroxylradikale ($\text{ROO}\cdot$) bilden dabei den Hauptteil der durch UV-Licht generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ^[1].

Die ultraviolette Komponente der Sonnenstrahlung, die die Erdoberfläche erreicht, lässt sich in zwei Wellenlängenbereiche, die sich durch ihre physiologische Wirkung unterscheiden, unterteilen: Zum einen in die energiereichere UVB-Strahlung (280-320 nm), die primär für die direkte Schädigung von dem menschlichen Erbgutträger, der DNS (Desoxyribonukleinsäure) durch die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) oder 6-4 Photoprodukten verantwortlich gemacht werden kann ^[2], zum anderen die längerwellige UVA-Strahlung (320-380 nm), welche für lange Zeit als harmlos eingestuft wurde, die jedoch mittlerweile als Ursache für oxidativen Stress in Zellen angesehen wird ^[3] und damit eine indirekte Schädigung biologischer Systeme auslösen kann.

Dabei dringen die Komponenten der UV-Strahlung unterschiedlich tief in die Haut ein. Während das UVB-Licht nur bis in die oberste Hautschicht, die Epidermis, gelangt, erreicht die UVA-Strahlung, die einen Anteil von 98 % am gesamten UV-Licht auf der Erde ausmacht, die tiefer liegenden Gewebe der Dermis (Corium, Lederhaut) ^[4]. Deren zelluläre Bestandteile sind vor allem Fibroblasten und immunologisch aktive Zellen ^[5].

UVA-Strahlung kann eine Vielzahl von Schäden an Biomolekülen verursachen, einschließlich Lipidperoxidation, Oxidation von Proteinen und DNS-Schädigungen wie z.B. die Bildung von 8-Oxoguanin oder auch CPD. Diese Schäden sind zu einem großen Teil an maligner Transformation und der daraus resultierenden Bildung von Tumoren beteiligt.

Es gibt jedoch eine große Anzahl von Verteidigungssystemen in der Zelle, um die Folgen der UV-Einwirkung (UVA und UVB) zu minimieren. Dies sind unter anderem DNS-Reparaturmechanismen, stress-induzierte Signalwege und verschiedene Arten von antioxidativ wirksamen Schutzmechanismen^[6,7]. Letztere werden in enzymatische (wie die Superoxid-Dismutase oder die Glutathion-Peroxidase^[8]) und nichtenzymatische Systeme, die in Kapitel 1.3 genauer beschrieben werden, unterteilt.

Ist eine Reparatur nicht möglich, kann in der Zelle der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet werden, um den Zellverband vor den schädigenden Auswirkungen maligner Transformation zu schützen^[9].

Für den Schutz der Haut vor UV-Einwirkung gibt es, außer der vollständigen Vermeidung der Exposition (Bekleidung etc.), zwei Möglichkeiten. Die topische Anwendung von Sonnenschutzmitteln, die entweder auf chemischem Wege die Lichtenergie in Wärme umwandeln oder physikalisch durch Reflektion das Licht vor dem Eindringen in die Haut hindern, und dem gegenübergestellt die endogene Versorgung der Haut mit photoprotektiven Substanzen. Hierbei werden mit der Nahrung aufgenommene Substanzen durch den Blutkreislauf gleichmäßig im Körper verteilt und im Idealfall in den Zellen der Haut gespeichert, wobei die Verweildauer der Verbindungen im menschlichen Körper stark von ihrer Struktur abhängen (Metabolisierbarkeit, Lipophilie etc.). Zwei wichtige Vertreter, der für die endogene Photoprotektion bedeutsamen Substanzklassen, sind die Flavonoide und Carotinoide.

1.2 Flavonoide und Carotinoide in der Nahrung

Flavonoide und Carotinoide sind in einer Vielzahl von Obst- und Gemüsesorten vorzufinden. Pflanzliche Produkte, wie Rotwein, Kakao und Tee können beträchtliche Mengen an Flavonoiden enthalten. Beide Gruppen natürlich vorkommender sekundärer Pflanzenstoffe unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich voneinander: Carotinoide (*Abb. 2* bis *Abb. 5*) sind eine Klasse von Kohlenwasserstoffen (Carotine) und deren oxygenierte Derivate (Xanthophylle), die aus acht Isopreneinheiten bestehen. Die Anordnung der Isopreneinheiten ist an der zentralen Doppelbindung invertiert (Schwanz-Schwanz-Verknüpfung), so dass die zentralen Methylgruppen in einer 1,6-Verknüpfung zueinander stehen und die restlichen Methylgruppen in einer 1,5-Verknüpfung. Die terminalen Isopreneinheiten (Endgruppen) können nun wie folgt aussehen: Acyclisch (ψ -Endgruppe), zum Cyclohexen zyklisiert (β - bzw. ϵ -Endgruppe: Doppelbindung in 5,6- bzw. 4,5-Position), zum Methylencyclohexan (γ -Endgruppe, exocyclische Doppelbindung in 5,18-Position), Cyclopentan (κ -Endgruppe) oder aromatisch (ϕ - bzw. χ -Endgruppe, Methylgruppen in 1,2,5-bzw. 1,2,3-Stellung)^[10].

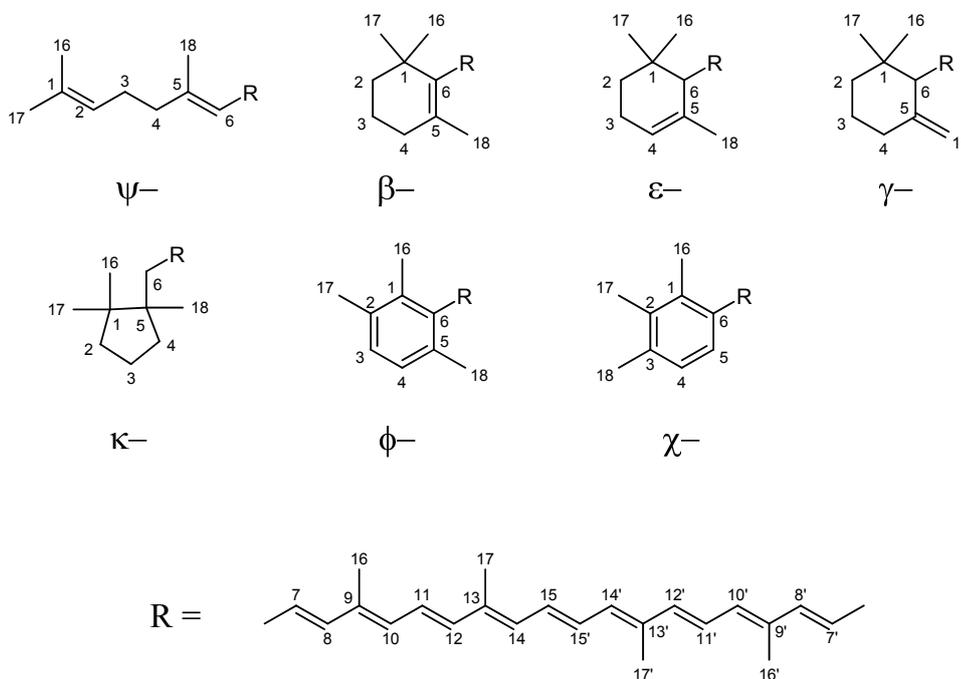


Abb. 1: Endgruppenbezeichnung der Carotinoide und Mittelbaustein **R**

Der wohl bekannteste Vertreter der Carotine ist das β -Carotin (**Abb. 2**), mit dem systematischen Namen β,β -Carotin, welches die Vorstufe (Provitamin) für das beim Sehvorgang notwendige Vitamin A (Retinol, 15-Apo- β -Carotin-15-ol, **Abb. 3**) darstellt.

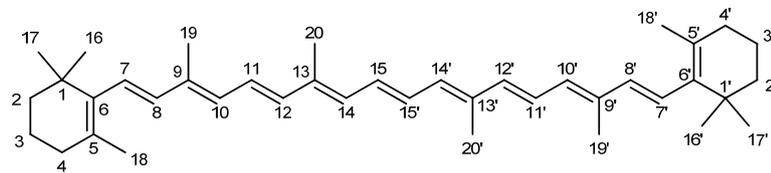


Abb. 2: Struktur des β -Carotin, dem wohl bekanntesten Vertreter und Namensgeber der Carotinoide, Nummerierung der Kohlenstoffatome nach der IUPAC-Carotinoid-Nomenklatur^[10]

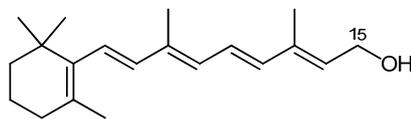


Abb. 3: Vitamin A (Retinol, 15-Apo- β -Carotin-15-ol, verkürzte Carotinoide bekommen das Präfix Apo- mit vorangestelltem Lokanten des letzten vorhanden Kohlenstoffatoms^[10])

Einer der häufigsten Vertreter der Xanthophylle im Tierreich ist das Astaxanthin (**Abb. 4**). Die Färbung von Lachs, Goldfischen und gekochtem Hummer sind dem Astaxanthin zu verdanken. Die blaue Farbe im lebenden Hummer resultiert aus der Bindung des Astaxanthin an Proteine, welche durch das Kochen gespalten werden.

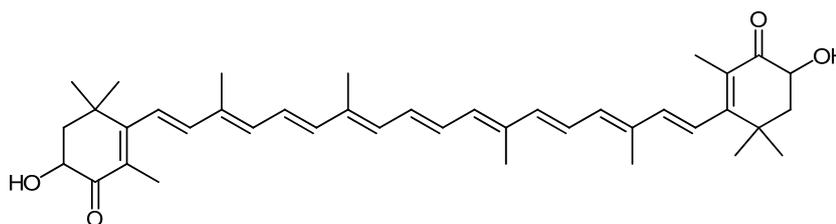


Abb. 4: Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β,β -carotin-4,4'-dion), ein oxygeniertes Carotinoid (Xanthophyll)

Von besonderem Interesse im Bereich der Naturstoffe sind auch die aromatischen Carotinoide, insbesondere die aromatischen Xanthophylle, da sie eine Art natürlicher Hybride aus Carotinoiden und Polyphenolen darstellen, wie z.B. das Dihydroxyisorenieratin^[11-13] (**Abb. 5**).

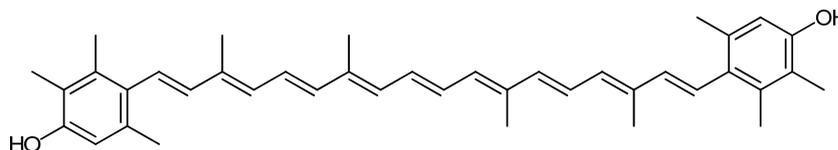


Abb. 5: 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (3,3'-Dihydroxy- ϕ , ϕ -Carotin, DHIR)

In der Gruppe der Carotinoide sind phenolische Strukturen die Ausnahme, wobei diese Strukturen für die Substanzklasse der Flavonoide typisch sind:

Flavonoide bestehen aus einem Chroman-Grundgerüst (**Abb. 6**), welches in der 2-Position mit einem Phenylring verbunden ist. Die Ausnahme bilden hier die Isoflavone, mit einer Verknüpfung zum Phenylring in 3-Position. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome ergibt sich aus der von der IUPAC empfohlenen Nomenklatur für Flavonoide^[14].

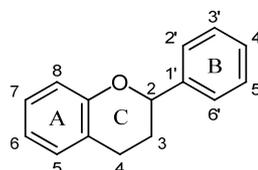


Abb. 6: Struktur des Flavan-Grundgerüstes mit der Nummerierung der Kohlenstoffatome nach der IUPAC-Flavonoid-Nomenklatur und den als A-, B- und C-Ring benannten Ringen^[14,15]

Die Verbindungsklassen der Flavonoide unterscheiden sich durch die Modifikationen im C-Ring (**Abb. 7**): Flavanole (A), Flavanonole (B), Flavonole (C), Flavanone (D), Flavone (E), Anthocyanidine (F) und Isoflavone (G).

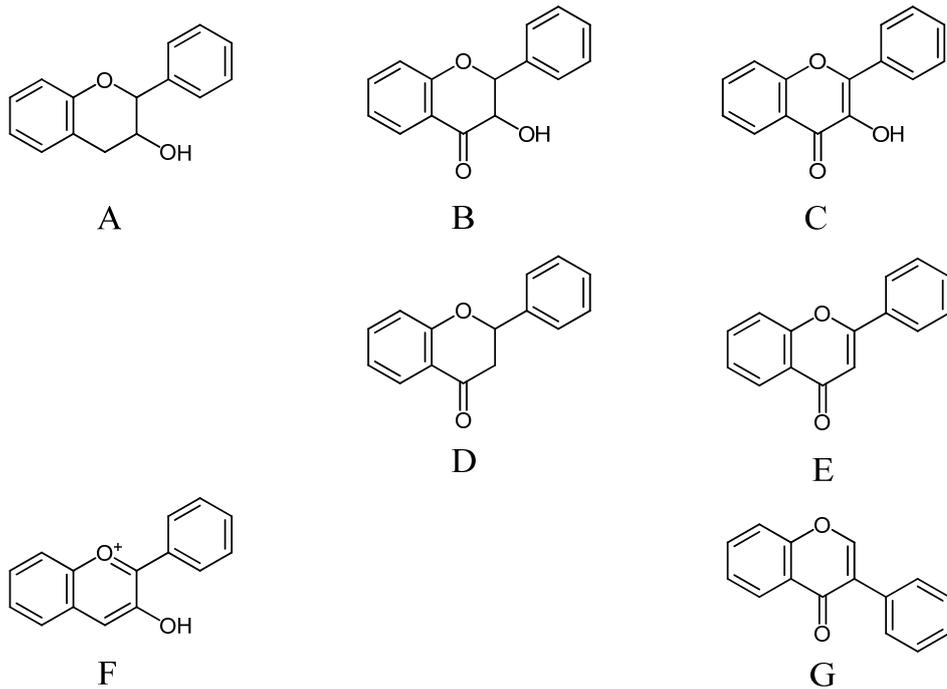


Abb. 7: Verbindungsklassen der Flavonoide: Flavanole (A), Flavanonole (B), Flavonole (C), Flavanone (D), Flavone (E), Anthocyanidine (F) und Isoflavone (G)

Flavonoide können im A- und B-Ring unterschiedlich stark hydroxyliert vorliegen, wie z.B. das (2R,3R)-(-)-Epicatechin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanol) mit fünf Hydroxygruppen und das Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) mit drei Hydroxyfunktionen (**Abb. 8**).

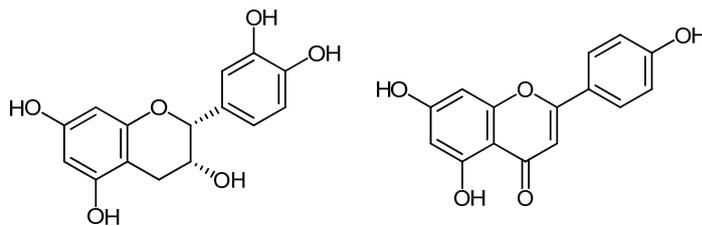


Abb. 8: Zwei Vertreter natürlich vorkommender Flavonoide, Epicatechin (links) und Apigenin

Carotinoide und Flavonoide haben in der Natur ein umfassendes Wirkungsspektrum, im Folgenden soll aber der Fokus auf dem antioxidativen Potential der Verbindungen liegen.

Viele der an den nichtenzymatischen antioxidativen Prozessen beteiligten Substanzen wie die Carotinoide und Flavonoide (wie auch Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E (α -Tocopherol) können nicht vom menschlichen Körper selbst synthetisiert werden. Aus diesem Grund müssen sie mit der Nahrung dem Körper zugefügt werden.

In Langzeitstudien mit Nahrungsmitteln, die einen hohen Flavonoid- oder Carotinoidgehalt aufweisen, konnte gezeigt werden, dass Flavonoide und Carotinoide zu einer endogenen Photoprotektion durch nichtenzymatische antioxidative Mechanismen beitragen können: Es konnte jeweils nach dreimonatiger Aufnahme eine deutliche Verringerung in der Empfindlichkeit der Probanden gegenüber UV-induziertem Erythem (Sonnenbrand) festgestellt werden. Der so erreichte Sonnenschutz ist permanent vorhanden, auf alle Körperregionen verteilt und entspricht ungefähr dem Lichtschutzfaktor 3. Es wird vermutet, dass diese Antioxidantien zu einem dauerhaften Schutz gegenüber schädlicher UV-Strahlung beitragen können^[1,16-19].

1.3 Antioxidative Wirkmechanismen

Lebende Organismen haben eine Vielzahl an Verteidigungsmechanismen entwickelt, um sich vor freien Radikalen und ROS zu schützen. Diese Verteidigung beinhaltet (i) präventive, (ii) reparierende, (iii) physikalische und (iv) antioxidative Schutzmechanismen. Die antioxidativen Mechanismen werden weiterhin in enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Wirkmechanismen unterteilt^[20].

Die unterschiedlichen Mechanismen, mit denen Carotinoide und Flavonoide reaktive Sauerstoffspezies (**Tab. 1**) und triplettangeregte Sensibilisatoren desaktivieren können, unterscheiden sich deutlich und werden im Folgenden näher erläutert.

Tab. 1: Übersicht über die verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Spezies	Bezeichnung	Beschreibung
RO \cdot	Alkoxyradikal	Reaktive freie Sauerstoffradikale
ROO \cdot	Peroxyradikal	
O $_2^{\cdot-}$	Hyperoxidanion	
HO \cdot	Hydroxyradikal	
HOO \cdot	Hydroperoxidradikal	
ROOH	Hydroperoxid	Stabilere molekulare Oxidantien
O $_3$	Ozon	
H $_2$ O $_2$	Wasserstoffperoxid	
1 O $_2$	Singulett-Sauerstoff	Angeregtes Sauerstoffmolekül

Carotinoide können schon bevor ROS gebildet werden ihre Schutzwirkung entfalten. ROS werden unter anderem dadurch gebildet, dass ein Sensibilisatormolekül nach elektronischer Anregung durch elektromagnetische Strahlung passender Wellenlänge durch Intersystem Crossing (ISC) in den Triplettzustand (3 SENS) übergeht. Dieser triplettangeregte Sensibilisator kann nun entweder direkt (Typ 1-Photooxidation) reaktive Sauerstoffradikale erzeugen (durch Wasserstoff- oder Elektronentransfer), oder indirekt über die Generierung von Singulett-Sauerstoff (1 O $_2$, Typ 2-Photooxidation) mit der nachfolgenden Bildung weiterer Sauerstoffradikale^[21]. An diesem Punkt, vor der Bildung des 1 O $_2$ bzw. der reaktiven Sauerstoffradikale, kann die Triplettenergie des

Sensibilisators durch Energietransfer von einem $^1\text{Carotinoid}$ (Carotinoid im Singulett-Zustand) übernommen werden. Der Sensibilisator fällt dabei zurück in den Singulett-Grundzustand ($^1\text{SENS}$) und das Carotinoid ändert seine Multiplizität in den energetisch niedrig liegenden Triplett-Zustand ($^3\text{Carotinoid}$). Die überschüssige Energie des $^3\text{Carotinoids}$ kann nun durch strahlungslose Relaxation in Form von Wärme abgegeben werden.

Einmal bei der Typ 2-Photooxidation gebildeter Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) kann ebenso durch Carotinoide mittels Energietransfer gelöscht werden, wobei das Carotinoid wieder in den Triplettzustand übergeht und der Singulett-Sauerstoff seine Multiplizität zum energieärmeren Triplett ($^3\text{O}_2$) ändert.

Phenolische Carotinoide und vor allem Flavonoide und andere Polyphenole löschen Singulett-Sauerstoff auf eine andere Art und Weise^[22]: Nach diffusionskontrollierter Bildung eines Exciplex (ein nur im angeregten Zustand stabiler Begegnungskomplex) wird durch partielle Ladungsverschiebung (Charge-Transfer-Komplex) von einem elektronenreichen Phenol zum $^1\text{O}_2$ (welcher dadurch partiellen Diradikalcharakter erhält) das Intersystem Crossing vom $^1\text{O}_2$ zum $^3\text{O}_2$ erleichtert. Das Phenol geht dabei unverändert aus der Reaktion hervor. Diese Art der Desaktivierung von $^1\text{O}_2$ durch Phenole wird Charge-Transfer-Löschung genannt (**Abb. 9**).

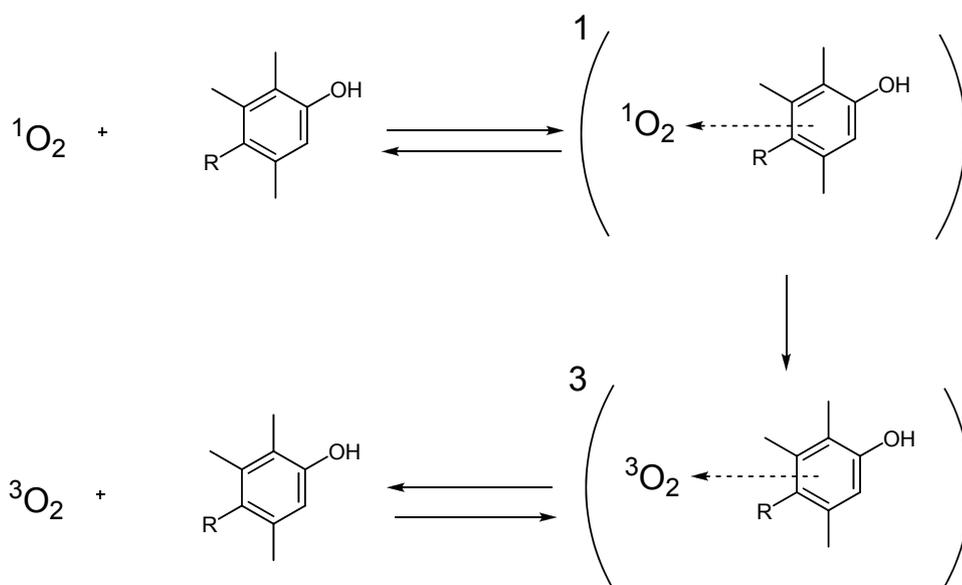


Abb. 9: Charge-Transfer-Löschung von $^1\text{O}_2$ durch ein elektronenreiches Phenol (ϕ -Endgruppe des DHIR)

Außer den physikalischen Lösprozessen mittels Ladungs- bzw. Energietransfer, können Carotinoide und Flavonoide auch chemisch ROS desaktivieren:

Carotinoide können in einer (2+2)- oder (4+2)-Cycloaddition mit Singulett-Sauerstoff zu Endoperoxiden reagieren (**Abb. 10** und **Abb. 11**), welche dann durch weitere Reaktionen zu oxygenierten Apocarotinoiden oder hydroxylierten Carotinoiden zerfallen^[23,24].

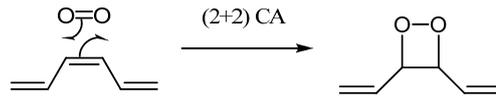


Abb. 10: (2+2)-Cycloaddition von 1O_2 an das Polyensystem eines Carotinoids

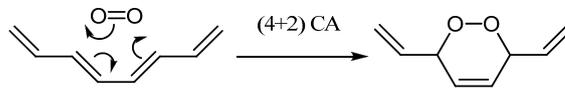


Abb. 11: (4+2)-Cycloaddition von 1O_2 an das Polyensystem eines Carotinoids

Des Weiteren kann der Singulett-Sauerstoff mit dem Methylgruppen tragenden Polyensystem in einer Hetero-En-Reaktion desaktiviert werden (**Abb. 12**)^[24].



Abb. 12: Hetero-En-Reaktion von 1O_2 mit dem Polyensystem eines Carotinoids

Für die Desaktivierung von Radikalen (physiologisch bedeutsam sind vor allem sauerstofftragende Radikale, siehe **Tab. 1**) durch das Polyensystem der Carotinoide gibt es drei mögliche Mechanismen. Durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms oder die Addition eines Radikals an das Polyensystem des Carotinoids entsteht ein stabilisiertes Carotinoidradikal, durch Elektronentransfer vom Carotinoid zum Radikal bildet sich ein mesomeriestabilisiertes Carotinoidradikalkation (**Abb. 13**)^[25].

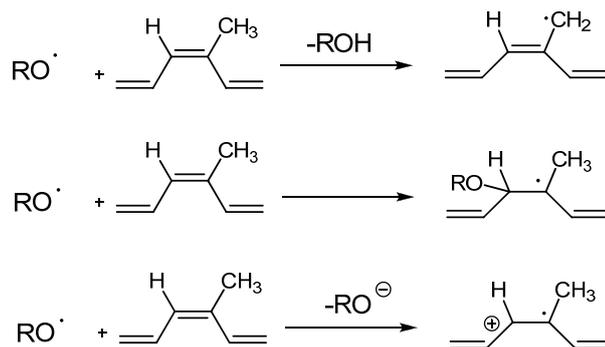


Abb. 13: Wasserstoffabstraktion (oben), Addition an das Polyensystem (Mitte) und Elektronentransfer

Da Flavonoide in der Regel mehrere aromatische Hydroxygruppen tragen, können sie sehr schnell (annähernd diffusionskontrolliert^[26]), unter Ausbildung stabilerer Phenoxyradikale, freie Sauerstoffradikale (z.B. RO^\cdot) desaktivieren (**Abb. 14**).



Abb. 14: Reaktion eines Phenols mit einem Radikal (RO^\cdot) unter Bildung eines Phenoxy-Radikals

1.4 Problemstellung

Carotenylflavonoide sind eine neue Klasse synthetischer Antioxidantien, naturstoffverwandte Hybride aus Carotinoiden und Flavonoiden.

Aus Überlegungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR) für diese neuartige Substanzklasse war durch die Vielzahl von Desaktivierungskanälen von reaktiven Sauerstoffspezies ein hohes antioxidatives Potential zu erwarten (**Abb. 15**).

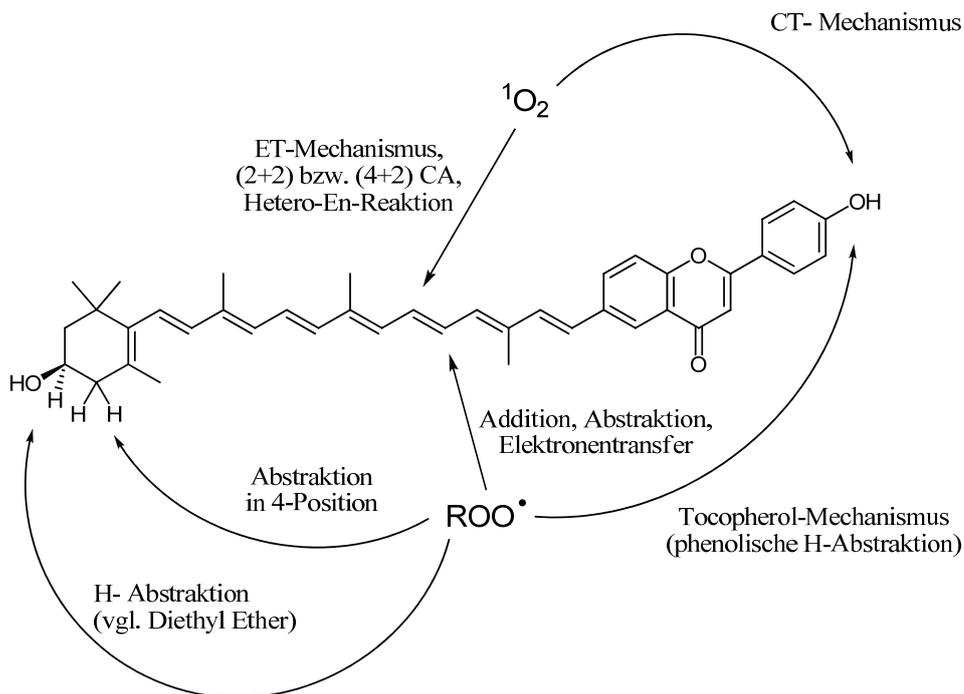


Abb. 15: Mögliche Desaktivierungskanäle eines Carotenylflavonoids

In einem einfachen System (Cumolhydroperoxid-Assay), in dem die Löschung von Peroxyradikalen durch verschiedene Antioxidantien untersucht worden ist, konnte diese Erwartung bestätigt werden. Die Carotenylflavonoide waren ihren strukturverwandten natürlichen Derivaten bei weitem überlegen^[27].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Resultate aus diesem einfachen System auf ein komplexes System wie menschliche Hautzellen in Kultur übertragen werden können.

Dazu sollten naturstoffverwandte Hybridmoleküle aus Carotinoiden und Flavonoiden (Carotenylflavonoide) synthetisiert und vollständig spektroskopisch charakterisiert werden.

An humanen dermalen (Haut-) Fibroblasten sollte ihre Toxizität, ihre Toxizität nach UVA-Exposition und deren photoprotektiven Eigenschaften auf molekularer Ebene im Gesamtsystem untersucht werden.

Darüber hinaus mussten für ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen auch die Subchromophore der Carotenylflavonoide synthetisch dargestellt und deren Schutzpotential in Kultur humaner Hautzellen eruiert werden.

2 Hauptteil

2.1 Überblick

In dieser Arbeit sollten geeignete Methoden gefunden werden, um die Zielverbindungen (Carotenylflavonoide und Referenzverbindungen) in ausreichender Menge (100 - 200 mg) und hoher Reinheit herzustellen. Die Identität und die Reinheit der Verbindungen sollte durch vollständige spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Dafür wurde eine Vielzahl an Methoden verwendet. Ein- und mehrdimensionale Kernresonanzspektroskopie (NMR), Massenspektrometrie, Absorptionsspektroskopie von ultraviolettem und sichtbarem Licht (UV-VIS), Absorptionsspektroskopie von Infrarotstrahlung (IR-Spektroskopie), Bestimmung von Schmelz- bzw. Siedepunkten. Ergänzend wurden nicht literaturbekannte Substanzen durch Elementaranalysen (Verbrennungsanalysen) oder Massenfeybestimmungen (hochaufgelöste Massenspektrometrie) untersucht.

Die so dargestellten und charakterisierten Verbindungen sollten anschließend durch vielfältige Untersuchungen in einer Kultur menschlicher Hautzellen auf ihre photoprotektiven Eigenschaften untersucht werden. Dafür mussten menschliche Hautzellen unter sterilen Bedingungen in einem Nährmedium und unter einer genau definierten Atmosphäre kultiviert werden. Für die Experimente in Zellkultur (insbesondere bei der Untersuchung der Induktion der Hämoxygenase-1, HMOX-1) war, durch den sehr hohen Arbeits- und Zeitaufwand für eine statistisch aussagekräftige Anzahl an Versuchen, eine gut überlegte Auswahl der zu verwendenden Substanzen vorzunehmen. Allem voran wurden Untersuchungen zur generellen Toxizität der Verbindungen angestellt. Weitergehend wurde die Toxizität der Substanzen nach UVA-Einwirkung überprüft. Schließlich wurde die UV-induzierte Induktion der Biosynthese der Hämoxygenase-1 auf molekularer Ebene mit Hilfe einer Vielzahl biochemischer Methoden, wie dem Zellaufschluss (chemisch und mechanisch), Proteinbestimmung nach Bradford, elektrophoretischer Auftrennung der Zellproteine (SDS-PAGE), Proteintransfer auf eine geeignete Membran (Western-Blot) und immunologischen Nachweismethoden für das zu untersuchende Protein (HMOX-1) und ein konstitutiv synthetisiertes Protein (GAPDH) als Ladekontrolle, untersucht.

2.2 Syntheseplanung

Ziel der synthetischen Arbeiten war es, kovalent verknüpfte Hybridmoleküle aus Carotinoiden und Flavonoiden darzustellen. Hierbei sollte nach Möglichkeit das konjugierte Doppelbindungssystem der Carotinoidbausteine ausgeweitet werden. Durch die Struktur der von der BASF zur Verfügung gestellten Carotinoidvorläufer (Aldehyde und Phosphoniumsalze) bot sich die häufig in der Carotinoidchemie zur Knüpfung von Doppelbindungen verwendete Wittig- bzw. Horner-Emmons-Reaktion an. Dabei werden entweder Phosphorylide (Wittig) bzw. phosphoryl-stabilisierte Carbanionen (Horner-Emmons), welche durch Basenzugabe in situ aus C α -ständig Wasserstoff tragenden Phosphoniumsalzen bzw. Phosphonaten generiert werden, mit Carbonylgruppen zur Reaktion gebracht ^[28]. Als funktionelle Gruppe mussten daher auf der Seite der Flavonoidbausteine Arylaldehyde oder benzylständige Phosphoniumsalze bzw. Phosphonate eingeführt werden. Alle drei Gruppen sind in einer Stufe aus den entsprechenden Benzylbromiden darstellbar. Die Benzylbromide können durch radikalische Bromierung mit NBS (*N*-Bromsuccinimid) und AIBN (2,2'-Azo-bis(isobutyronitril)) aus den Tolylderivaten der Flavonoide gewonnen werden. Die Flavonoide wurden entweder durch die klassische oder eine modifizierte Baker-Venkataraman-Syntheseroute dargestellt ^[29,30].

2.3 Synthesen

2.3.1 Carotinoidbausteine (BASF1, BASF2, X21)

Die Carotinoidbausteine **BASF1** (C₁₅-P-Salz, *Abb. 16*) und **BASF2** (C₂₅-Aldehyd, *Abb. 17*) wurden von der BASF SE in Ludwigshafen zur Verfügung gestellt und konnten direkt (**BASF1**) bzw. nach einmaliger säulenchromatographischer Aufreinigung mit Dichlormethan an Kieselgel (**BASF2**) für die Kupplungsreaktionen V9 (**X30**), V16 (**X46**) und V20 (**X73**) eingesetzt werden.

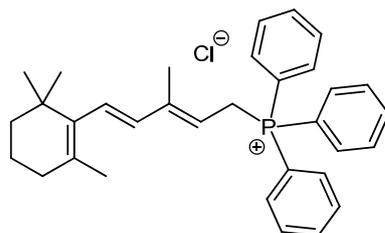


Abb. 16: 12-Apo-(R)-zeaxanthinyl-12-phosphonium-chlorid (C_{15} -P-Salz, BASF1)

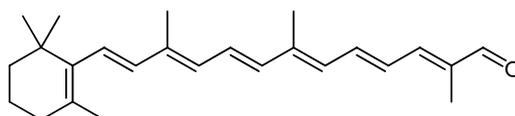


Abb. 17: 12'-Apo- β -carotin-12'-al (C_{25} -Aldehyd, BASF2)

Carotinoidbaustein **X21** konnte in Anlehnung an Haugan und Liaaen-Jensen^[31] in einer zweistufigen Synthese aus dem Aldehyd **BASF2** durch Reduktion mit Natriumborhydrid in Ethanol zum entsprechenden Alkohol (**X6**) mit subsequenter Umwandlung mittels Triphenylphosphinhydrobromid in Methanol zum Phosphoniumsalz (**X21**) in sehr guten bzw. mäßigen Ausbeuten gewonnen werden.

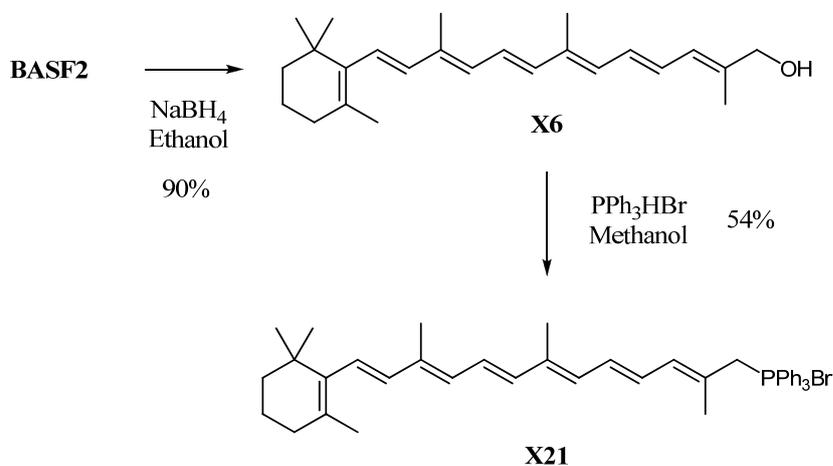


Abb. 18: 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (**X6**) und 12'-Apo- β -carotinyl-12'-triphenylphosphonium-bromid (**X21**)

Der Alkohol (**X6**) ist einige Stunden an der Luft stabil und es konnten alle Protonen- und Kohlenstoffsignale durch ein- und mehrdimensionale NMR-Methoden (^1H , ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$, $^{135}\text{DEPT}$, HMQC) zugeordnet werden (Abb. 19 - Abb. 21, Tab. 2).

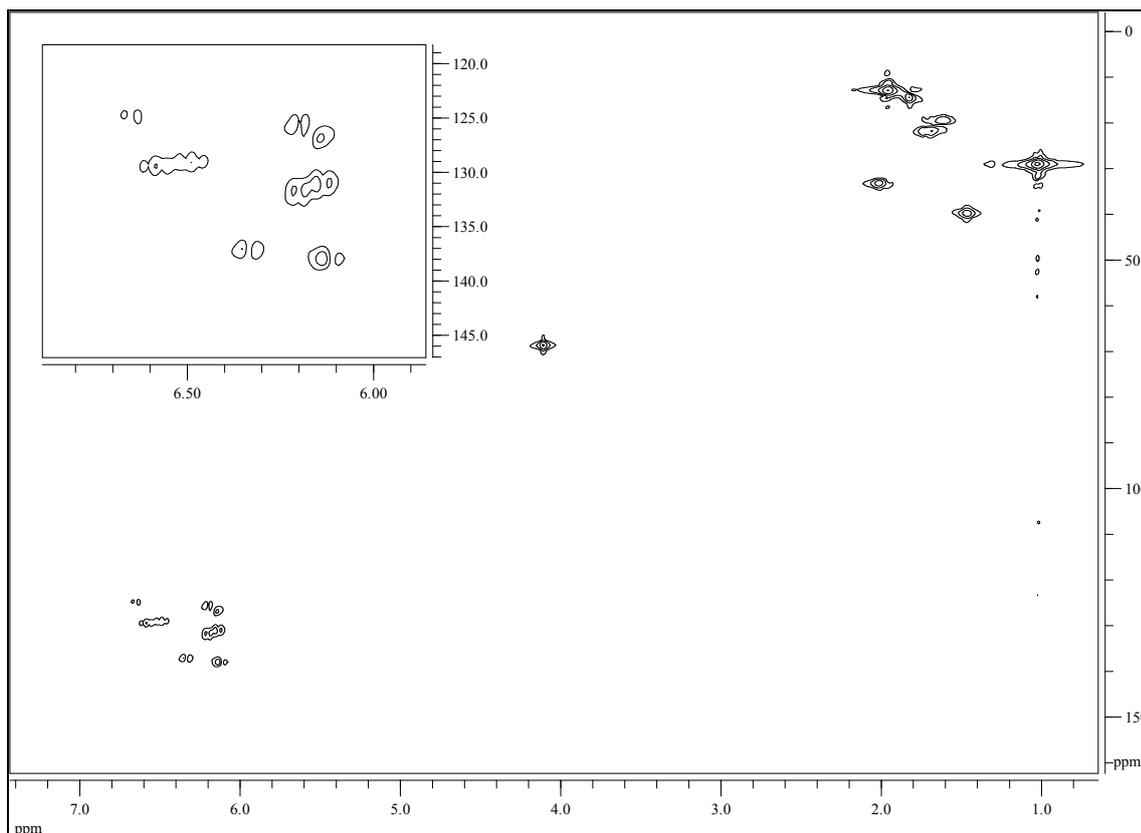


Abb. 19: HMQC (CDCl₃) von X6, ¹H (500 MHz) horizontal, ¹³C (125 MHz) vertikal, T = 296 K

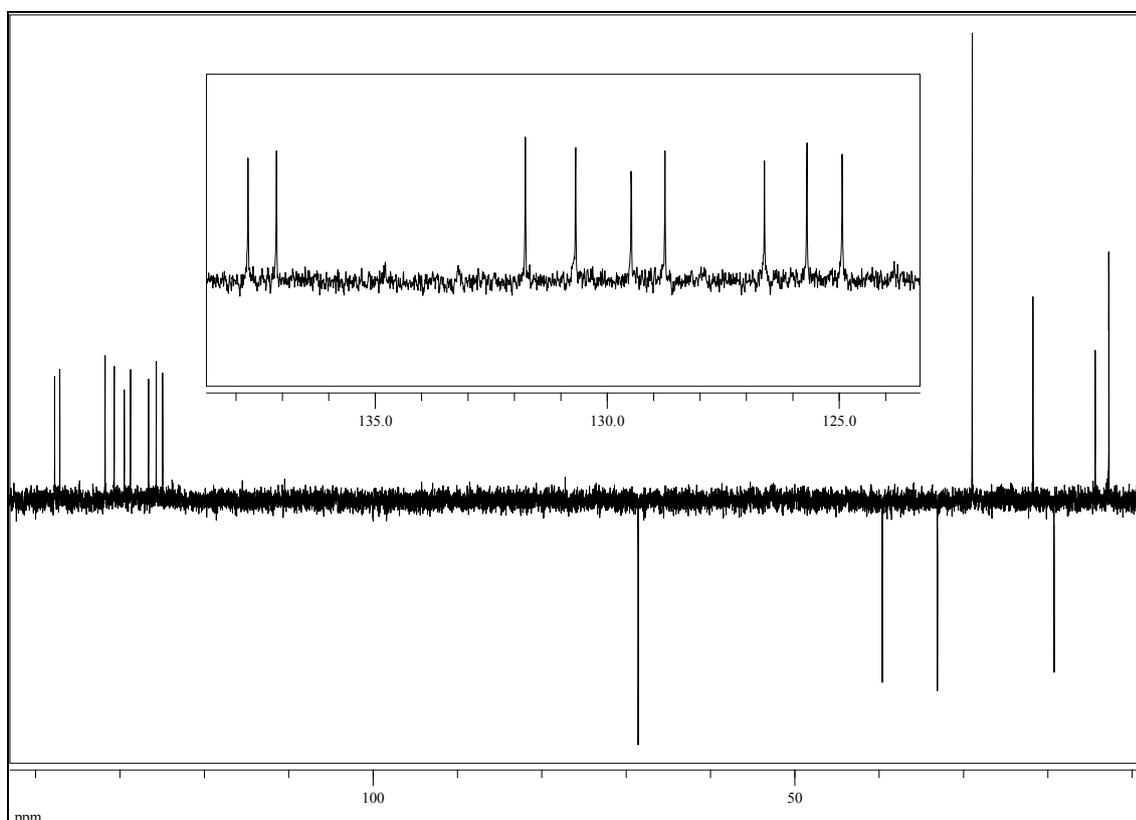


Abb. 20: ¹³⁵DEPT (CDCl₃) von X6, 500 MHz, T = 296 K

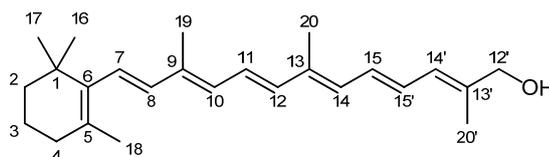


Abb. 21: Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale von X6

Tab. 2: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{500}$ und $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{125}$ -Signale für X6

$\delta_{\text{H}} / \text{ppm}$	Mult.	Int. ^1H	$J_{\text{HH}} / \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	Zuordnung
1.03	s	6		28.96	16 & 17 CH_3
1.44-1.49	m	2		39.62	2 CH_2
1.57-1.65	m	2		19.26	3 CH_2
1.71	s	3		21.76	18 CH_3
1.83	s	3		14.37	20' CH_3
1.95	s	3		12.77	19 CH_3
1.97	s	3		12.75	20 CH_3
2.02	m	2		33.09	4 CH_2
4.11	s	2		68.56	12' CH_2
6.12	d	1	16.0	137.74	8 CH
6.14	d	1	11.0	130.68	14' CH
6.18	d	1	16.0	126.61	7 CH
6.20	d	1	11.4	125.69	10 CH
6.20	d	1	11.4	131.76	14 CH
6.34	d	1	15.0	137.13	12 CH
6.49	dd	1	11.0, 14.4	128.76	15' CH
6.59	dd	1	11.4, 14.4	129.48	15 CH
6.64	dd	1	11.4, 15.0	124.94	11 CH
				34.26	1 C
				129.33	5 C
				135.94	13' C
				136.20	9 C
				137.67	13 C
				137.89	6 C

Abweichend von der Methode von Haugan und Liaaen-Jensen^[31] wurde das C₂₅-P-Salz zur Aufreinigung nicht unkristallisiert, sondern in der gerade notwendigen Menge Dichlormethan gelöst und in einen großen Überschuss Diethylether eingetropf, wodurch **X21** sauber ausfällt. Trotz der Handhabung der Verbindung unter Argon und -80 °C sind im MALDI-Massenspektrum außer dem Molekülpeak noch Signale mit einem Molekulargewicht von **X21** plus ein Vielfaches der Masse eines Sauerstoffatoms zu erkennen wobei die Signalintensität mit steigender Anzahl an Sauerstoffatomen abnimmt. Die Verbindung scheint in kürzester Zeit mit dem Luftsauerstoff zu reagieren. Aus diesem Grund wurden die NMR-Spektren sofort nach dem Ausfällen in Ether aufgenommen, wodurch in den Spektren ein relativ hoher Lösemittelanteil zu sehen ist. Für ¹³C-Methoden war in keinem deuteriertem Standardlösemittel eine ausreichende Löslichkeit vorhanden um olefinische und quartäre Kohlenstoffsignale zu finden. Im ³¹P-¹H-NMR-Spektrum ist nur ein Signal, im erwarteten Bereich für Triphenylphosphoniumsalze, bei 20.80 ppm zu erkennen. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[31] überein und konnten vervollständigt werden.

2.3.2 Flavonoidbaustein 1 (**X26**)

Das 4'-Formylflavon (**X26**) konnte in einer fünfstufigen Synthese in guten bis sehr guten Ausbeuten realisiert werden. Für die Synthese des 4'-Methylflavon (**X24**) wurde die klassische Baker-Venkataraman-Route eingeschlagen^[32,33]. Hierbei wird ein Säurechlorid mit einem 2'-Hydroxyacetophenon in Pyridin verestert und anschließend unter stärker basischen Bedingungen (heißes pulverisiertes Kaliumhydroxid) zum Diketon umgelagert. Unter wasserentziehenden Bedingungen (konzentrierte Schwefelsäure in Eisessig) wird das Diketon schließlich zum Flavon zyklisiert (**Abb. 22**).

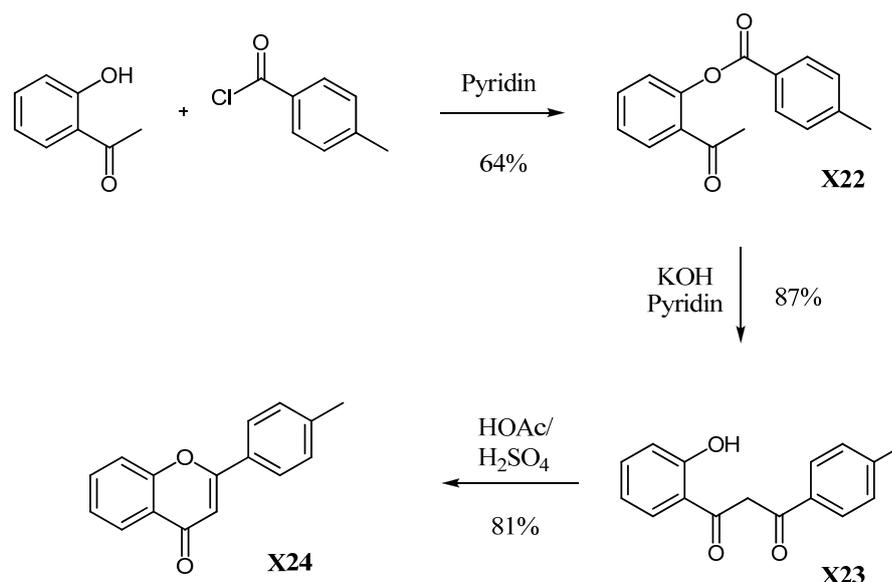


Abb. 22: Synthese von **X24** über die Baker-Venkataraman-Route

Das 4'-Methylflavon wird mit *N*-Bromsuccinimid und AIBN in Tetrachlorkohlenstoff radikalisch bromiert. Das 4'-Brommethylflavon (**X25**) wird in guten Ausbeuten erhalten. Das Produkt ist mit einer geringen Menge Succinimid verunreinigt, welches im nachfolgenden Schritt nicht stört und aus diesem Grund nicht abgetrennt wird. Das Brommethylderivat wird anschließend in einer Sommelet-Reaktion in wässriger salz- und essigsaurer Lösung mittels Hexamethylentetraamin (HMTA, Urotropin) zum 4'-Formylflavon oxidiert (**Abb. 23**).

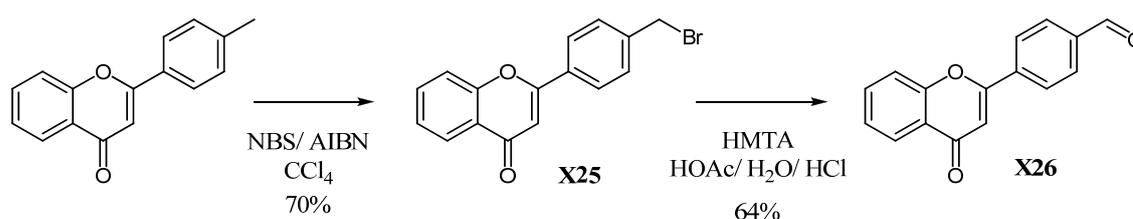


Abb. 23: Synthese des 4'-Formylflavons (**X26**)

Die kernresonanzspektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[34,35] überein und wurden mittels mehrdimensionaler NMR-Techniken überprüft und aktualisiert. Alle weiteren spektroskopischen Daten ^[36,37] wurden bestätigt und vervollständigt.

2.3.3 Kupplungsreaktionen 1 (X27, X30)

Für die Synthese der beiden Carotenylflavonoide **X27** und **X30** wurde eine im Arbeitskreis Martin etabliertes System für die Wittig- bzw. Horner-Emmons-Kupplung von Bausteinen unterschiedlicher Polarität in leicht modifizierter Form verwendet. Als Lösungsmittel hat sich hierbei Pyridin bewährt. Als Base wurde der Feststoff Natriummethanolat in kleinen Portionen zu der Reaktion gegeben, was sich bei der Arbeit unter Schutzgas als unpraktikabel herausstellte. Aus diesem Grund wurde kurz vor der Reaktion eine ethanolische Lithiummethanolatlösung (1 M) hergestellt, welche langsam unter Inertbedingungen zu der Reaktionslösung gegeben werden konnte. Die Carotenylflavonoide **X27** und **X30** konnten in guten Ausbeuten aus dem 4'-Formylflavon (**X26**) und den Phosphoniumsalzen **X21** und **BASF1** dargestellt werden (*Abb. 24*, *Abb. 25*).

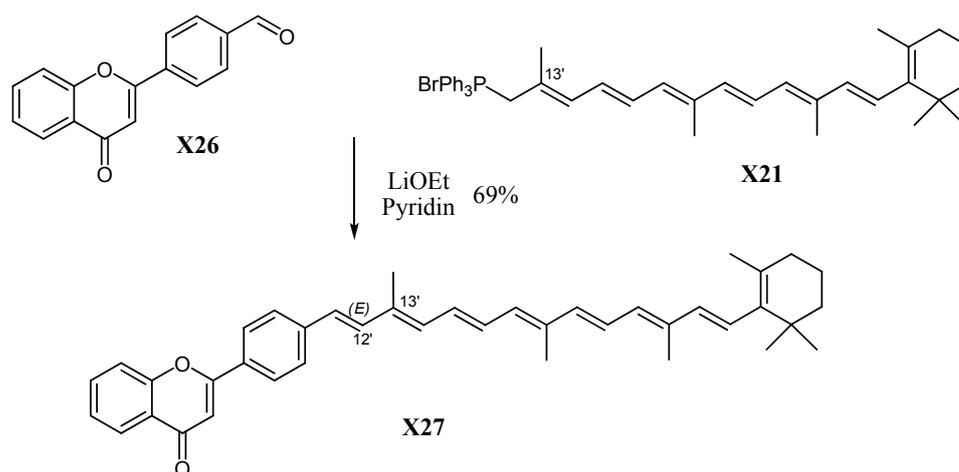


Abb. 24: Wittig-Reaktion von X26 mit dem P-Salz X21 zum 4'-(11'-Apo-β-carotiny)flavon (X27)

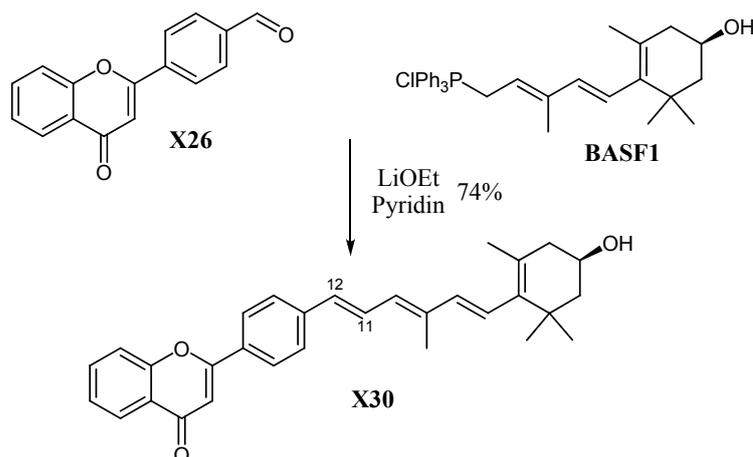


Abb. 25: Wittig-Reaktion von **X26** mit dem P-Salz **BASF1** zum 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthinyl)flavon (**X30**)

Bei Verbindung **X27** wurde überwiegend das *all-trans*-Isomer erhalten, **X30** jedoch wurde als ein Isomergemisch erhalten. Es gab einen kleinen Überschuss der *all-trans*-Verbindung (ca. 3:2), die 11-*cis*-Verbindung (**Abb. 26**) konnte weder säulenchromatographisch abgetrennt, noch thermisch isomerisiert werden. Die eingesetzten Verbindungen **X21** und **BASF1** bilden nach der Deprotonierung semistabile Ylide aus. Semistabile Ylide haben kaum eine Präferenz die Bildung des *cis*- oder *trans*-Isomers zu favorisieren und können auch nicht wie reaktive Ylide (wie z.B. durch den Einsatz von Lithiumbasen) zu einer höheren *trans*-Selektivität getrieben werden^[28]. Durch die Methylgruppe in 13'-Position des C₂₅-Bausteins jedoch ist die Bildung des 12'-*cis*-Isomers von **X27** (**Abb. 27**) aus sterischen Gründen ungünstig. Die Methylgruppe besitzt einen ähnlichen Raumanpruch wie das aromatische Proton in 3'- bzw. 5'-Position am B-Ring des Flavons. Daher wird fast ausschließlich das thermodynamisch deutlich stabilere *all-trans*-Isomer von Verbindung **X27** gebildet, wobei **X30** die erwartete Stereoselektivität von ungefähr 1:1 zeigt. Alle Versuche, **X30** thermisch zu isomerisieren (durch mehrstündiges Erhitzen in hochsiedenden Lösemitteln) schlugen fehl, das Verhältnis der Isomeren zueinander blieb unverändert.

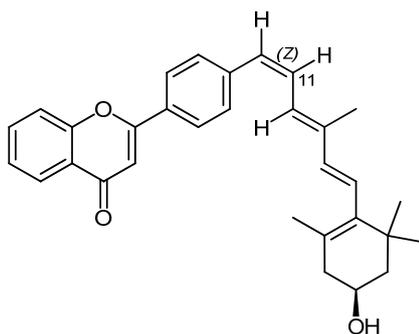


Abb. 26: Das thermodynamisch weniger instabile Isomer **11-cis-X30**

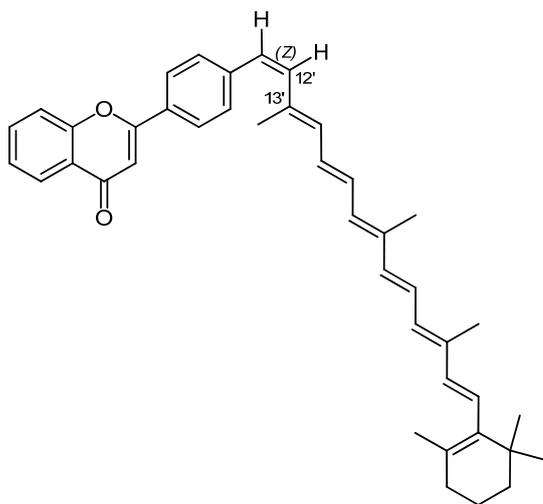


Abb. 27: Das thermodynamisch instabilere Isomer **12'-cis-X27**

Die Protonen- und Kohlenstoffsignale der Verbindung **X27** konnte durch ein- und mehrdimensionale NMR-Techniken (^1H , HH-COSY, $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$, $^{135}\text{DEPT}$, HMQC) eindeutig zugeordnet werden (Abb. 28 - Abb. 31, Tab. 3, Tab. 4).

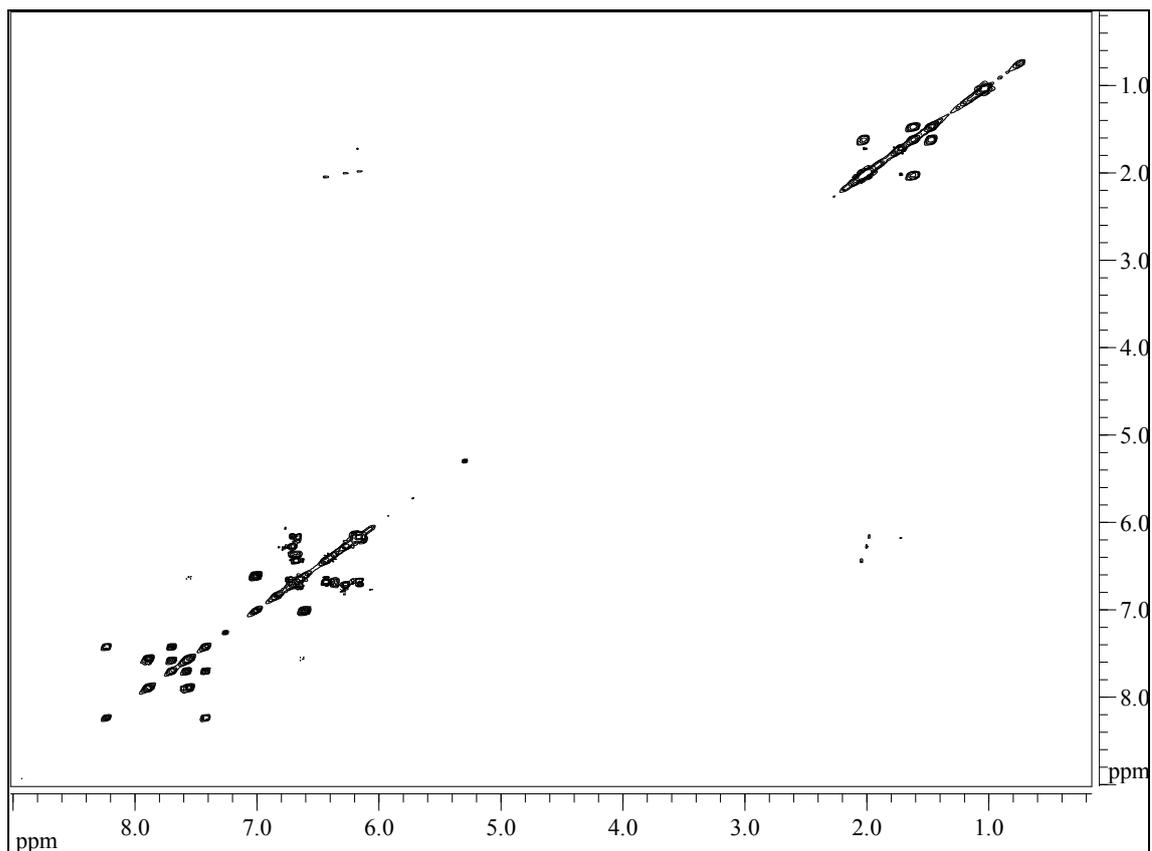


Abb. 28: HH-COSY (CDCl_3) von X27, ^1H (500 MHz) horizontal & vertikal, $T = 296\text{ K}$

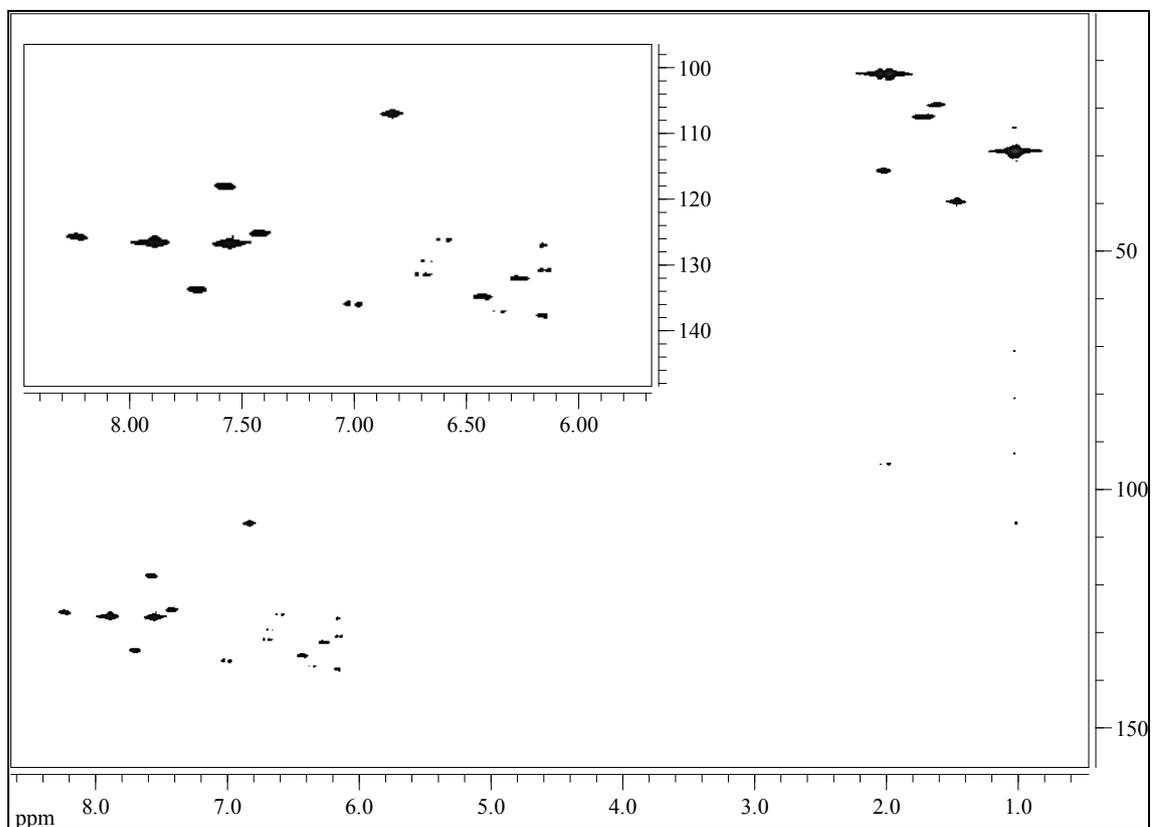


Abb. 29: HMQC (CDCl_3) von X27, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 297\text{ K}$

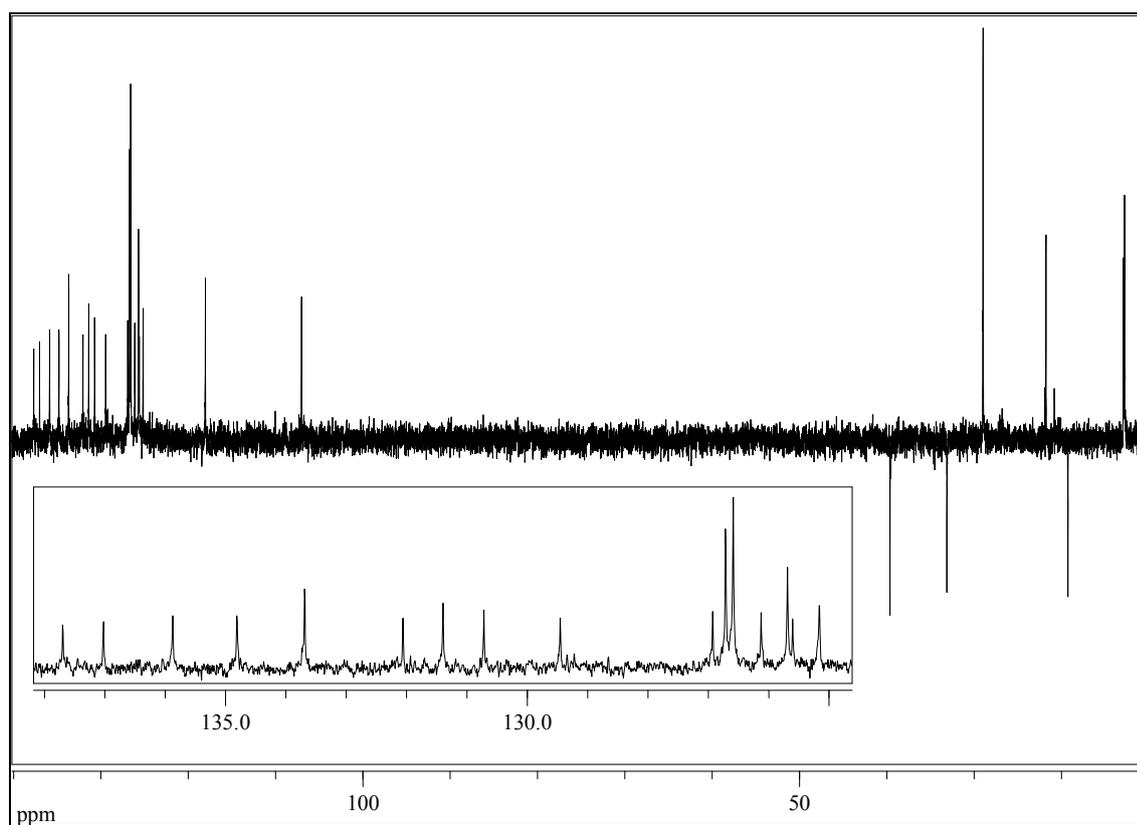


Abb. 30: $^{135}\text{DEPT}$ (CDCl_3) von **X27**, 500 MHz, $T = 296\text{ K}$

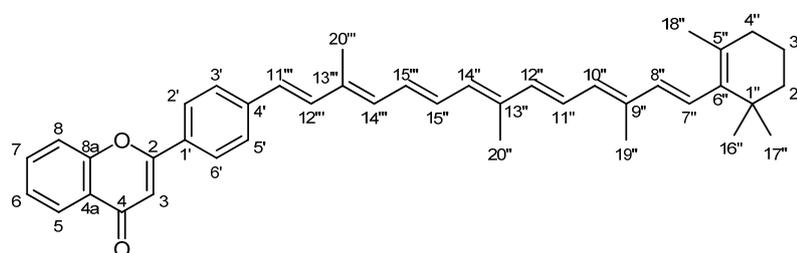


Abb. 31: Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale von 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (**X27**)

Tab. 3: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{500}$ und $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR $_{125}$ -Signale für X27

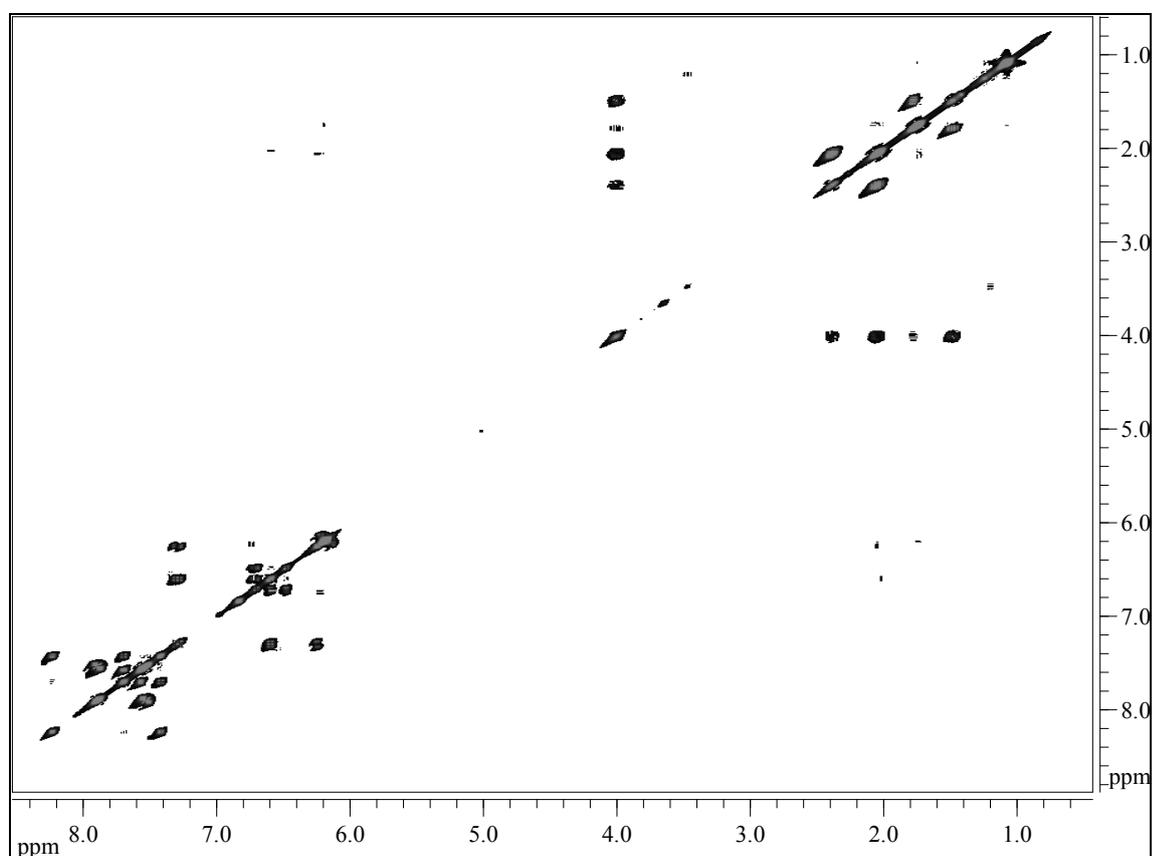
δ_{H} / ppm	Mult.	Int. ^1H	J_{HH} / Hz	δ_{C} / ppm	Int. ^{13}C	Zuordnung
1.03	s	6		28.97	2	16" & 17" CH ₃
1.46 - 1.48	m	2		39.63	1	2" CH ₂
1.59 - 1.66	m	2		19.25	1	3" CH ₂
1.72	s	3		21.77	1	18" CH ₃
1.98 - 2.05	m	2		33.11	1	4" CH ₂
1.98	s	3		12.89	1	19" CH ₃
2.00	s	3		12.89	1	20" CH ₃
2.05	s	3		12.89	1	20" CH ₃
6.14	d	1	16.0	137.70	1	8" CH
6.16	d	1	12.0	130.72	1	10" CH
6.19	d	1	17.3	126.93	1	7" CH
6.27	d	1	10.8	132.06	1	14" CH
6.37	d	1	14.9	137.02	1	12" CH
6.44	d	1	10.8	134.81	1	14" CH
6.61	d	1	15.9	126.13	1	11" CH
6.66	dd	1	14.4, 11.3	129.45	1	15" CH
6.69	dd	1	14.7, 12.0	125.60	1	11" CH
6.73	dd	1	11.2, 14.2	131.40	1	15" CH
6.84	s	1		107.02	1	3 CH
7.01	d	1	15.9	135.87	1	12" CH
7.42	dt	1	7.5, 1.2	125.16	1	6 CH
7.56	m	2	$ N = 8.6$ *	126.71	2	3' & 5' CH
7.57	dd	1	8.8	118.03	1	8 CH
7.70	ddd	1	7.8, 1.6	133.69	1	7 CH
7.89	m	2	$ N = 8.5$	126.59	2	2' & 6' CH
8.24	dd	1	7.9, 1.6	125.69	1	5 CH

* $|N| = |^3J^o + ^5J^p|$ - Kopplung in [AB]₂-Systemen

Tab. 4: Zuordnung der Signale der quartären Kohlenstoffatome von X27

δ_{H} / ppm	Mult.	Int. ^1H	J_{HH} / Hz	δ_{C} / ppm	Int. ^{13}C	Zuordnung
				34.28	1	1" C
				124.02	1	4a C
				129.49	1	5" C
				129.83	1	1' C
				135.30	1	4' C
				136.46	1	13''' C
				137.50	1	9" C
				137.89	1	6" C
				141.29	1	13''' C
				156.22	1	8a C
				163.13	1	2 C
				178.39	1	4 C

Wie für X27 konnten für das Isomerengemisch (*E/Z*)-X30 alle Signale mittels mehrdimensionaler NMR-Methoden aufgeklärt werden. (Abb. 32-Abb. 35, Tab. 5, Tab. 6).

Abb. 32: HH-COSY (CDCl_3) von (*E/Z*)-X30, ^1H (500 MHz) horizontal & vertikal, $T = 296\text{ K}$

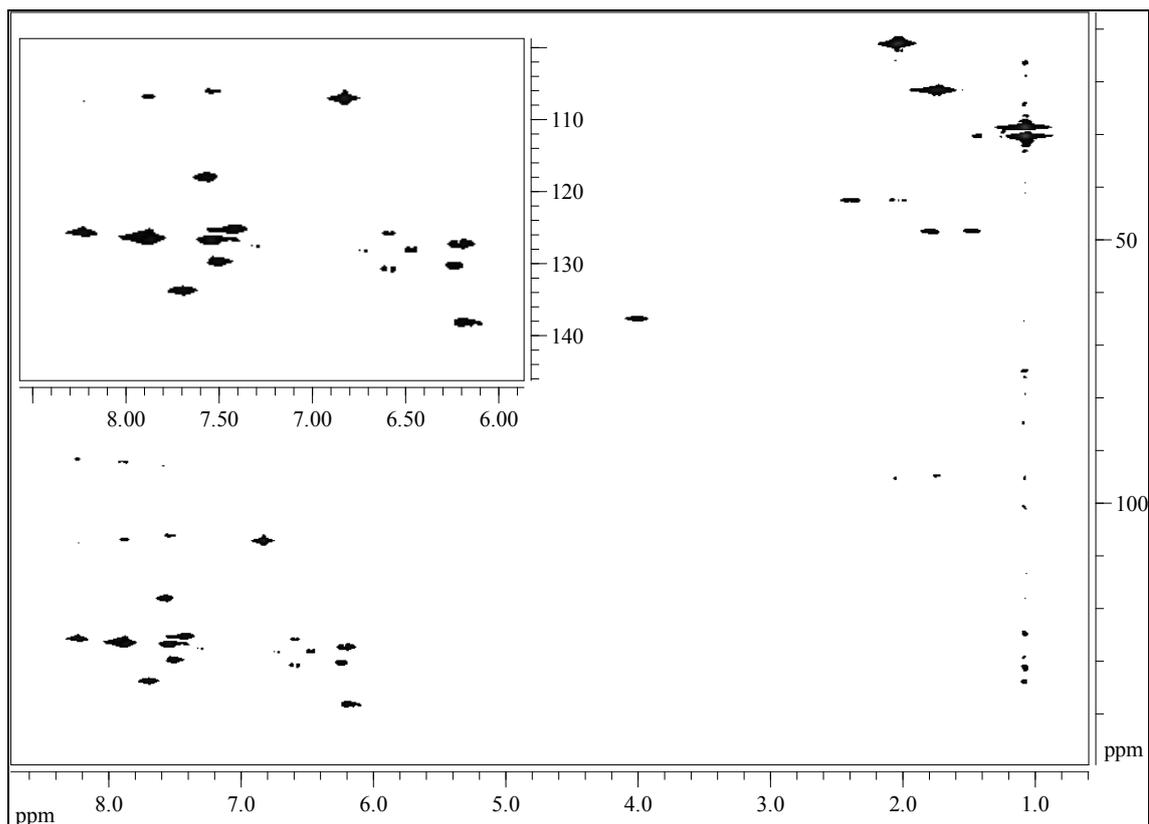


Abb. 33: HMQC (CDCl_3) von (E/Z) -X30, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 296\text{ K}$

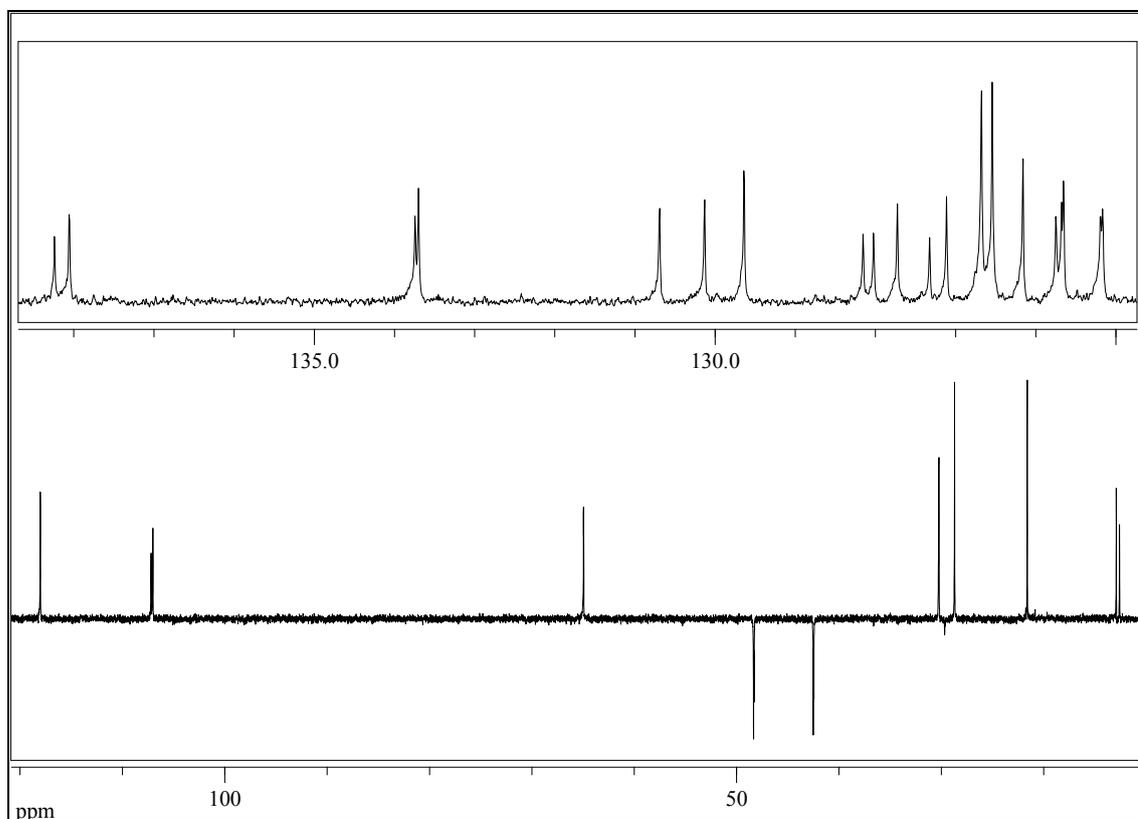


Abb. 34: $^{135}\text{DEPT}$ (CDCl_3) von (E/Z) -X30, 500 MHz, $T = 296\text{ K}$

Tab. 5: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{300}$ und $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{125}$ -Signale für *all-trans (E)*- und *11-cis (Z)*-X30

$\delta_{\text{H}} / \text{ppm}$	Int. ^1H	Mult., $J_{\text{HH}} / \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	Int. ^{13}C	Zuordnung
1.08 (Z), 1.09	6	s, s	28.67, 30.23 (Z)	2	16" & 17" CH ₃
1.43 - 1.52	1	m	48.29 (Z), 48.35	0.5	2" CH ₂ ax.
1.73 (Z), 1.75	3	s, s	21.60	1	18" CH ₃
1.75-1.81	1	m	48.29 (Z), 48.35	0.5	2" CH ₂ eq.
2.02 (Z), 2.06	3	s, s	12.58 (Z), 12.90	1	19" CH ₃
2.00 - 2.12	1	m	42.45 (Z), 42.51	0.5	4" CH ₂ ax.
2.36 - 2.46	1	m	42.45 (Z), 42.51	0.5	4" CH ₂ eq.
3.94 - 4.10	1	m	64.96	1	3" CH
6.14	0.4	d, 16.0	138.24	0.4	8" CH (Z)
6.16	0.6	d, 15.8	138.06	0.6	8" CH (E)
6.22	1	d, 16.0	127.11	1	7" CH
6.25	0.6	d, 11.3	130.13	0.6	10" CH (E)
6.48	0.4	d, 11.5	128.02	0.4	10" CH (Z)
6.59	0.4	d, 12.2	125.75	0.4	12" CH (Z)
6.60	0.6	d, 15.2	130.69	0.6	12" CH (E)
6.73	0.4	dd, 12.2, 11.5	128.15	0.4	11" CH (Z)
6.83, 6.84 (Z)	1	s	107.03, 107.21 (Z)	1	3 CH
7.29	0.6	dd, 15.3, 11.3	127.73	0.6	11" CH (E)
7.42	1	dt, 7.2, 1.8	125.17 (Z), 125.19	1	6 CH
7.51	0.8	m, $ N = 8.3$ *	129.64	0.8	3' & 5' CH (Z)
7.55	1.2	m, $ N = 8.6$	126.68	1.2	3' & 5' CH (E)
7.57	1	m, 8.8	118.02	1	8 CH
7.69	1	m, 7.7, 1.8	133.71, 133.74 (Z)	1	7 CH
7.87	1.2	m, $ N = 8.4$	126.54	1.2	2' & 6' CH (E)
7.91	0.8	m, $ N = 8.3$	126.16	0.8	2' & 6' CH (Z)
8.23	1	m, 7.6	125.65	1	5 CH

* $|N| = \left| {}^3J^o + {}^5J^p \right|$ - Kopplung in $[\text{AB}]_2$ -Systemen

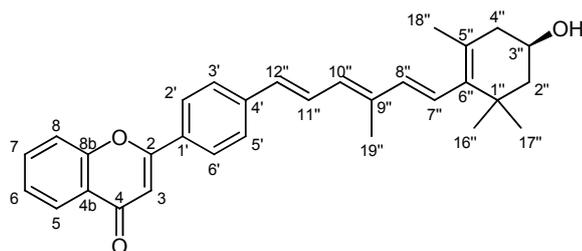


Abb. 35: Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale von **(E/Z)-X30**

Tab. 6: Zuordnung der Signale der quartären Kohlenstoffatome von **all-trans (E)-** und **11-cis (Z)-X30**

$\delta_{\text{H}} / \text{ppm}$	Int. ^1H	Mult., $J_{\text{HH}} / \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	Int. ^{13}C	Zuordnung
			37.08	1	1" C
			123.97	1	4a C
			126.58	0.4	5" C (Z)
			126.64	0.6	5" C (E)
			129.73	0.4	1' C (Z)
			129.96	0.6	1' C (E)
			137.51	0.6	4' C (E)
			137.55	0.4	4' C (Z)
			139.49	1	6" C
			141.27	0.4	9" C (Z)
			141.32	0.6	9" C (E)
			156.18	1	8a C
			163.06	1	2 C
			178.40	1	4 C

2.3.4 Flavonoidbaustein 2 (X45)

Das 4'-Benzoyloxy-6-((diethoxyphosphoryl)methyl)flavon (X45) konnte in einer siebenstufigen Synthese mit einer guten Ausbeute über alle Stufen von 10 % dargestellt werden. Für die Synthese des 4'-Methoxy-6-methylflavon (X41) wurde wie zuvor die klassische Baker-Venkataraman-Route eingeschlagen^[32,33] (Abb. 36).

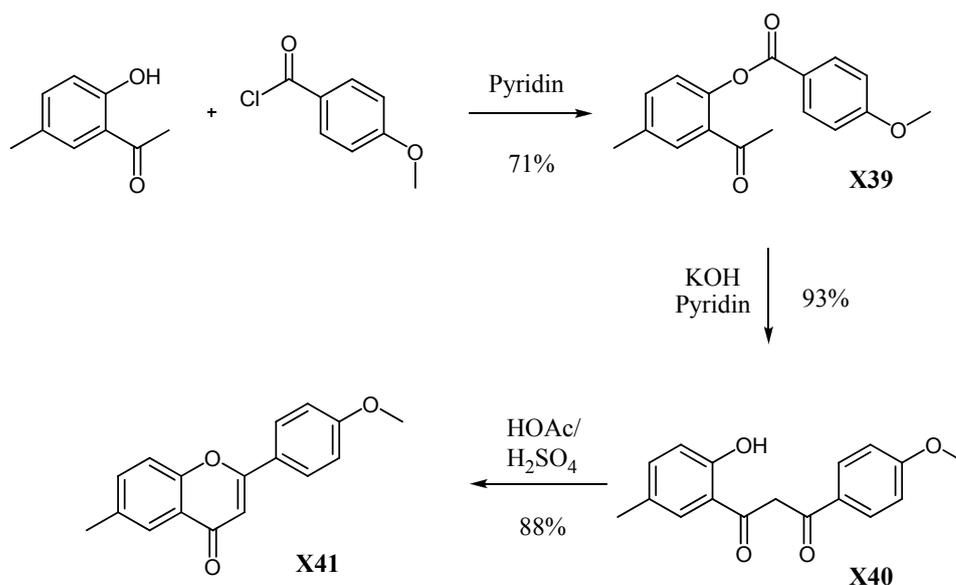


Abb. 36: Synthese von X41 über die Baker-Venkataraman-Route

Die Etherspaltung zum 4'-Hydroxy-6-methylflavon (X42) wurde in mäßiger Ausbeute durch mehrtägiges Rühren mit Bortribromid (BBr₃) in Dichlormethan vollzogen, die anschließende Einführung der Benzoylschutzgruppe mit Benzoylchlorid in sehr guter Ausbeute in Pyridin (Abb. 37).

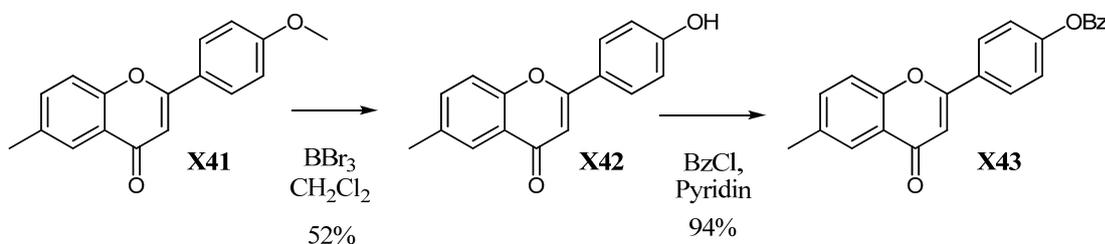
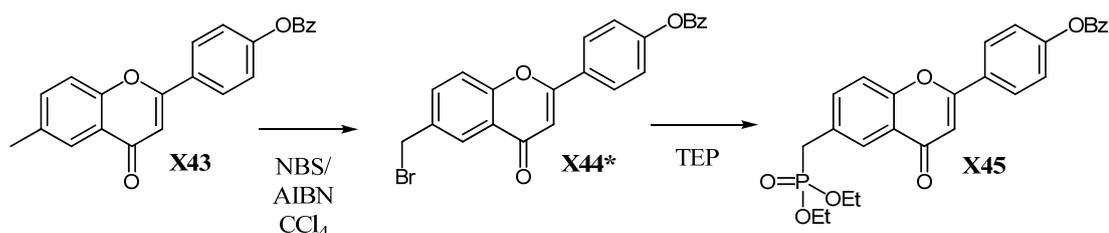


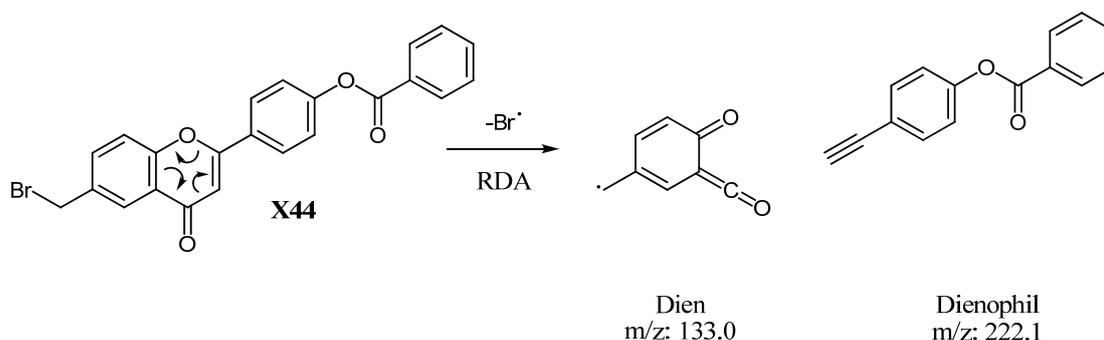
Abb. 37: Synthese von 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (X43)

Die Darstellung des Phosponats gelang durch die radikalische Bromierung von **X43** mit NBS und AIBN in Tetrachlorkohlenstoff und anschließender Arbuzov-Reaktion mit Triethylphosphit (TEP) in einer Ausbeute von 35 % über beide Stufen. Dabei wurde das Bromid nur massenspektroskopisch untersucht und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet (**Abb. 38**).



*Abb. 38: Darstellung des Phosponats **X45** über das Brommethylderivat **X44** (* = nicht isoliert)*

Im Massenspektrum des nicht isolierten Bromids **X44** sind außer den beiden M^+ -Peaks der Brom-Isotope in nicht zu vernachlässigender Intensität zwei Fragmente relativ hoher Masse zu finden. m/z (%) = 223.2 (25) und 133.2 (48). Diese Fragmente entstehen im Massenspektrometer durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA) und sind typisch für die Klasse der Flavonoide^[38] (**Abb. 39**).



*Abb. 39: Retro-Diels-Alder (RDA)-Fragmentierung von **X44***

Alle Verbindungen wurden umfassend spektroskopisch untersucht, alle NMR-Signale konnten mittels mehrdimensionaler Methoden zugeordnet werden. Die Diskussion der NMR-Spektren wird auf das 4'-Benzoyloxy-6-((diethoxyphosphoryl)methyl)flavon (**X45**) beschränkt (**Abb. 40 - Abb. 44, Tab. 7**).

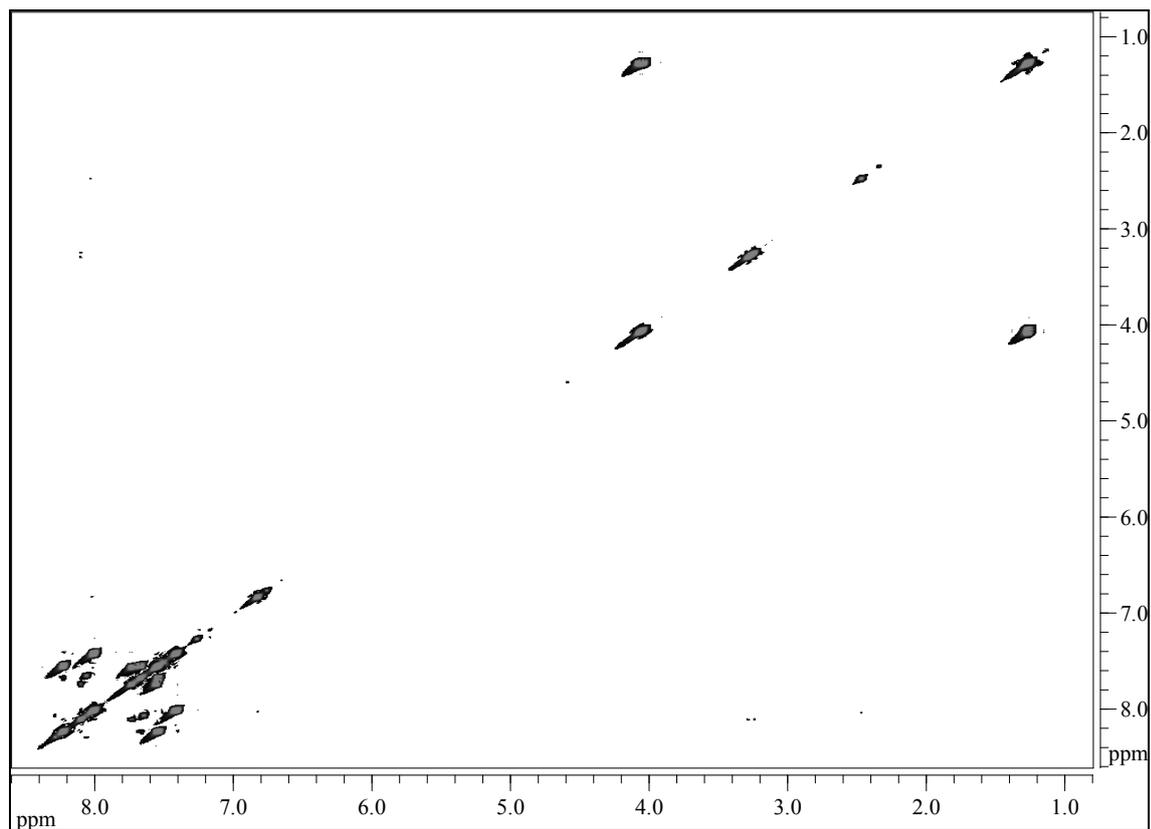


Abb. 40: HH-COSY (CDCl_3) von X45, ^1H (500 MHz) horizontal & vertikal, $T = 297\text{ K}$

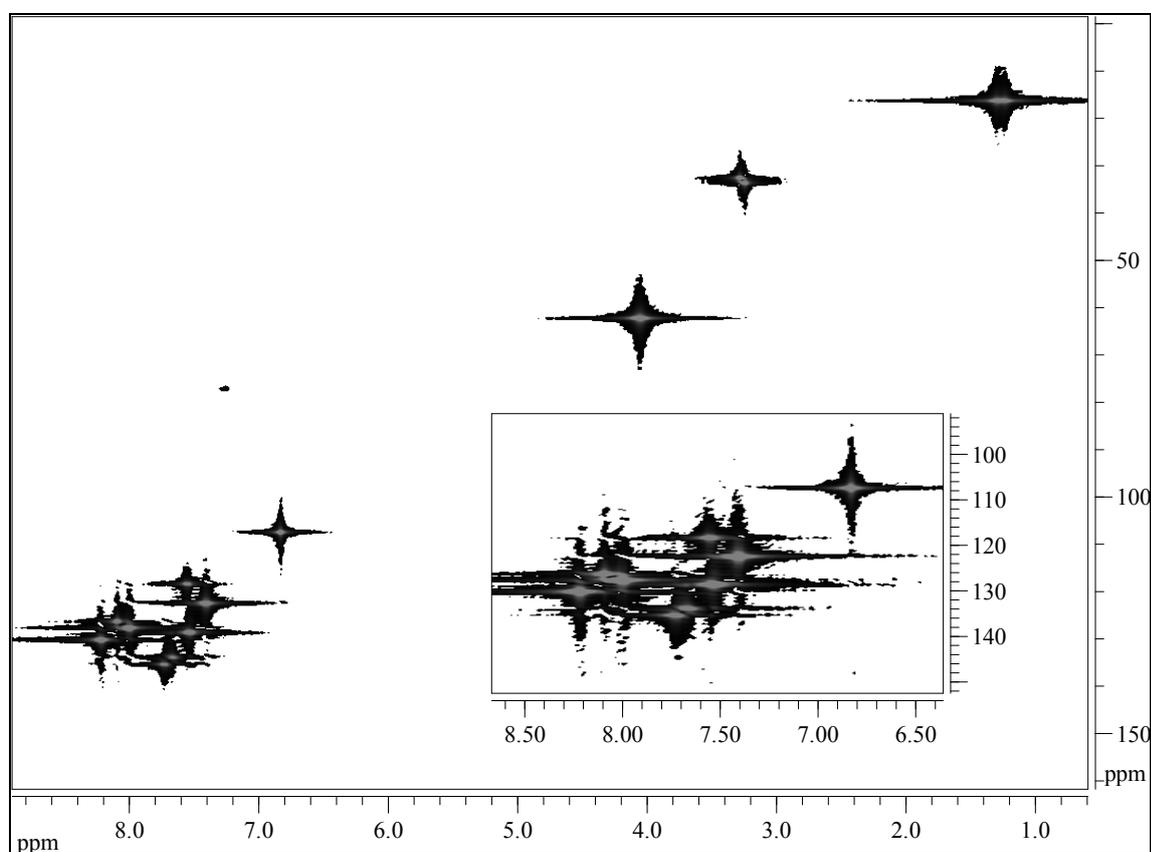


Abb. 41: HMQC (CDCl_3) von X45, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 298\text{ K}$

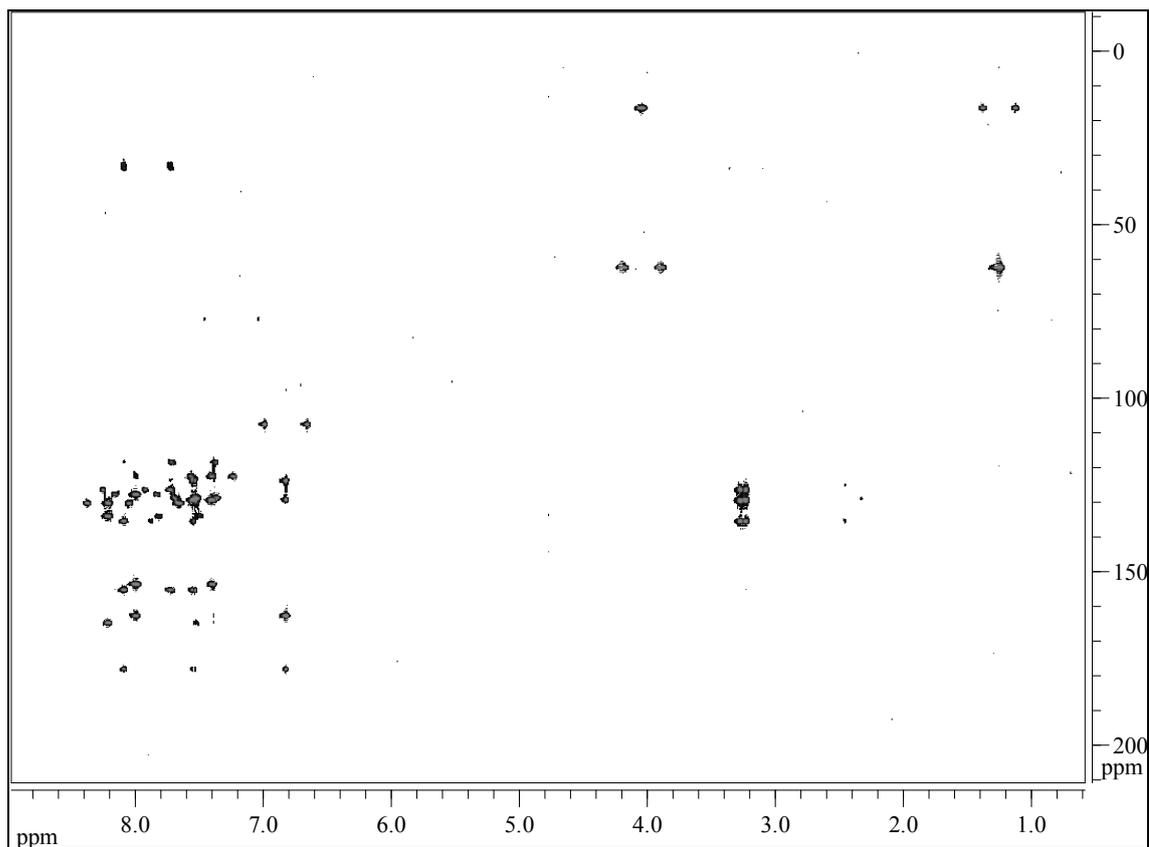


Abb. 42: HMBC (CDCl_3) von X45, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 298\text{ K}$

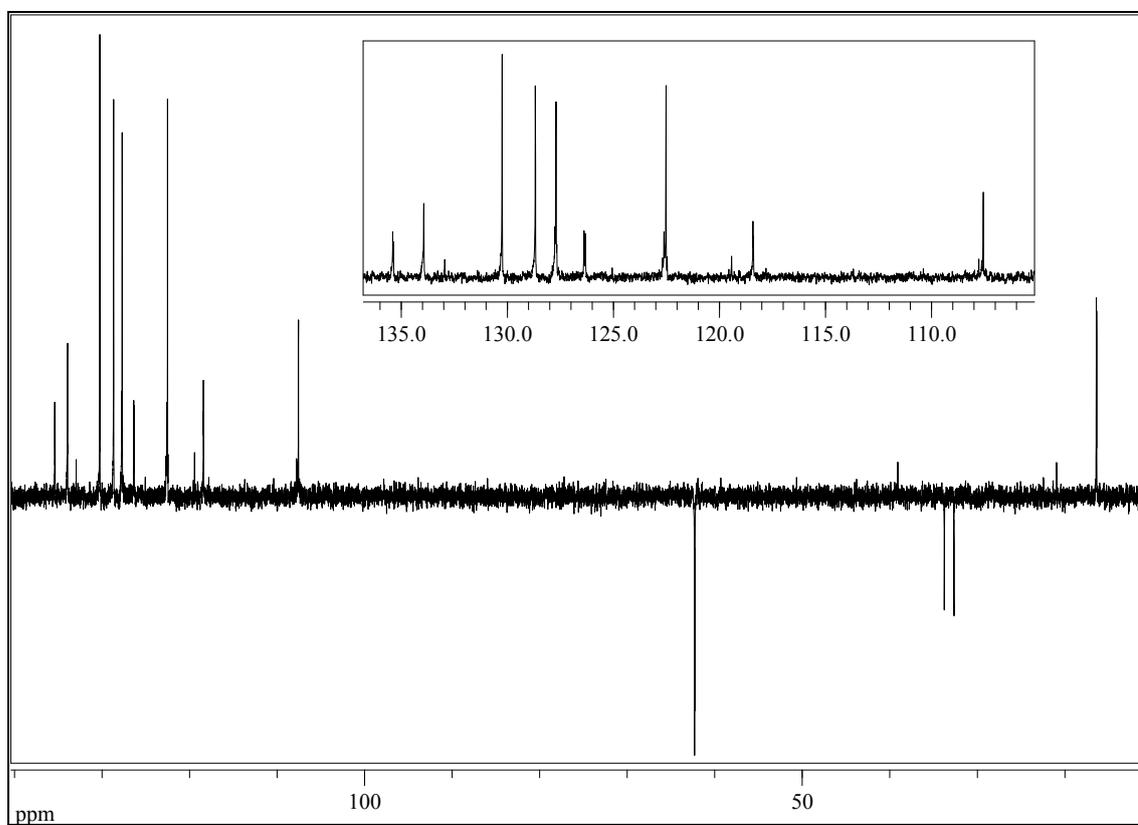


Abb. 43: $^{135}\text{DEPT}$ (CDCl_3) von X45, 500 MHz, $T = 297\text{ K}$

Tab. 7: Zuordnung der NMR-Signale für X45, Dublettaufspaltung durch ^{31}P (Kernspin: $1/2$)

$\delta_{\text{H}} / \text{ppm}$	Mult.	Int. ^1H	$J_{\text{HH}} / \text{Hz}$	$J_{\text{HP}} / \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	$J_{\text{CP}} / \text{Hz}$	Zuordnung
1.27	t	6	7.1		16.35	$^3J = 6.1$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$
3.27	d	2		$^2J = 21.5$	33.21	$^1J = 138.7$	6- CH_2P
4.06	dq	4	7.1	$^3J = 8.1$	62.27	$^2J = 6.7$	CH_2OP^*
6.82	s	1			107.56		3 CH
7.41	m	2	$ N = 8.8^{**}$		122.52		3', 5' CH
7.54	tt	1	7.8		128.68		3'', 5'' CH
7.55	d	1	8.8		118.40	$^4J = 2.7$	8 CH
7.67	tt	1	7.5, 1.2		133.94		4'' CH
7.73	ddd	1	8.6, 2.2	$^4J = 2.2$	135.38	$^3J = 4.9$	7 CH
8.00	m	2	$ N = 8.8$		127.71		2', 6' CH
8.10	dd	1	2.5	$^4J = 2.5$	126.35	$^3J = 8.0$	5 CH
8.22	m	1	8.5		130.25		2'', 6'' CH
					123.55	$^4J = 2.6$	4a C
					128.99		1'' C
					129.33		1' C
					129.44	$^2J = 9.3$	6 C
					153.55		4' C
					155.25	$^5J = 3.1$	8a C
					162.62		2 C
					164.70		COO
					178.01		4 C

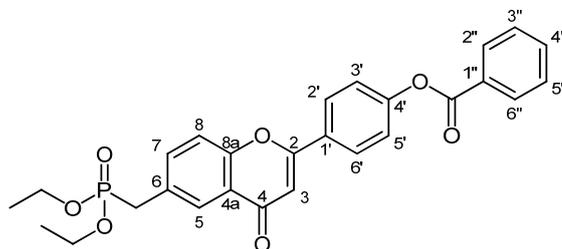


Abb. 44: Lokanten für die NMR-Zuordnung für X45

* die beiden diastereotopen Protonen sind zufällig isochron

** $|N| = |^3J^o + ^5J^p|$ - Kopplung in $[\text{AB}]_2$ -Systemen

2.3.5 Kupplungsreaktionen 2 (X46)

Das 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**) konnte erstmalig von Peter Noack durch die Horner-Emmons-Reaktion unter simultaner Abspaltung der Schutzgruppe dargestellt werden. Für die Synthese wurde das im Arbeitskreis Martin etablierte Pyridin-Natriummethanolat-System verwendet und es konnten damit Ausbeuten von 11 % erreicht werden ^[27]. Durch die geringe Ausbeute und die nicht sehr praktische Zufuhr des Feststoffs Natriummethanolat über einen längeren Zeitraum unter inerter Atmosphäre wurde, analog zu den Synthesen von **X27** und **X30**, als Base eine ethanolische Lithiummethanollösung verwendet, welche mittels Spritzen, Kanülen und Septa langsam zu den in Pyridin gelösten Edukten unter Argon hinzugegeben werden konnte. Die Ausbeute konnte auf 36 % gesteigert werden. In Analogie zu **X27** wurde fast ausschließlich das thermodynamisch stabilere all-*trans*-Isomer gebildet (**Abb. 45**).

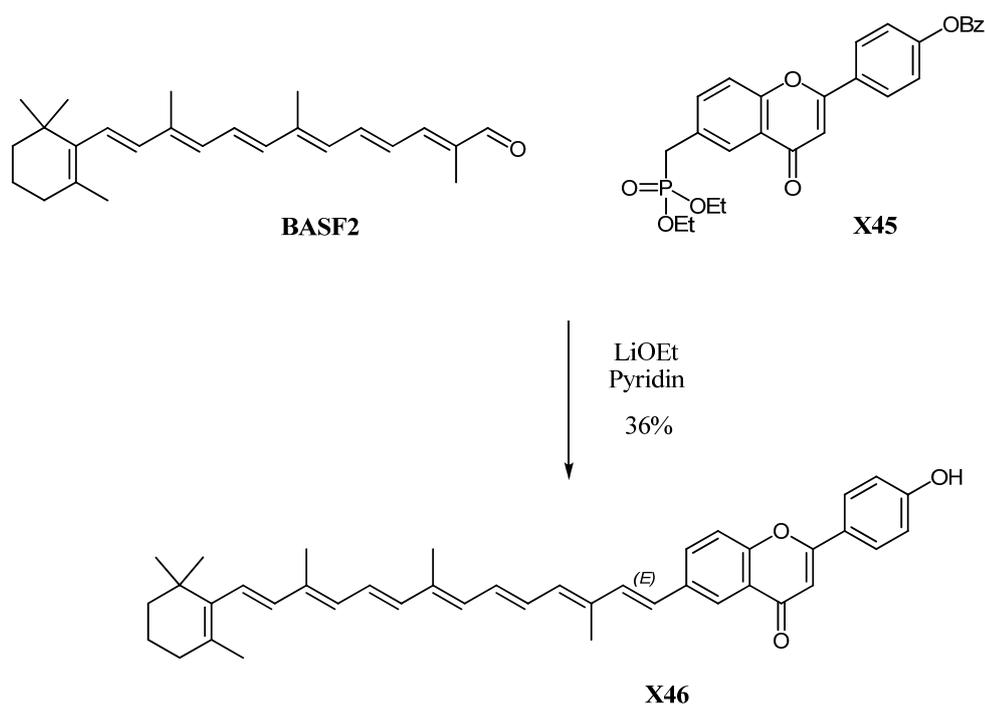


Abb. 45: Synthese von 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**)

Die Protonen- und Kohlenstoffsignale konnten mit Hilfe mehrdimensionaler Methoden aufgeklärt werden. Die Löslichkeit von **X46** war nur in einem Gemisch aus den deuterierten Lösemitteln Chloroform und Methanol (3:1) ausreichend, um die Kohlenstoffsignale zu detektieren (**Abb. 46 -Abb. 49, Tab. 8, Tab. 9**).

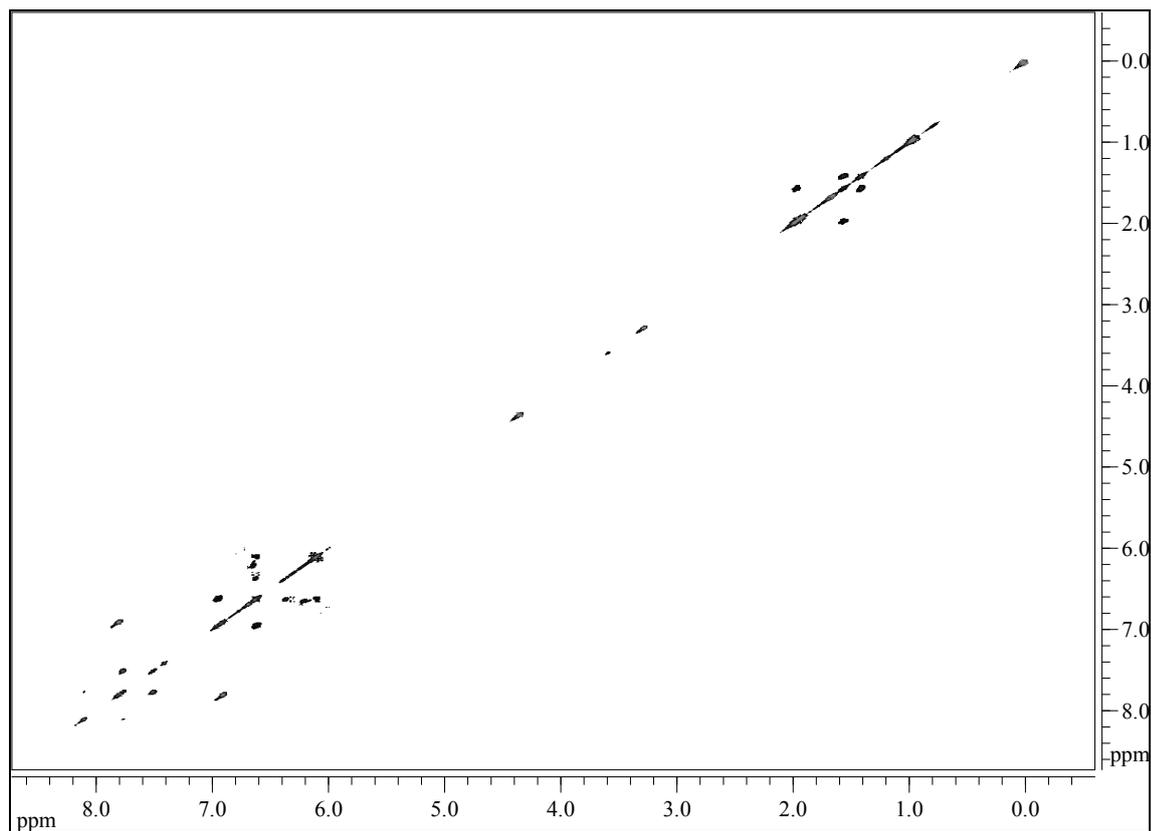


Abb. 46: HH-COSY ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) von **X46**, ^1H (500 MHz) horizontal & vertikal, $T = 297\text{ K}$

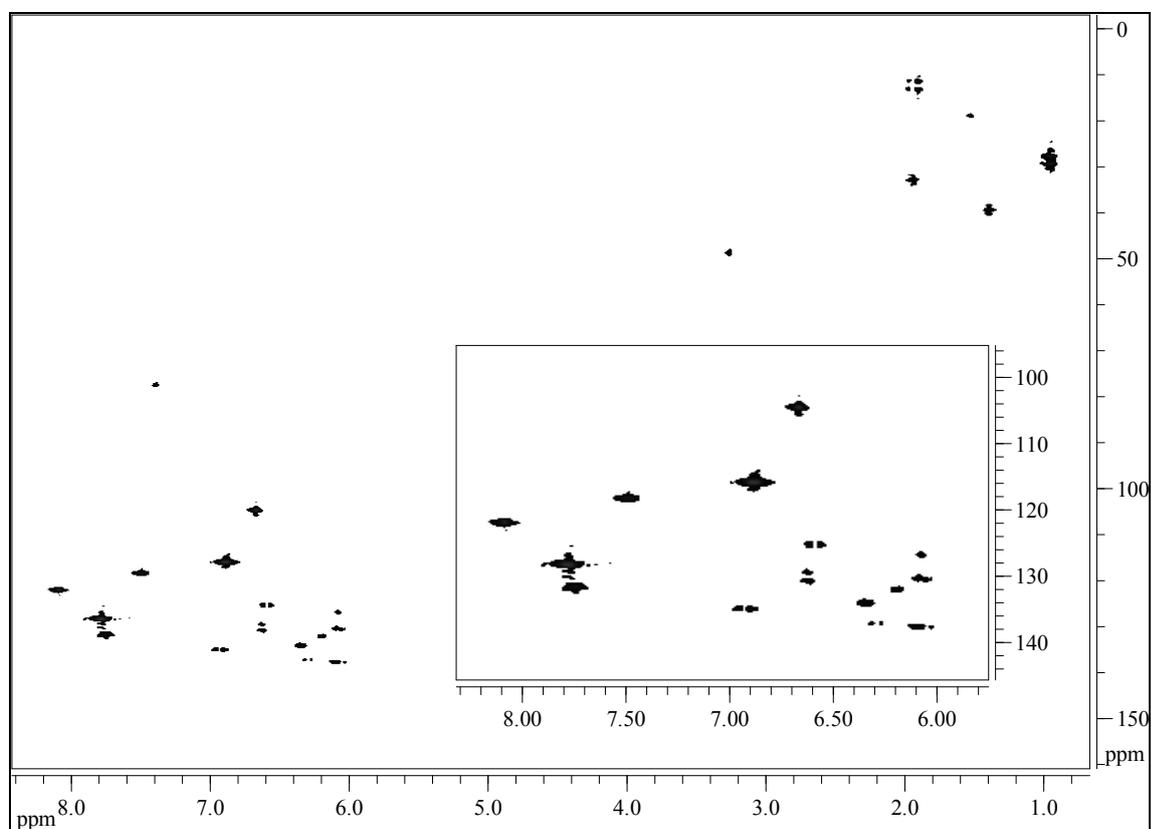


Abb. 47: HMQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) von **X46**, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 297\text{ K}$

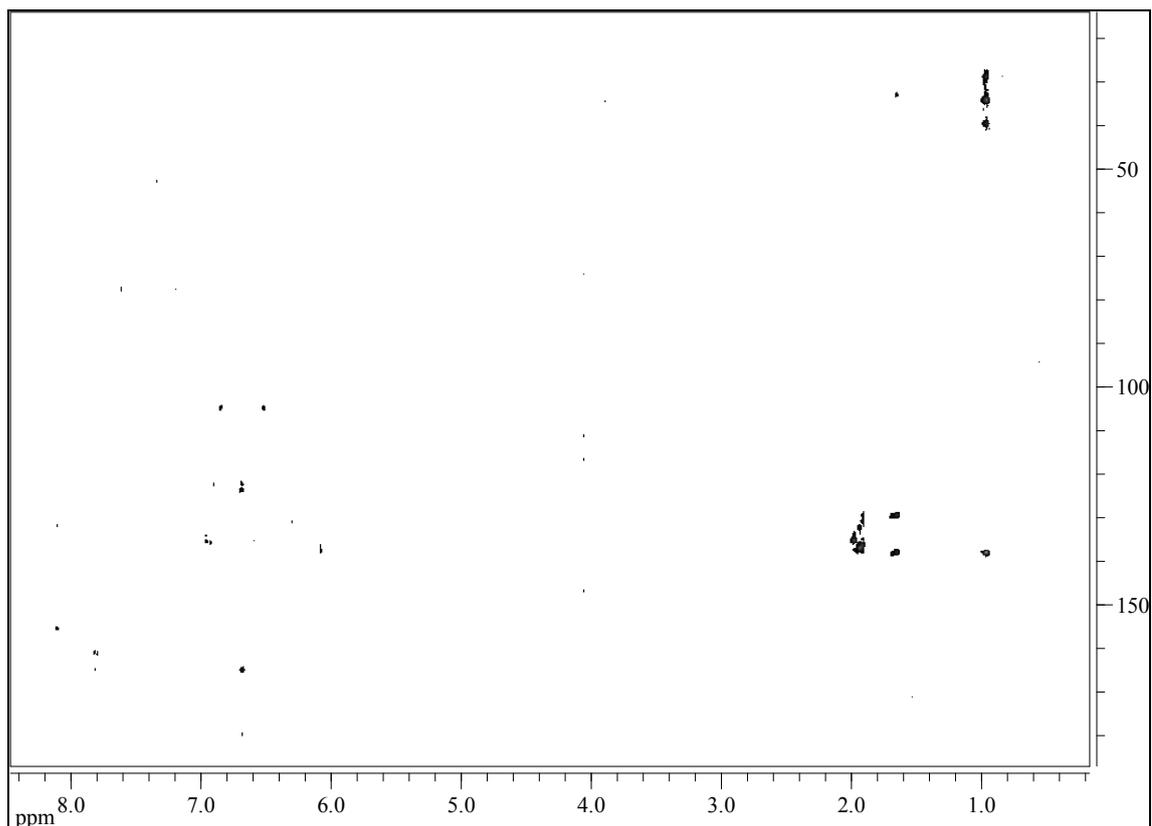


Abb. 48: HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) von **X46**, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 298\text{ K}$

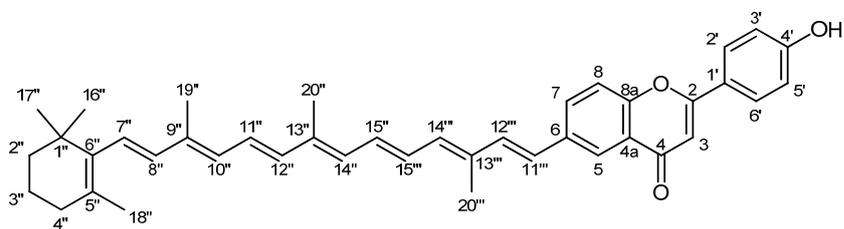


Abb. 49: Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale von **X46**

Tab. 8: Zuordnung der NMR-Signale für X46

$\delta_{\text{H}} / \text{ppm}$	Mult.	Int. ^1H	$J_{\text{HH}} / \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	Zuordnung
0.97	s	6		28.79	16" & 17" CH ₃
1.39 - 1.43	m	2		39.51	2" CH ₂
1.52 - 1.59	m	2		19.11	3" CH ₂
1.66	s	3		21.58	18" CH ₃
1.92	s	3		12.57	19" CH ₃
1.94 - 1.99	m	2		32.96	4" CH ₂
1.94	s	3		12.66	20" CH ₃
1.98	s	3		12.57	20" CH ₃
6.07	d	1	16.0	137.59	8" CH
6.10	d	1	11.4	130.61	10" CH
6.13	d	1	16.1	126.69	7" CH
6.21	d	1	10.4	132.01	14" CH
6.31	d	1	14.9	136.98	12" CH
6.35	d	1	10.4	133.94	14" CH
6.59	d	1	16.1	125.48	11" CH
6.60	dd	1	13.9, 10.4	130.86	15" CH
6.62	dd	1	15.7, 11.4	125.26	11" CH
6.65	dd	1	10.4, 13.9	129.44	15" CH
6.67	s	1		104.99	3 CH
6.90	m	2	$ N = 8.8$ *	115.90	3' & 5' CH
6.93	d	1	16.0	134.86	12" CH
7.46	d	1	8.7	118.26	8 CH
7.72	dd	1	8.8, 2.2	131.46	7 CH
7.77	m	2	$ N = 8.8$	128.18	2' & 6' CH
8.13	d	1	2.1	122.21	5 CH

* $|N| = |^3J^o + ^5J^p|$ - Kopplung in $[\text{AB}]_2$ -Systemen

Tab. 9: Zuordnung der quartären Kohlenstoffatome von X46

δ_{H} / ppm	Mult.	Int. ^1H	J_{HH} / Hz	δ_{C} / ppm	Zuordnung
				34.12	1" C
				122.38	1' C
				123.58	4a C
				129.30	5" C
				135.19	6 C
				135.23	13''' C
				136.14	13" C
				137.03	9" C
				137.77	6" C
				155.20	8a C
				160.65	4' C
				164.28	2 C
				178.99	4 C

2.3.6 Flavonoidbaustein 3 (X72)

Das ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphonium-bromid (X72) wurde in einer siebenstufigen Synthese in guten Ausbeuten dargestellt. Dazu wurde das 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (X69) über eine modifizierte Baker-Venkataraman-Transformation^[39] mit anschließender Etherspaltung ohne Aufreinigung der Zwischenprodukte synthetisiert (Abb. 50). Hierfür werden in einem Zwei-Phasensystem aus Benzol und gesättigter Kaliumcarbonatlösung alle drei Hydroxylgruppen eines 2',4',6'-Trihydroxypropiophenon mit vier Äquivalenten *p*-Anisoylchlorid verestert. Durch Zugabe von Tetrabutylammoniumhydrogensulfat wird der Ester in 2'-Position phasentransferkatalysiert zur Diketonstufe (X67) umgelagert. Für die Zyklisierung zum 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-3-methylflavon (X68) wird das Diketon X67 mit verdünnter Kaliumcarbonatlösung zum Rückfluss erhitzt und anschließend mit Essigsäure behandelt. Der rohe Monomethylether X68 kann anschließend in sehr guten Ausbeuten mit Pyridinhydrochlorid (Py·HCl) in einer Mikrowellenreaktion ohne Lösemittel zum 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (X69) gespalten werden. Durch das Erhitzen in der Mikrowelle konnten die Reaktionszeiten für die Aryl-Methyl-Etherspaltung mit Py·HCl sehr kurz gehalten werden (15 Minuten). Verbindung X69 wird ohne gesonderte Aufreinigung analysenrein erhalten.

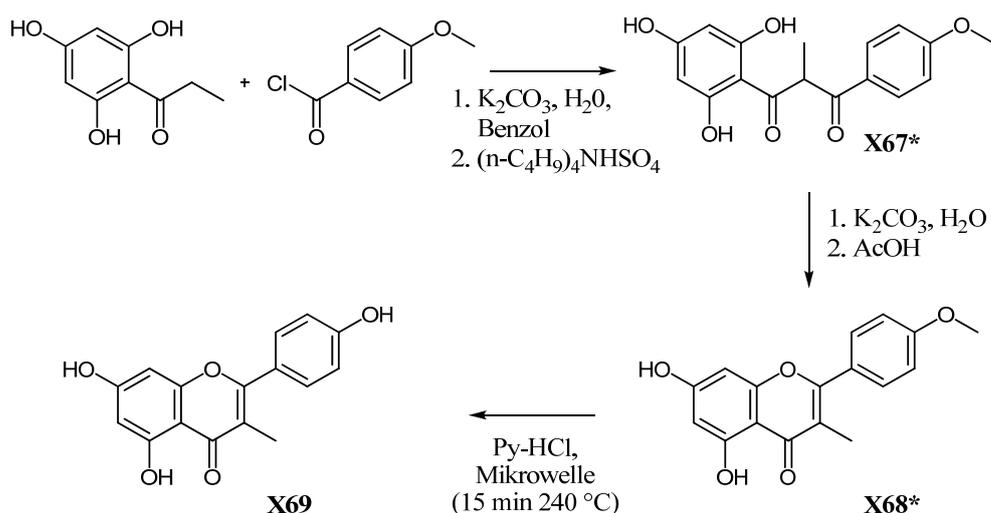


Abb. 50: Synthese von X69 in 80%iger Ausbeute über vier Stufen (* = nicht isoliert)

Als neue Schutzgruppe wird die Acetylschutzgruppe gewählt, welche sogar in der durch die Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff unreaktiven Hydroxylgruppe in 5-Position, relativ leicht mit Essigsäureanhydrid in Pyridin eingeführt werden kann (*Abb. 51*).

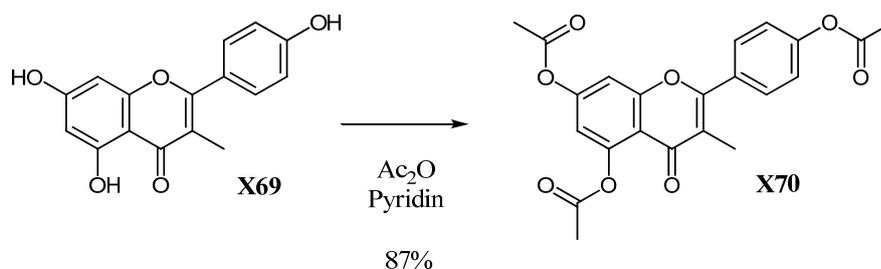


Abb. 51: Acetylierung von X69

Das ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphonium-bromid (**X72**) ist in zwei Stufen über das Brommethylderivat zugänglich. Dazu wird nach der radikalischen Bromierung von **X70** mit NBS und AIBN ohne weitere Aufreinigung Verbindung **X71** mit Triphenylphosphin in Toluol zum Rückfluss erhitzt, wodurch **X72** ausfällt und abgetrennt werden kann. Das rohe **X72** wird zur Aufreinigung in der gerade notwendigen Menge Methanol oder Dichlormethan gelöst und in einen großen Überschuss Diethylether eingetropf, wodurch **X72** sauber ausfällt (*Abb. 52*).

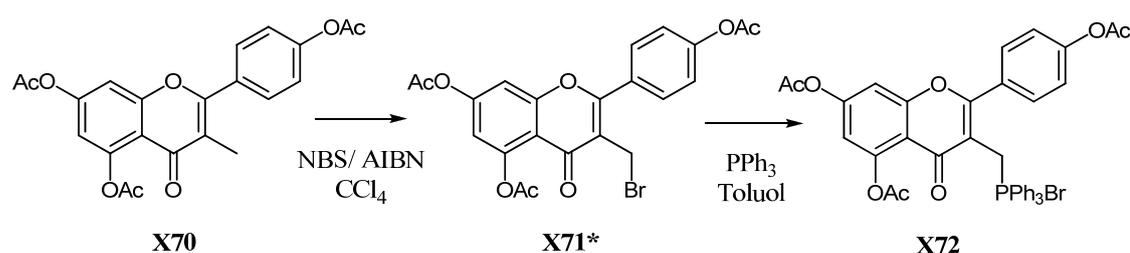


Abb. 52: Synthese von X72 in 47%iger Ausbeute über beide Stufen (= nicht isoliert)*

Alle Verbindungen wurden umfassend spektroskopisch untersucht, alle NMR-Signale konnten mittels mehrdimensionaler Methoden zugeordnet werden. Die Diskussion der NMR-Spektren wird auf das ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphonium-bromid (**X72**) beschränkt (*Abb. 53 - Abb. 55, Tab. 10*).

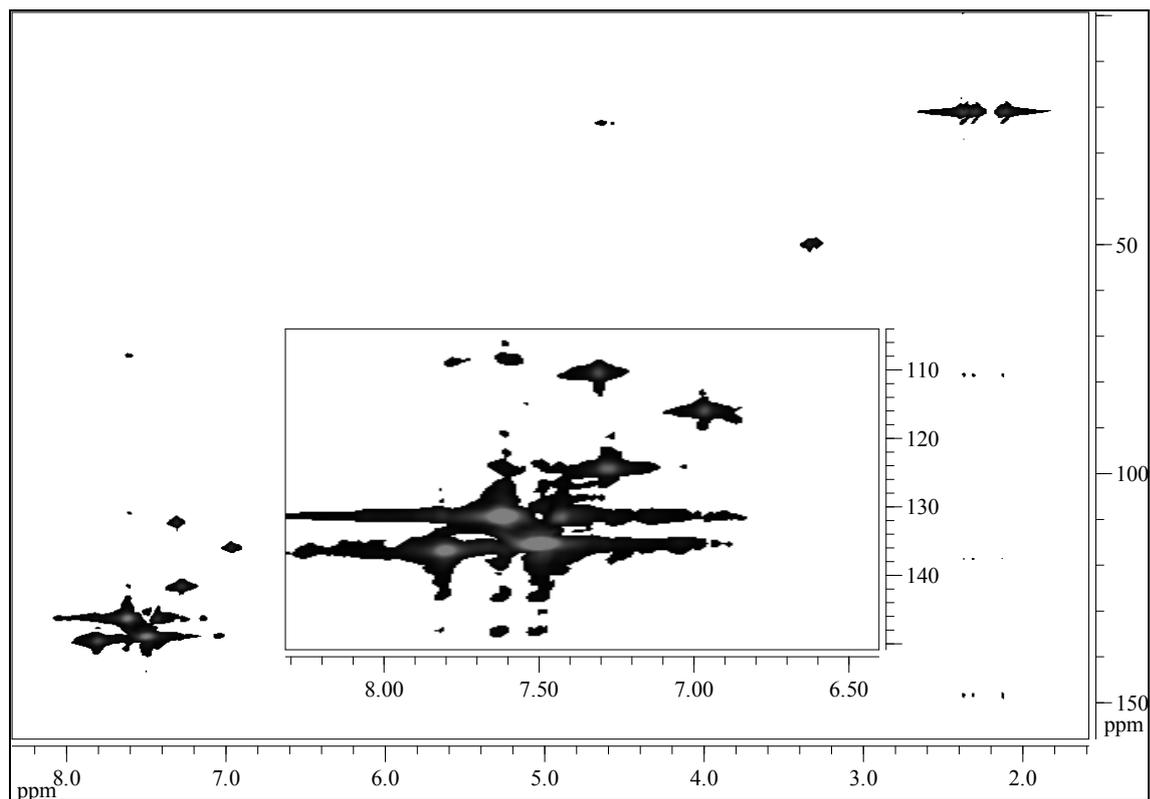


Abb. 53: HMQC (Methanol- d_4) von X72, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 297\text{ K}$

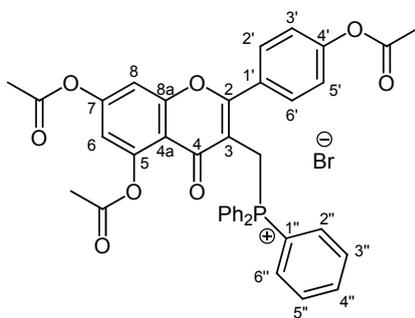


Abb. 54: Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale von X72

Tab. 10: Zuordnung der NMR-Signale für X72 in Methanol-d4

$\delta_{\text{H}} / \text{ppm}$	Mult.	Int.	$J_{\text{HH}} / \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	$J_{\text{HP}} / \text{Hz}$	Zuordnung
2.13	s	3H, 1C		20.95		Ac-CH3
2.32	s	3H, 1C		20.95		Ac-CH3
2.38	s	3H, 1C		21.01		Ac-CH3
4.63	m	1H, 1C	13.4, 2.4	22.27 - 24.03		3-CX ₂ -PPh ₃ *
6.97	d	1H, 1C	2	115.91		6-CH
7.28	m	2H, 2C	$ N = 8.5$ **	123.31		3' & 5'-CH
7.31	d	1H, 1C	2	110.43		8-CH
7.44	m	2H, 2C	$ N = 8.4$	131.38		2' & 6'-CH
7.49	m	6H, 6C	8.2, 1.4	135.23	d; ${}^2J = 9.9$	2" & 6"-CH
7.62	td	6H, 6C	7.5, 1.4	131.28	d; ${}^3J = 12.8$	3" & 5"-CH
7.81	tt	3H, 3C	7.5, 1.4	136.30	d; ${}^4J = 2.9$	4"-CH
		1C		114.06		4a-C
		1C	${}^2J_{\text{D-C}} = \text{n.a.}$	117.28	m, ${}^2J = 9.6$	3-C
		3C	${}^3J_{\text{D-C}} = 3.0$	119.27	dt, ${}^1J = 86.1$	1"-C
		1C		129.87	d; ${}^4J = 1.6$	1'-C
		1C		151.32		4'-C
		1C		154.74		5-C
		1C		156.60		8a-C
		1C		158.57		7-C
		1C		165.27	d; ${}^3J = 8.2$	2-C
		1C		169.69		Ac-C=O
		1C		170.67		Ac-C=O
		1C		170.74		Ac-C=O
		1C		176.22		4-C

* X = ¹H oder ²D** $|N| = |{}^3J^o + {}^5J^p|$ - Kopplung in [AB]₂-Systemen

Die aciden Protonen der Methylengruppe α -ständig zum Phosphoratom tauschen mit dem deuterierten Methanol aus. Den ersten Hinweis darauf gibt das Protonenspektrum, in dem an der erwarteten Position von $\delta = 4 - 5$ ppm ein Multiplett mit einer Intensität $I = 1$ anstelle eines erwarteten Dubletts mit der Intensität $I = 2$ zu sehen ist. Im protonenkoppelten Phosphorspektrum sind ebenso anstelle eines erwarteten Singletts drei Signale im Bereich der erwarteten chemischen Verschiebung für Phosphoniumsalze zu erkennen. Wartet man einige Tage, sinkt die Signalintensität der Methylengruppe im Protonenspektrum auf $I = 0.2$ und im Phosphorspektrum ist eine Änderung der relativen Signalintensität der drei Signale zueinander zu beobachten. Das kann nur durch das Vorhandensein drei unterschiedlich stark deuterierter Derivate von **X72** erklärt werden ($3\text{-CH}_2\text{PPh}_3\text{Br}$, $3\text{-CHDPPH}_3\text{Br}$, $3\text{-CD}_2\text{PPh}_3\text{Br}$).

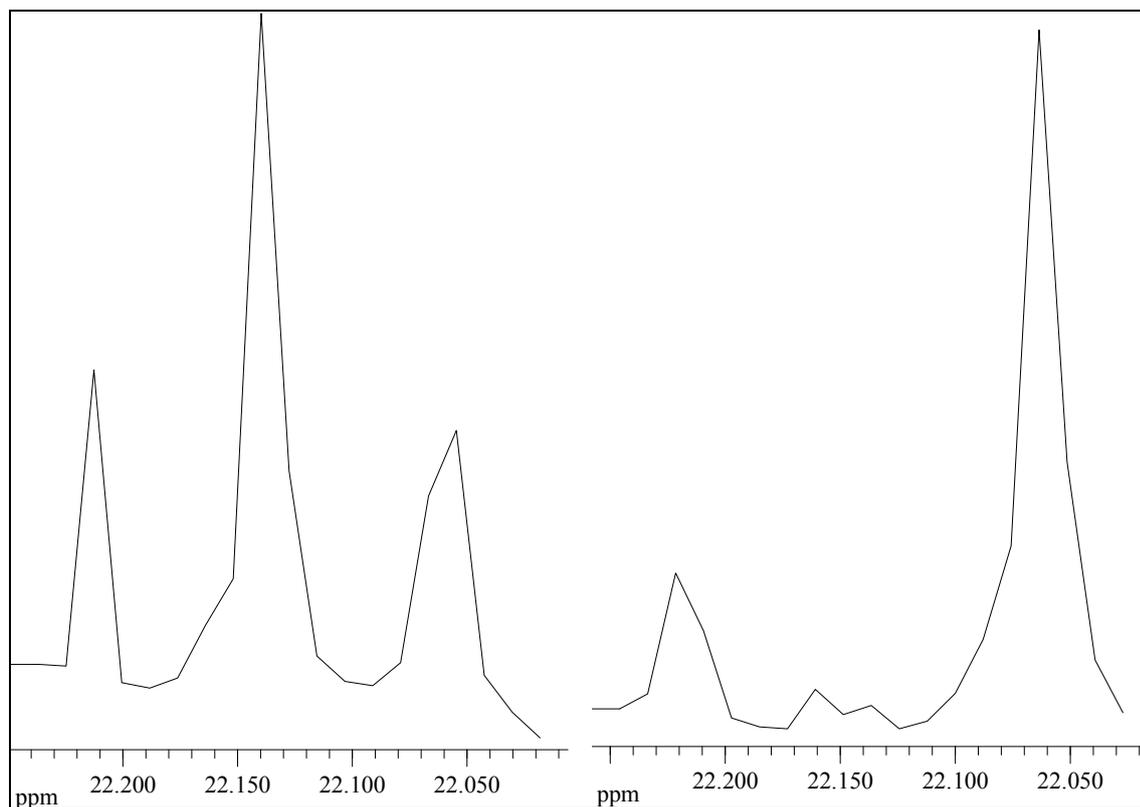


Abb. 55: $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren (CD_3OD) von **X72** nach einigen Stunden (links) bzw. Tagen (rechts)

2.3.7 Kupplungsreaktionen 3 (X73)

Für die abschließende Wittig-Reaktion des Phosphoniumsalzes **X72** und dem C₂₅-Aldehyd **BASF2** wurde eine Reihe von Basen erprobt. Die Kupplung wurde mit Lithiumhexamethyldisilazid (LiHMDS), Lithiumdiisopropylamid (LDA), Epoxybutan, Kalium-*tert*-butanolat (KO^tBu), *n*-Butyllithium (*n*-BuLi) und Lithiumethanolat (LiOEt) getestet (**Abb. 56**).

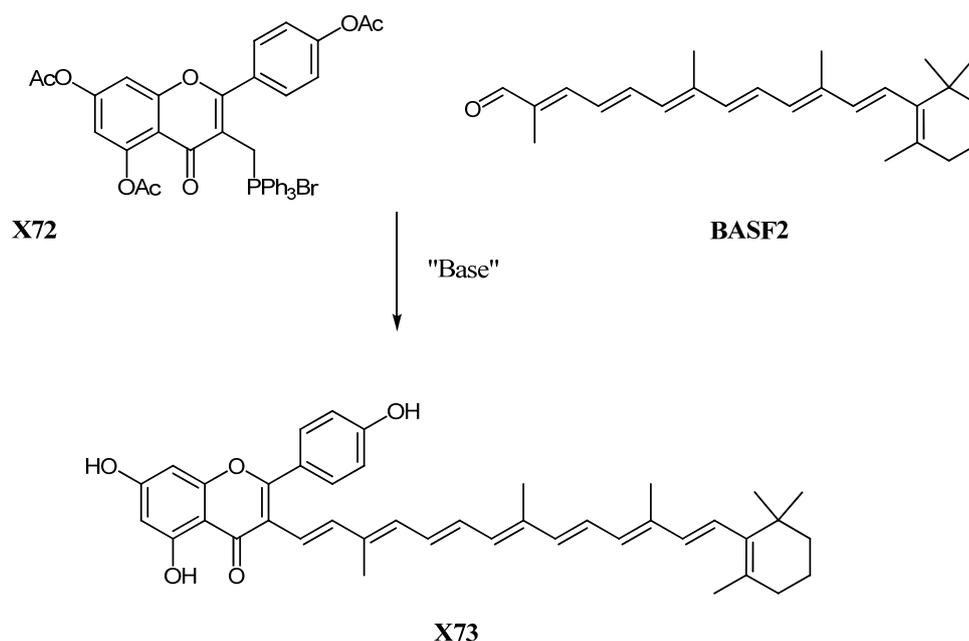


Abb. 56: Syntheschema für 3-(11'-Apo- β -carotiny)-5,7,4'-trihydroxyflavon (**X73**)

Bei der Verwendung der ersten vier Basen sollte die Kupplung unter Beibehaltung der Schutzgruppen, deren Spaltung in einem weiteren Schritt geplant war, durchgeführt werden. Nur bei der Verwendung des Butanolats konnte im Dünnschichtchromatogramm eine Produktentwicklung beobachtet werden. Nach einmaliger säulenchromatographischen Aufreinigung wurde in geringer Ausbeute ein tiefroter Feststoff erhalten. Im MALDI-Spektrum wurden hauptsächlich Signale des zweifach acetylierten Derivats von **X73** gefunden. Alle Versuche, die Acetylschutzgruppen abzuspalten, misslangen. Bei der Verwendung von *n*-BuLi konnte keine Reaktion beobachtet werden.

Bei Verwendung des Ethanolats hat die Reaktion unter simultaner Abspaltung der Schutzgruppen funktioniert. Die Ausbeuten lagen jedoch nach einmaliger säulen-chromatographischer Aufreinigung unter 1%. Im MALDI-Spektrum waren überwiegend die Molekülmasse des **X73** und dessen Wasser-Adduktes und zu ca. 15% die ein- bzw. zweifach acetylierten Derivate von **X73** zu detektieren. Für weitere Analysen und weitere Aufreinigung war jeweils zu wenig Substanz erhalten worden. Eine mögliche Erklärung für die geringen Ausbeuten wird in **Abb. 57** gegeben. Die Delokalisierung der negativen Ladung des in 4'-Position verseiften und deprotonierten **X72** bis zur Carbonylgruppe des Flavons würde, durch die partielle negative Ladung in β -Position zum Phosphoratom, die Deprotonierung in α -Position deutlich erschweren. Wird anstelle von **X72** ein Derivat verwendet, welches in 4'-Position eine Etherschutzgruppe anstelle des Esters trägt, sind gute Ausbeuten für die Wittig-Reaktion bei Verwendung von *n*-BuLi als Base beschrieben^[40].

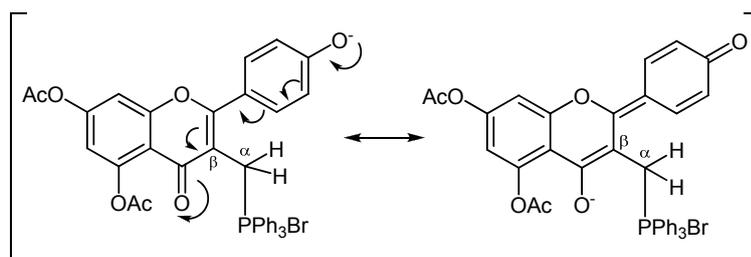


Abb. 57: Mesomere Grenzstrukturen des in 4'-Position verseiften und deprotonierten X72

2.3.8 Synthese der Subchromophore von Verbindung X46

Analog zu der Synthese des 4'-Methylflavons (**X24**) wurde das 4'-Methoxyflavon (**X101**) über die klassische Baker-Venkataraman-Route in guten bis sehr guten Ausbeuten dargestellt (**Abb. 58**).

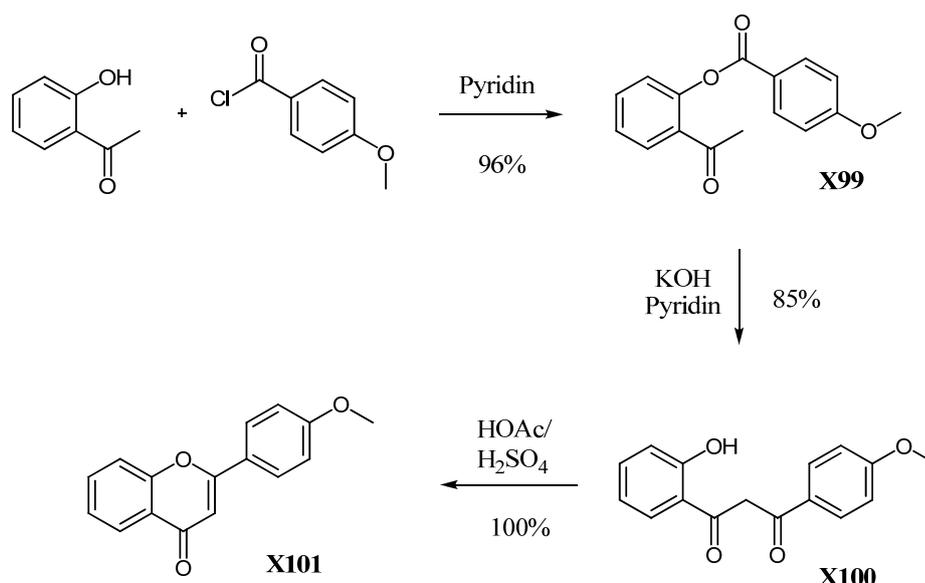


Abb. 58: Synthese von **X101**

Für die Methyletherspaltung wurde analog **X69** das Edukt mit Pyridinhydrochlorid (PyHCl) vermengt und im Mikrowellenreaktor erhitzt. Sogar bei einer Reaktionszeit von nur fünf Minuten wurde **X101** fast quantitativ entschützt, und ohne Aufreinigung wurde der Flavonsubchromophor **X102** analysenrein erhalten (**Abb. 59**).

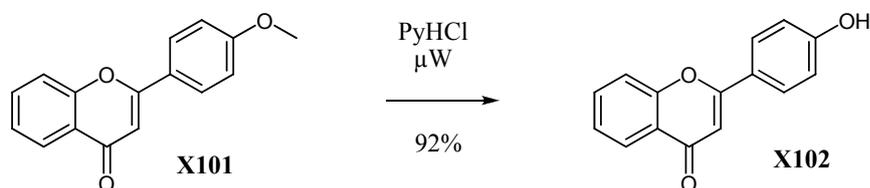


Abb. 59: Mikrowellensynthese des 4'-Hydroxyflavon (**X102**)

Aufgrund zu geringer Löslichkeit konnten keine reinen $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren von **X102** erhalten werden, durch die höhere Empfindlichkeit jedoch ein $^{135}\text{DEPT}$ - und HMQC-Spektrum wodurch die nicht quartären Kohlenstoffatome eindeutig zugeordnet werden konnten (*Abb. 60 - Abb. 62*).

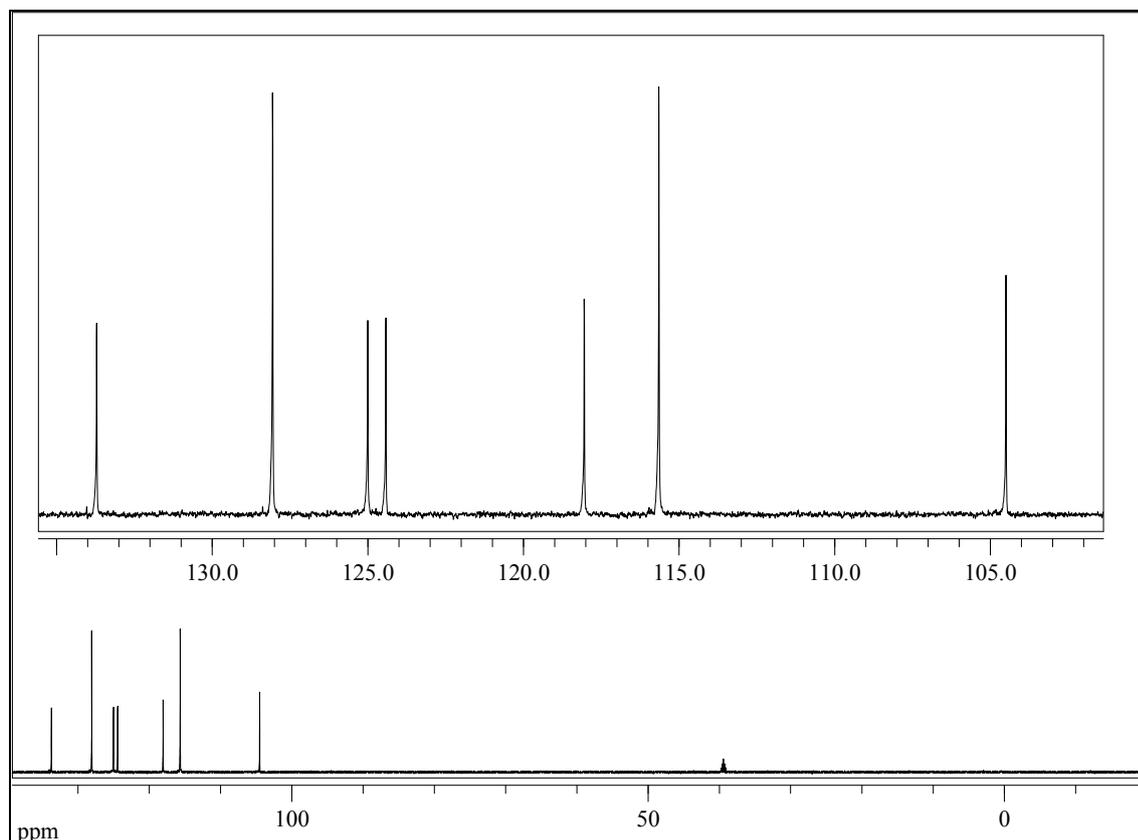


Abb. 60: $^{135}\text{DEPT}$ in DMSO-d_6 von **X102**, 500 MHz, $T = 296\text{ K}$

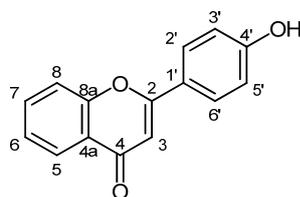


Abb. 61: Lokanten für die NMR-Zuordnung von **X102**

$^{135}\text{DEPT}$ ($T = 296\text{ K}$, DMSO-d_6 , 500 MHz):

$\delta = 104.49$ (**3-CH**), 115.65 (2C, **3'**, **5'-CH**), 118.05 (**8-CH**), 124.42 (**5-CH**), 125.00 (**6-CH**), 128.06 (2C, **2'**, **6'-CH**), 133.71 (**7-CH**) ppm.

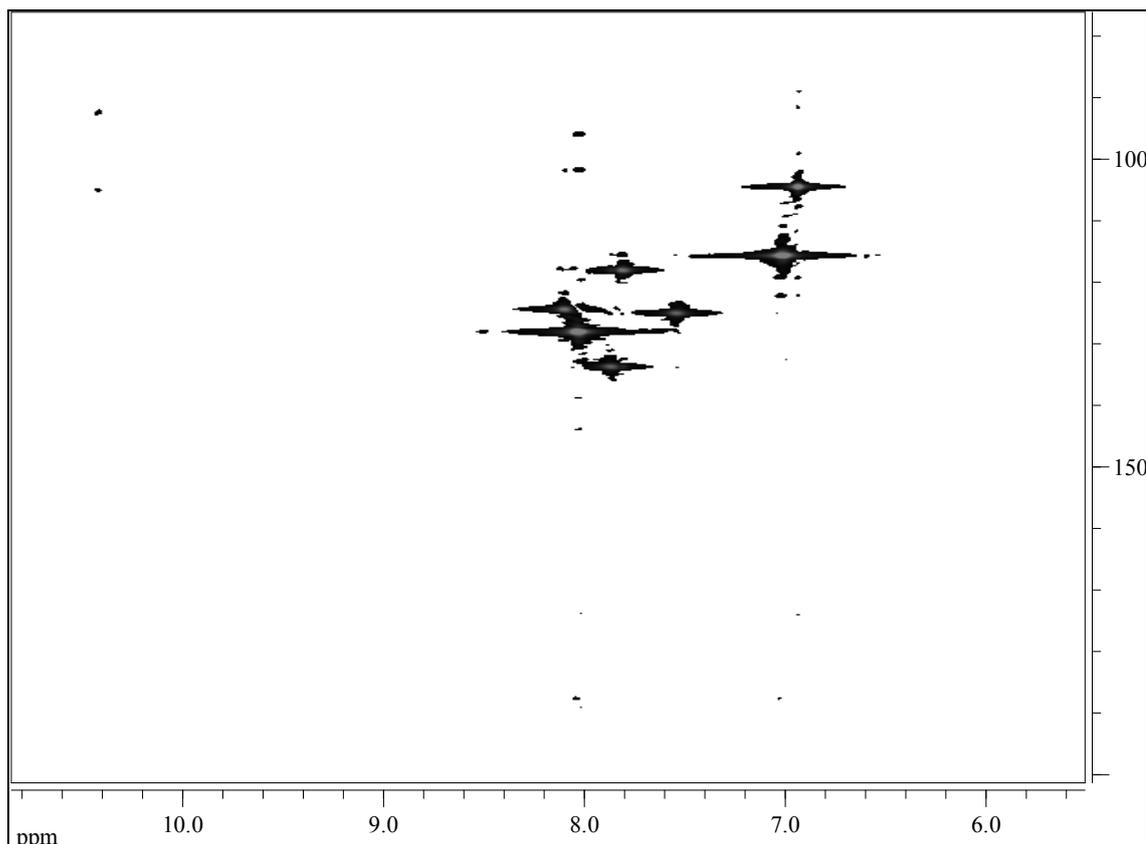


Abb. 62: HMQC (DMSO-*d*₆) von **X102**, ¹H (500 MHz) horizontal, ¹³C (125 MHz) vertikal, T = 296 K

Der zweite Subchromophor, das (11'-Apo-β-carotiny)benzol (**X104**) konnte in guten Ausbeuten analog zu der Synthese von **X46** durch eine Horner-Emmons-Reaktion aus dem C₂₅-Aldehyd (BASF2) und kommerziell erhältlichem Diethyl-benzylphosphonat mit Lithiumethanolat als Base dargestellt werden (Abb. 63).

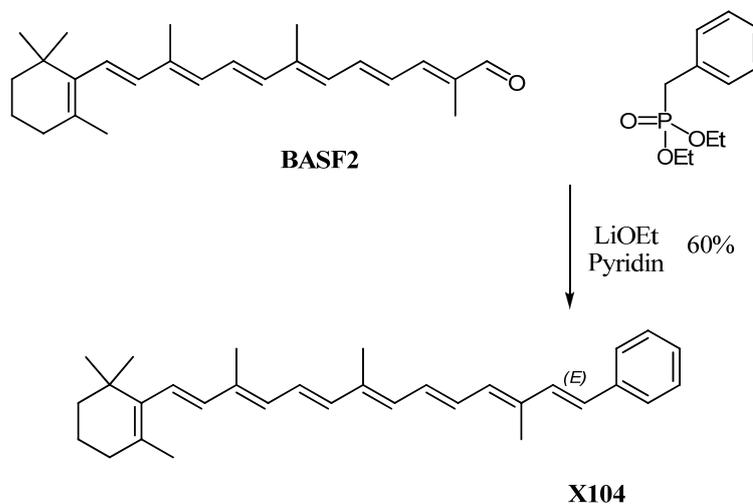


Abb. 63: Synthese von **X104**

Für **X104** konnten alle Protonen- und Kohlenstoffsignale durch mehrdimensionale NMR-Methoden zugeordnet werden (*Abb. 64 - Abb. 67, Tab. 11, Tab. 12*).

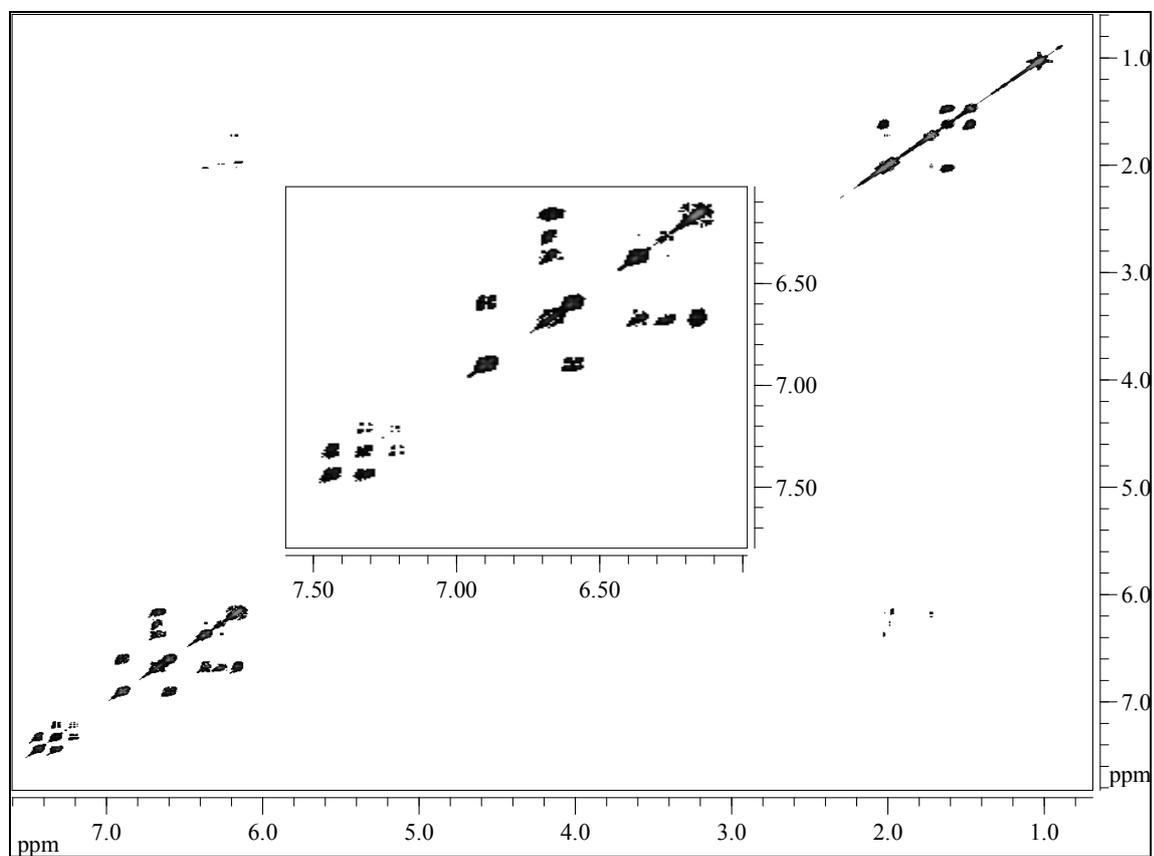


Abb. 64: HH-COSY (CDCl₃) von X104, ¹H (500 MHz) horizontal & vertikal, T = 298 K

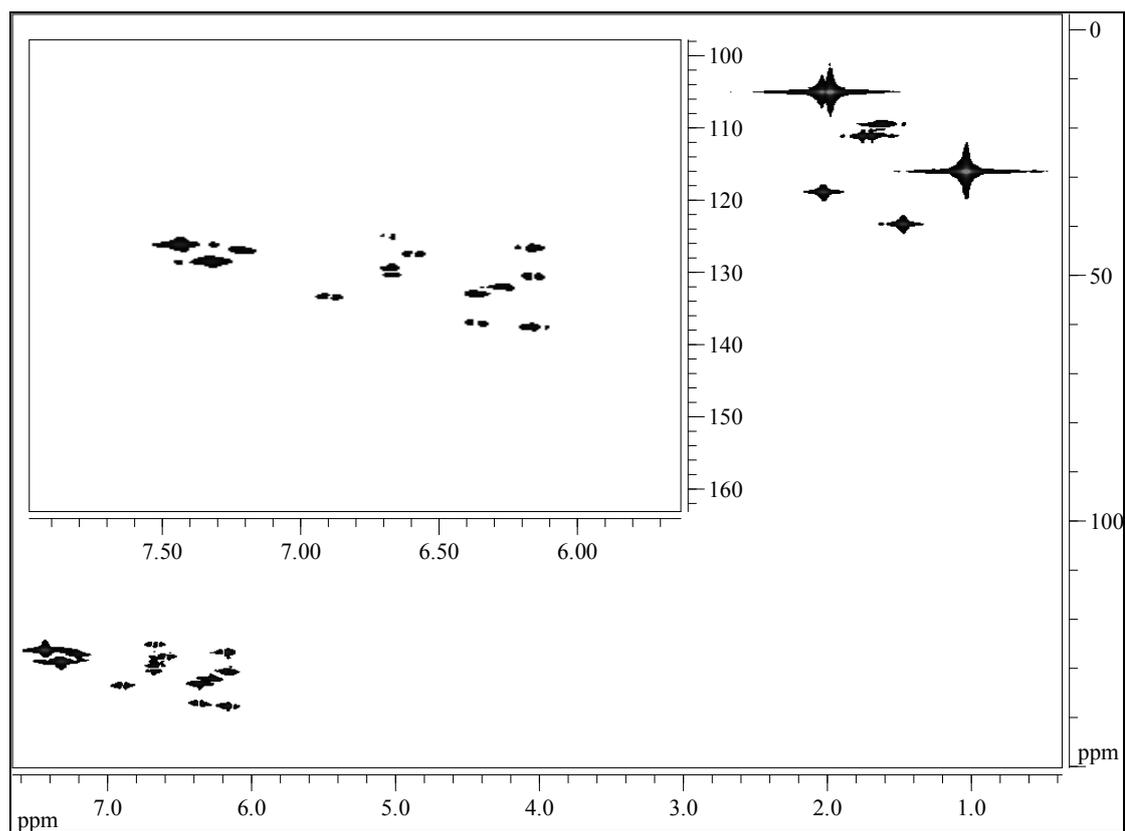


Abb. 65: HMQC (CDCl_3) von **X104**, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 298\text{ K}$

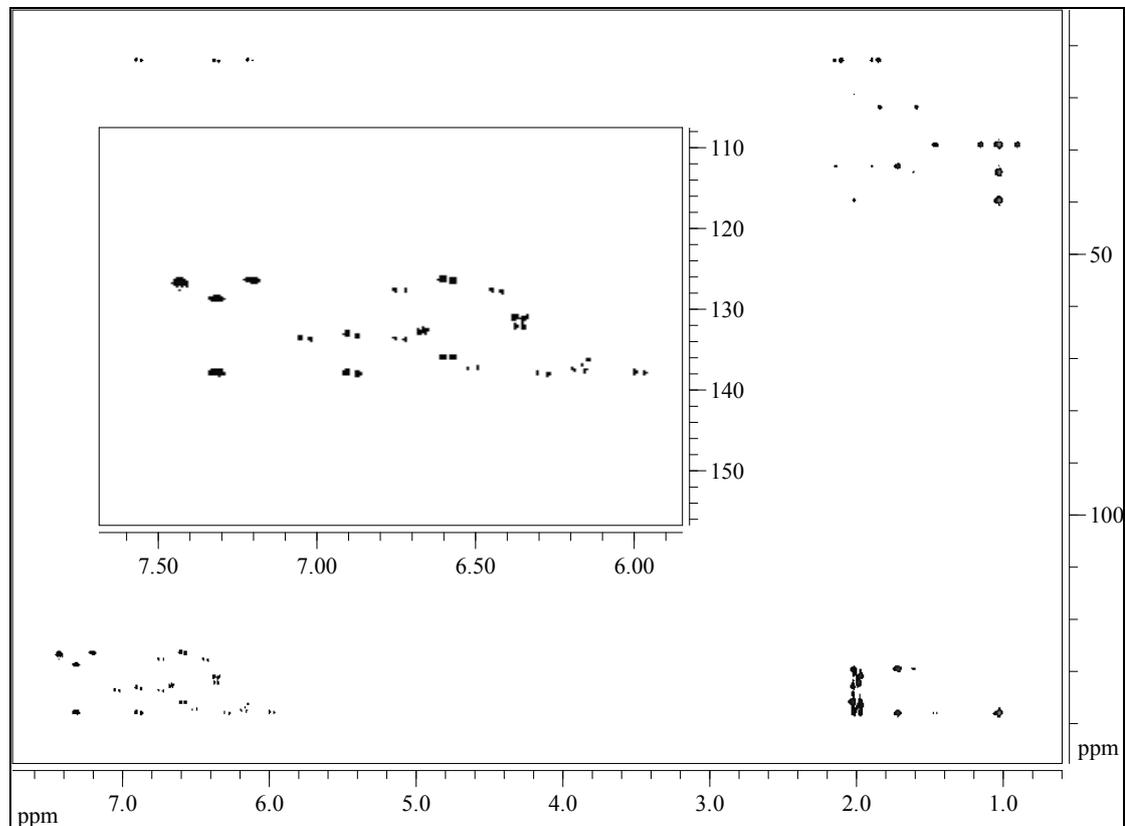
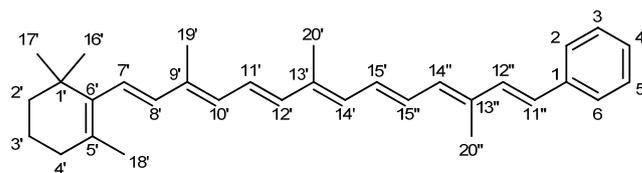


Abb. 66: HMBC (CDCl_3) von **X104**, ^1H (500 MHz) horizontal, ^{13}C (125 MHz) vertikal, $T = 298\text{ K}$

Abb. 67: Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale von **X104**Tab. 11: Zuordnung der NMR-Signale für Verbindung **X104**

δ_{H} / ppm	Mult.	Int. H	J_{HH} / Hz	δ_{C} / ppm	Zuordnung
1.04	s	6		28.98	16' & 17' CH ₃
1.45 - 1.49	m	2		39.65	2' CH ₂
1.59 - 1.65	m	2		19.27	3' CH ₂
1.73	s	3		21.77	18' CH ₃
1.98	s	3		12.77	19' CH ₃
2.00 - 2.04	m	2		33.12	4' CH ₂
1.99	s	3		12.84	20'' CH ₃
2.03	s	3		12.81	20' CH ₃
6.14	d	1	16.0	137.75	8' CH
6.16	d	1	11.0	130.78	10' CH
6.19	d	1	16.2	126.73	7' CH
6.27	d	1	10.0	132.22	14'' CH
6.36	d	1	10.0	133.10	14' CH
6.36	d	1	14.7	137.17	12' CH
6.59	d	1	16.0	127.60	11'' CH
6.65	dd	1	14.0, 10.0	129.73	15'' CH
6.67	dd	1	14.8, 11.0	125.19	11' CH
6.68	dd	1	14.0, 10.0	130.37	15' CH
6.89	d	1	15.9	133.54	12'' CH
7.21	tt	1	7.3, 1.3	127.18	4 CH
7.32	td	2	7.6, 1.3	128.63	3 & 5 CH
7.43	dt	2	7.4, 1.3	126.32	2 & 6 CH

Tab. 12: Zuordnung der quartären Kohlenstoffsignale von **X104**

δ_{H} / ppm	Mult.	Int. H	J_{HH} / Hz	δ_{C} / ppm	Zuordnung
				34.28	1' C
				129.40	5' C
				135.72	13'' C
				136.13	13' C
				136.74	9' C
				137.78	1 C
				137.91	6' C

In den überlagerten UV-VIS-Spektren kann man die Beiträge der Subchromophore **X102** und **X104** zur Absorption des Carotenyflavonoids **X46** erkennen. Das Absorptionsspektrum der Carotinoide wird durch den zusätzlichen Flavonoid-Chromophor bis in den UV-Bereich erweitert (*Abb. 68*).

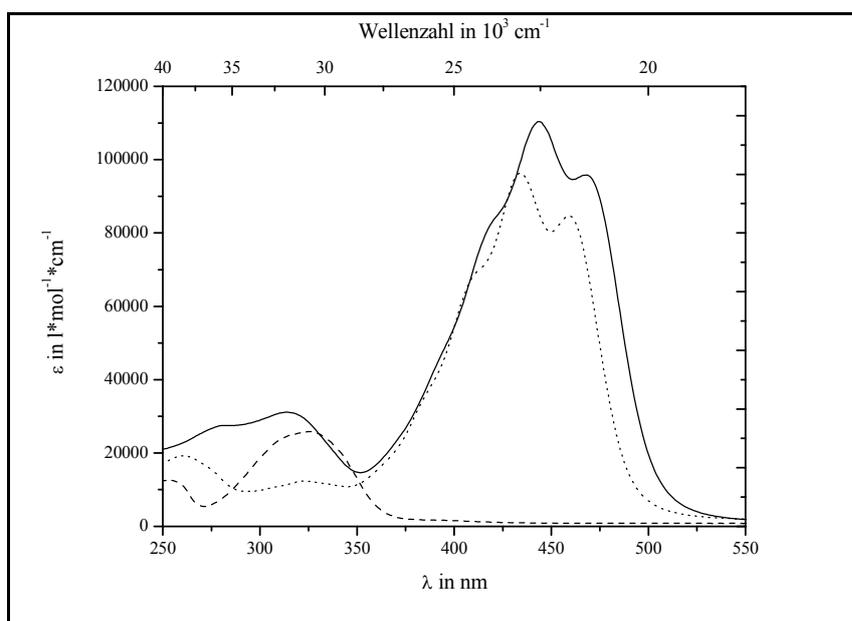


Abb. 68: Überlagerte UV-VIS-Spektren der Verbindung **X46** (—, CH_2Cl_2) und der beiden Subchromophore **X102** (---, MeOH) und **X104** (···, CH_2Cl_2)

2.4 Untersuchung zur Toxizität (Sulforhodamin B (SRB)-Assay)

2.4.1 Methode nach Skehan et al.

Bevor Zellexperimente mit den Verbindungen durchgeführt werden sollten, wurde untersucht, inwieweit die Substanzen auf das Testsystem menschliche Hautfibroblasten toxische Effekte zeigen würden. Für die Messung der Toxizität der eingesetzten Verbindungen wurde der SRB-Assay in Anlehnung an Skehan et al. verwendet ^[41]. Hierbei handelt es sich um einen *in-vitro*-Toxizitätsstest, bei dem zelluläre Proteine in Abhängigkeit von dem pH-Wert reversibel an den Farbstoff Sulforhodamin B (**Abb. 69**) binden.

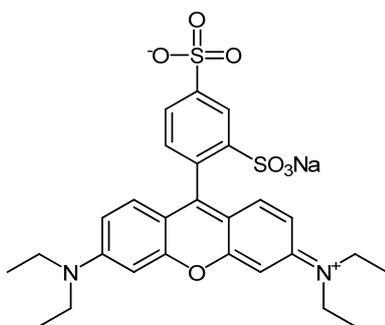


Abb. 69: Sulforhodamin B, Natriumsalz

Dazu wurden menschliche Hautfibroblasten bis zu ca. 80–90%iger Konfluenz kultiviert und 24 h mit den Substanzen inkubiert, bevor sie der SRB-Färbemethode unterzogen wurden. Um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erreichen, wurden 24-Well-Platten verwendet und der durch Basenzugabe gelöste Farbstoff anschließend für die photometrische Messung in 96-Well-Platten übergeführt.

2.4.2 Ergebnisse des SRB-Assays

Es wurden die Carotenylflavonoide **X27**, *cis/trans*-**X30** und **X46** sowie die das Flavon **X102**, das Phenylcarotinoid **X104** und der Naturstoff *all-trans*-(3*R*,3*R'*)-Zeaxanthin (**Abb. 70**) als Vergleichssubstanz für die Untersuchungen zur Zelltoxizität eingesetzt.

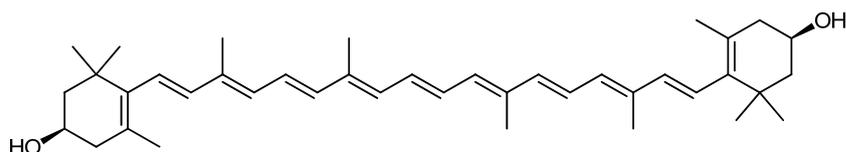


Abb. 70: (3R,3R')-Zeaxanthin

Es wurde die Zellviabilität, relativ zu dem verwendeten Lösemittel in gleicher Konzentration (0.1 % Tetrahydrofuran), für drei verschiedene Konzentrationen (1.5 μM , 5 μM und 10 μM) der Wirksubstanzen ermittelt. Die Versuche wurden für jede Substanz und Konzentration 12-mal durchgeführt.

Keine der eingesetzten Verbindungen hatte einen statistisch signifikanten negativen Einfluss auf die Lebendzellzahl der Fibroblasten nach 24 h, d.h. es konnten keine toxischen Effekte beobachtet werden. In einem Fall (1.5 μM **X102**) war eine geringe, aber statistisch signifikante (*) Erhöhung der Zellzahl zu beobachten (**Abb. 71**).

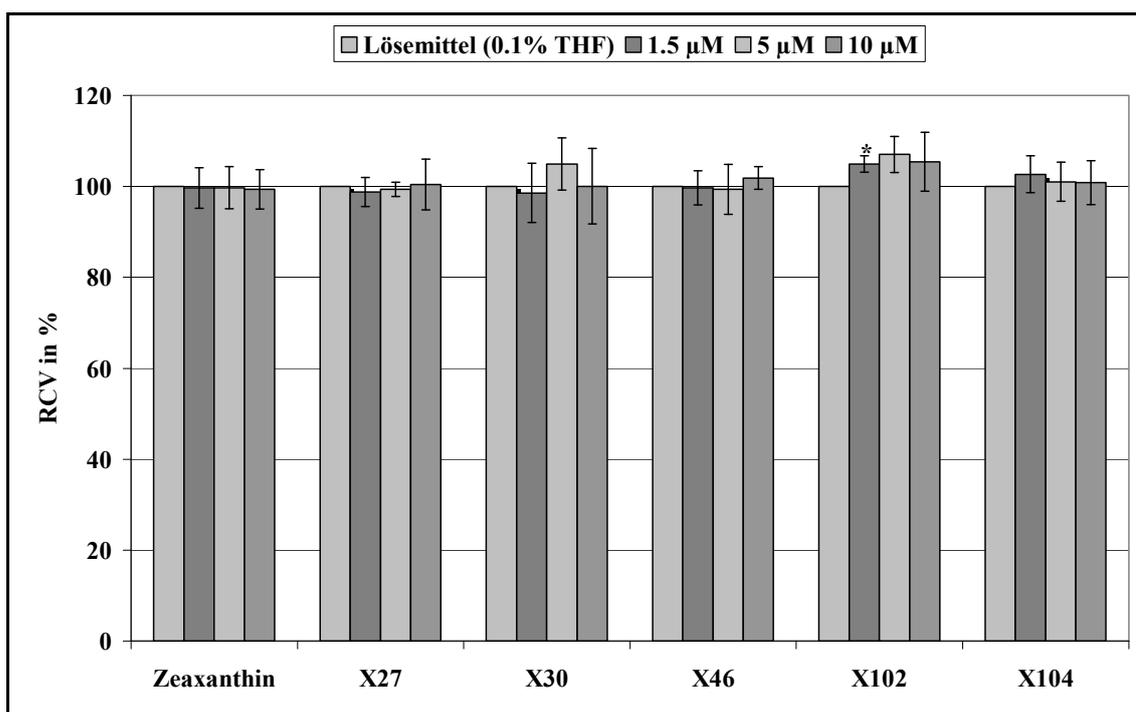


Abb. 71: Zellviabilität (RCV) 24 h nach Substanzinkubation relativ zur Lösemittelkontrolle (100 %)

2.4.3 Diskussion

Bis auf das 4'-Hydroxyflavon (**X102**) hat keine der verwendeten Substanzen einen Einfluss auf die Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation. **X102** verursacht in allen Konzentrationen einen geringen Anstieg (ca. 5 %) in der Lebendzellzahl, aber nur bei 1.5 μM mit statistischer Signifikanz. Dies könnte durch eine mögliche Wechselwirkung des **X102** mit Signalwegen in der Zelle und daraus resultierender Steigerung der Zellproliferation zusammenhängen. Flavonoide werden für eine Vielzahl von Funktionen auf zellulärer Ebene verantwortlich gemacht^[37] und beeinflussen, wie auch andere Klassen sekundärer Pflanzenstoffe, zelluläre Signalwege^[42]. Auch das 4'-Hydroxyflavon (**X102**) scheint einen Einfluss auf Signalwege zu haben. Es hemmt z.B. in Milzzellen von Mäusen die Sekretion des γ -Interferons (IFN- γ , ein körpereigenes immunstimulierendes Gewebehormon bzw. Zytokin), welches auch in Fibroblasten gebildet wird, bei einer Konzentration von 13.5 μM um 50 %^[43].

Da keine der Verbindungen in den untersuchten Konzentrationen toxische Effekte auf die menschlichen Hautfibroblasten gezeigt hat, wurden alle für weitere Untersuchungen verwendet.

2.5 Untersuchung zur Toxizität nach UVA Bestrahlung (UVA-SRB)

2.5.1 Methodik

Menschliche Hautfibroblasten wurden analog 2.4.1 bei 80 – 90%iger Konfluenz 24 h mit den Substanzen inkubiert und anschließend nach mehrmaligem Waschen mit 20 J/cm^2 UVA bestrahlt bzw. unter Lichtausschluss (0 J/cm^2 UVA) für die Dauer der Bestrahlung in der Sterilbank aufbewahrt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Lebendzellzahl mit Hilfe der SRB-Färbemethode bestimmt.

2.5.2 Ergebnisse des UVA-SRB

Eine Bestrahlung der nur mit Lösemittel (0.1 % THF) inkubierten Fibroblasten mit 20 J/cm^2 UVA resultiert in einer um ca. 20 % verringerten Lebendzellzahl im Vergleich zu der abgedunkelten Lösemittelkontrolle 24 h nach der Exposition. Die Inkubation mit den Carotenylflavonoiden **X27** und **X30** führt in keiner der verwendeten Konzentrationen und unabhängig von der Bestrahlung zu einem statistisch signifikant abweichenden Ergebnis.

Bei einer Dosis von 20 J/cm^2 UVA sind in den Konzentrationen von $1.5 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$ **X102** keine signifikanten Unterschiede zur Lösemittelkontrolle vorhanden, in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ **X102** sinkt die Lebendzellzahl signifikant auf einen Wert von 65 % der unbestrahlten Lösemittelkontrolle.

Bei den Verbindungen **X46** bzw. **X104** ist in allen Konzentrationen eine statistisch signifikante Verringerung der Zellzahl (ca. 60 % für **X46** bzw. 50 % für **X104**) im Vergleich zur unbestrahlten Lösemittelkontrolle zu beobachten.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für den Naturstoff Zeaxanthin, bei dem in den Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ eine Lebendzellzahl von ca. 60 % zu verzeichnen ist.

Die Daten unter 20 J/cm^2 UVA-Einwirkung von sind in **Abb. 72** zusammengefasst.

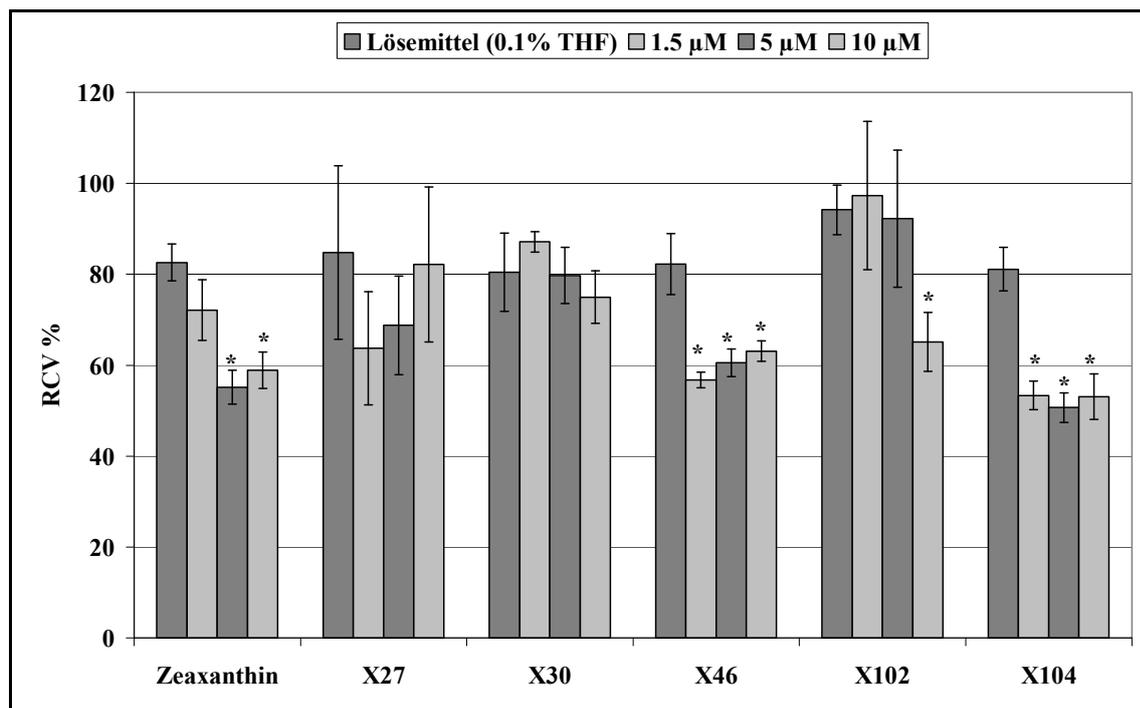


Abb. 72: Zellviabilität (RCV) nach 20 J/cm² UVA relativ zur unbestrahlten Lösemittelkontrolle (100 %),
* = signifikanter Unterschied zur bestrahlten Lösemittelkontrolle (0.1 % THF, 20 J/cm² UVA)

2.5.3 Diskussion

Keine der verwendeten Verbindungen konnte der UVA-induzierten Phototoxizität entgegenwirken. In der höchsten Konzentration des Flavons **X102**, den beiden höheren Konzentrationen von Zeaxanthin und allen Konzentrationen von **X46** und **X104** war sogar eine etwas höhere Toxizität als in der Lösemittelkontrolle zu beobachten. In diesen Fällen wird wahrscheinlich die Bildung reaktiver Photo-Abbauprodukte aufgrund nicht ausreichender Photostabilität der Substanzen eine bedeutende Rolle spielen. Eine mögliche Erklärung für die scheinbar höhere Photostabilität der Verbindungen **X27** und **X30** ist die Anknüpfung der Polyenkette in 4'-Position des Flavonoidbausteins. In der Polyenkette entstehende Radikale können durch eine erweiterte Konjugation bis hin zur Carbonylgruppe in 4-Position des Flavons stabilisiert werden. Im Fall des **X30** dürfte die kürzere Polyenkette zusätzlich eine erhöhte Photostabilität mit sich bringen.

2.6 Hämoxygenase-Induktion durch UVA (HMOX1-Assay)

2.6.1 Verwendete Methoden

Die UVA-induzierte Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) in menschlichen Hautfibroblasten wie auch die Einwirkung von Peroxiden führt zu einer gesteigerten Expression der Hämoxygenase-1 (HMOX1)^[3].

Damit ist die Induktion der Biosynthese der HMOX1 ein geeigneter Marker für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle. Die transkriptionelle Aktivierung der HMOX1 wird indirekt über die Proteinmenge des Enzyms HMOX1 in den Zellen bestimmt. Dafür werden die mit den Substanzen und durch UVA-Einwirkung vorbehandelten Zellen aufgeschlossen, die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, durch die Western-Blot Technik auf eine Membran übertragen und die zu untersuchenden Proteine durch immunologische Methoden nachgewiesen. Als zweites Protein neben der HMOX1 wird die Menge eines konstitutiv synthetisierten Enzyms, der Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH), als Proteinladekontrolle bestimmt.

2.6.2 Auswahlkriterien für die Verbindungen

Aufgrund des hohen Arbeits- und Zeitaufwandes für einen reproduzierbaren Nachweis (mindestens drei Versuche pro Substanz und Konzentration) der HMOX1-Induktion musste eine sorgfältige Auswahl der zu verwendenden Substanzen getroffen werden. Aus diesem Grund wurde das einzige phenolische Carotenylflavonoid **X46**, welches sich schon im Cumolhydroperoxid-Assay als überlegenes Antioxidans bewährt hat, ausgewählt. Um zu klären, welche strukturellen Merkmale für die Wirksamkeit dieser Verbindung verantwortlich gemacht werden können, wurden die beiden Untereinheiten des Carotenylflavonoids **X46**, das Flavon **X102** und das Phenylcarotinoid **X104** für weitere HMOX1-Assays verwendet (*Abb. 73*). Als Referenzverbindung aus der Gruppe der Naturstoffe war die Verwendung von dem schon in den Toxizitätsmessungen verwendeten Zeaxanthin geplant. Jedoch konnte bei der Verwendung von Zeaxanthin keine ausreichende Proteinmenge für einen Nachweis der HMOX1 erreicht werden.

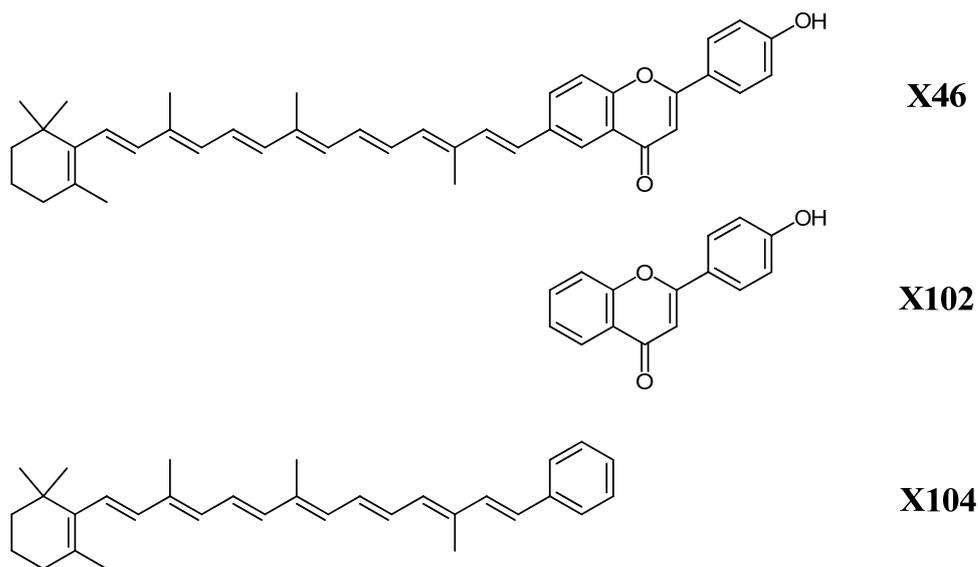


Abb. 73: Strukturen der im HMOX1-Assay verwendeten Antioxidantien

2.6.3 Ergebnisse

Durch Vorinkubation mit allen drei verwendeten Verbindungen konnte in den bestrahlten Zellen (20 J/cm^2 UVA) die Menge an HMOX1 im Vergleich zu der bestrahlten Lösemittelkontrolle vermindert werden. Dafür waren unterschiedlich hohe Konzentrationen nötig. Das Carotenylflavonoid **X46** und dessen polyenische Substruktur **X104** haben bereits in einer Konzentration von $1.5 \mu\text{M}$ die Menge der HMOX1 auf ca. 25 % bzw. 40 % der bestrahlten Lösemittelkontrolle senken können. Bei der Verwendung der Flavonoid-Substruktur **X102** war eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ nötig um die Menge der HMOX1 auf etwa 45 % der Lösemittelkontrolle zu senken. Statistisch signifikante Unterschiede zu der bestrahlten Lösemittelkontrolle sind durch einen Asterisk (*) gekennzeichnet (**Abb. 74**).

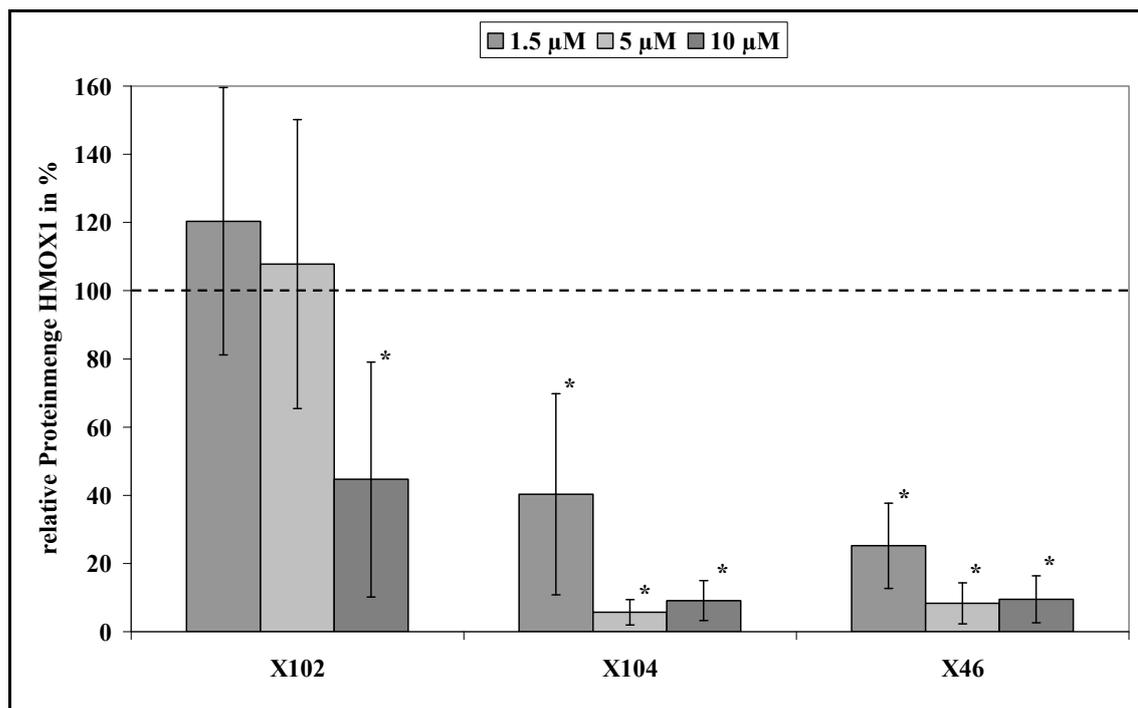


Abb. 74: Proteinmenge an HMOX1 nach 20 J/cm² UVA relativ zur bestrahlten Lösemittelkontrolle (---)

2.6.4 Diskussion

Die beiden Verbindungen mit einem polyenischen Strukturelement (**X46**, **X104**) haben bereits bei der geringsten Konzentration von 1.5 μM die Expression des Markers inhibieren können. Eine Wirkung durch die phenolische Struktur **X102** konnte erst in einer sechsfach höheren Konzentration beobachtet werden.

Singulett-Sauerstoff (¹O₂) kann primär für die durch UVA-Licht vermittelte Antwort in menschlichen Hautfibroblasten verantwortlich gemacht werden^[44] und wird durch die einzelnen Substrukturen in unterschiedlicher Art und Weise gelöscht.

Phenole, wie das Flavonoid **X102**, deaktivieren den durch UVA-Einwirkung generierten ¹O₂ verhältnismäßig langsam durch partiellen Charge-Transfer, indem sie nach der Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes die Wahrscheinlichkeit für ein ISC des ¹O₂ zum ³O₂ erhöhen^[22]. Polyene hingegen, wie die Verbindungen **X46** und **X104**, können durch ihre sehr langwellige Absorption ($E(S) = 21.4 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ für **X46** und $21.8 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ für **X104**, beide in CH₂Cl₂) und der damit sehr tief liegenden Triplettenergie (**Abb. 75**), ähnlich wie das β-Carotin ($E(S) = 21.7 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ in CHCl₃), mit hoher Effizienz schädlichen ¹O₂ annähernd diffusionskontrolliert durch Energietransfer löschen^[45].

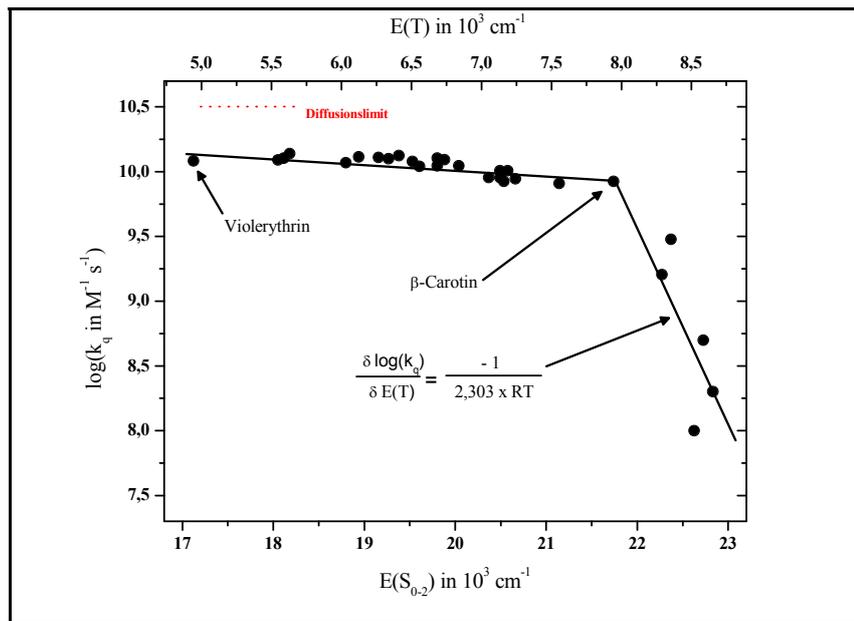
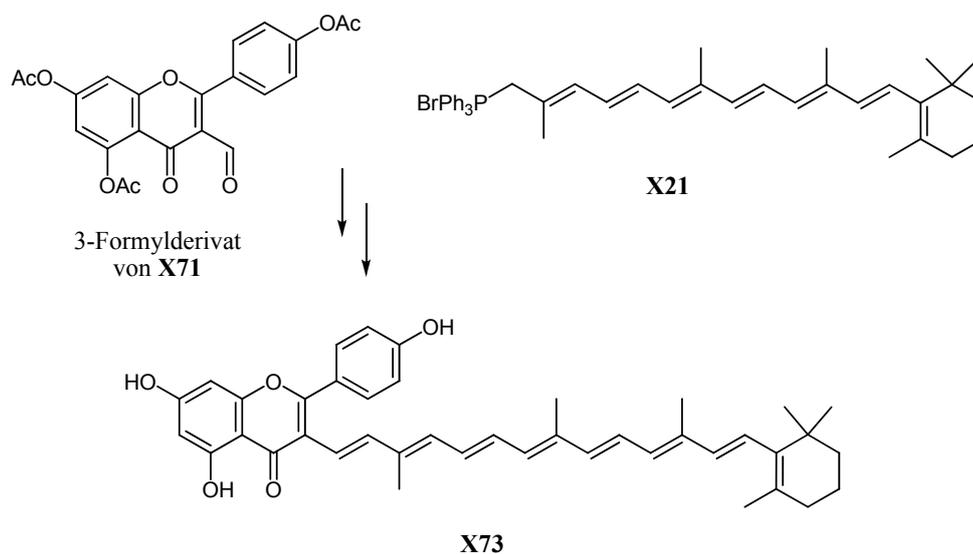


Abb. 75: Abhängigkeit der Löschkonstante (k_q) für die Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff durch einige Carotinoide von ihrer längstwelligen Absorption $[E(S_{0,2})]^{[45]}$

Darüber hinaus kann die bei schon deutlich niedriger liegenden Konzentrationen einsetzende Wirksamkeit der Verbindungen **X46** und **X104** durch ihre höhere Lipophilie, und die daraus resultierende wahrscheinlichere Assoziation bzw. Integration der Moleküle an oder in die Zellmembranen hinein, erklärt werden.

2.7 Diskussion der Ergebnisse

Bis auf das 3-(11'-Apo- β -carotiny)-5,7,4'-trihydroxyflavon (**X73**) konnten die angestrebten Verbindungen in ausreichender Menge und Reinheit dargestellt und umfassend charakterisiert werden. Eine Synthese des **X73** in ausreichender Menge wäre durch die Nutzung basenstabiler Schutzgruppen oder durch die Verwendung eines meist reaktiveren Phosphonats anstelle des Phosphoniumsalzes denkbar. Auch sollte die Darstellung durch die Umkehrung der Polarität der beiden Reaktionspartner grundsätzlich möglich sein. Dafür könnte ein aus dem 3-Brommethylflavonoid **X71** synthetisiertes 3-Formylderivat mit dem C₂₅-P-Salz **X21** zur Reaktion gebracht werden (**Abb. 76**).



*Abb. 76: Alternative Syntheseroute für das 3-(11'-Apo- β -carotiny)-5,7,4'-trihydroxyflavon (**X73**)*

Für alle an den menschlichen Fibroblasten getesteten Verbindungen konnte reproduzierbar eine substanzeigene Zelltoxizität bis zu einer Konzentration von 10 μ M ausgeschlossen werden.

Keine der verwendeten Substanzen konnte der photoinduzierten Toxizität bei 20 J/cm² UVA entgegenwirken. In einigen Fällen (Zeaxanthin, **X46**, **X102**, **X104**) war sogar eine leicht gesteigerte Toxizität unter UVA-Einwirkung zu beobachten. Dies resultiert wahrscheinlich aus der Bildung reaktiver Intermediate bei der Verwendung solch hoher

Strahlungsstromdichten aufgrund der nicht ausreichenden Photostabilität dieser Verbindungen.

Sowie in dem einfachen Cumolhydroperoxid-Assay^[27], als auch bei der Untersuchung im komplexen Gesamtzellsystem (HMOX1-Assay) war das Carotenylflavonoid **X46** in der antioxidativen Wirkung gegenüber seinen Untereinheiten überlegen. Im Cumolhydroperoxid-Assay waren die phenolischen Untereinheiten annähernd so effektiv wie Verbindung **X46** und die polyenischen deutlich weniger wirksam^[27]. Im HMOX1-Assay jedoch war die polyenische Untereinheit **X104** beinahe so wirksam wie **X46**, wobei eine sechsfach höhere Konzentration des Phenols **X102** nötig war, um einen Effekt zu erzielen.

Dies kann durch die unterschiedlichen antioxidativen Wirkmechanismen der beiden Verbindungsklassen erklärt werden. Phenole sind die effektiveren Löscher (nahezu diffusionskontrolliert, $\log(k_q \text{ in } \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}) = 9.3 - 9.8$ für die Reaktion mit $\cdot\text{OH}$ ^[26]) von freien Radikalen, die im Cumolhydroperoxid-Assay generiert werden, wobei die polyenischen Verbindungen **X46** und **X104** durch ihre tief liegenden Triplettenergie mit hoher Effizienz $^1\text{O}_2$ durch Energietransfer desaktivieren^[45].

Die Lipophilie bzw. Amphiphilie der polyenischen Substanzen (**X104** bzw. **X46**) dürfte zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Assoziation bzw. Integration an bzw. in die Zellmembranen führen, und somit in einer gesteigerten Wirksamkeit der Antioxidantien bei geringeren Konzentrationen resultieren.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden naturstoffverwandte Carotenylflavonoide (Hybridmoleküle aus Carotinoiden und Flavonoiden) und deren Subchromophore in ausreichender Menge und hoher Reinheit dargestellt (**Abb. 77**).

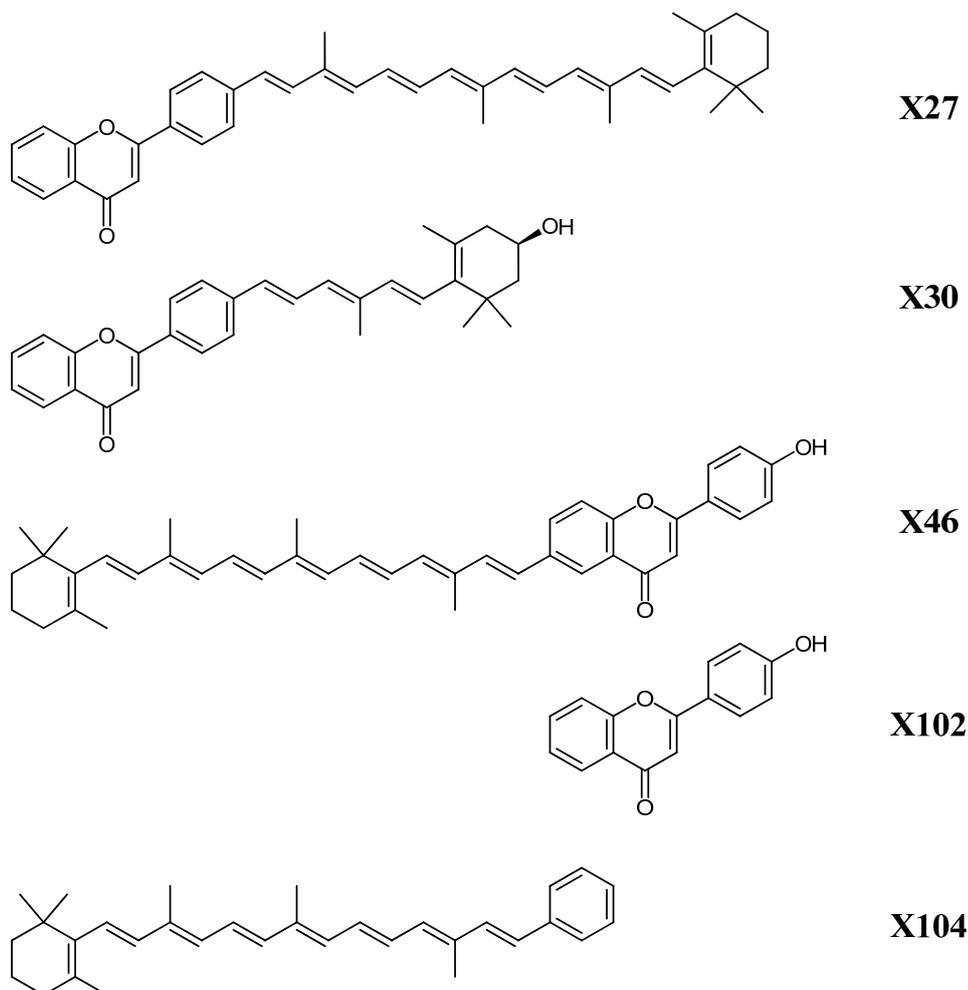


Abb. 77: Im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Carotenylflavonoide und Untereinheiten

Die dargestellten Verbindungen wurden umfassend durch ein- und zweidimensionale NMR-Methoden, Absorptionsspektroskopie im UV-, VIS- und IR-Bereich, Massenspektrometrie und Schmelzpunktanalysen charakterisiert. Weiterhin wurde die Identität nicht literaturbekannter Verbindungen durch Elementaranalysen bzw. Massenfeinbestimmungen bestätigt.

In Zellkultur konnte an humanen Hautfibroblasten eine substanz-eigene Toxizität bis zu einer Konzentration von 10 μM ausgeschlossen werden, der UVA-induzierten Phototoxizität konnte jedoch keine der eingesetzten Verbindungen entgegenwirken.

Im Gegensatz zum Toxizitätsassay unter UVA-Einwirkung hatten die Verbindungen einen Einfluss auf die durch photooxidative Prozesse induzierte Expression des Biomarkers Hämoxxygenase-1. Das Carotenylflavonoid **X46** und das Phenylcarotinoid **X104** zeigten bereits in der geringsten Konzentration von 1.5 μM eine deutliche Inhibition der Expression des Markers, was auf die Hemmung photooxidativer Prozesse, insbesondere der Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), zurückzuführen sein dürfte.

Das Absorptionsspektrum der Carotinoide konnte durch den zusätzlichen Flavonoid-Chromophor bis in den UV-Bereich erweitert werden, wodurch eine zusätzliche Schutzwirkung entsteht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ausgeprägte antioxidative Wirkung und der überlegene bifunktionelle Charakter dieser neuartigen, naturstoffverwandten Klasse von Antioxidantien auch in einem komplexen System wie in Kultur menschlicher Hautfibroblasten bestätigt. Es wurde gezeigt, dass die unterschiedlichen Strukturmerkmale dieser neuartigen Hybride auf verschiedene Art und Weise, und dadurch mit variabler Effizienz, Singulett-Sauerstoff bzw. reaktive Sauerstoffradikale desaktivieren.

Summary

In the present thesis natural product-related carotenylflavonoids (covalently linked carotenoid-flavonoid-hybrids) and their subchromophores were prepared in an adequate amount and in high purity (**Fig. 1**).

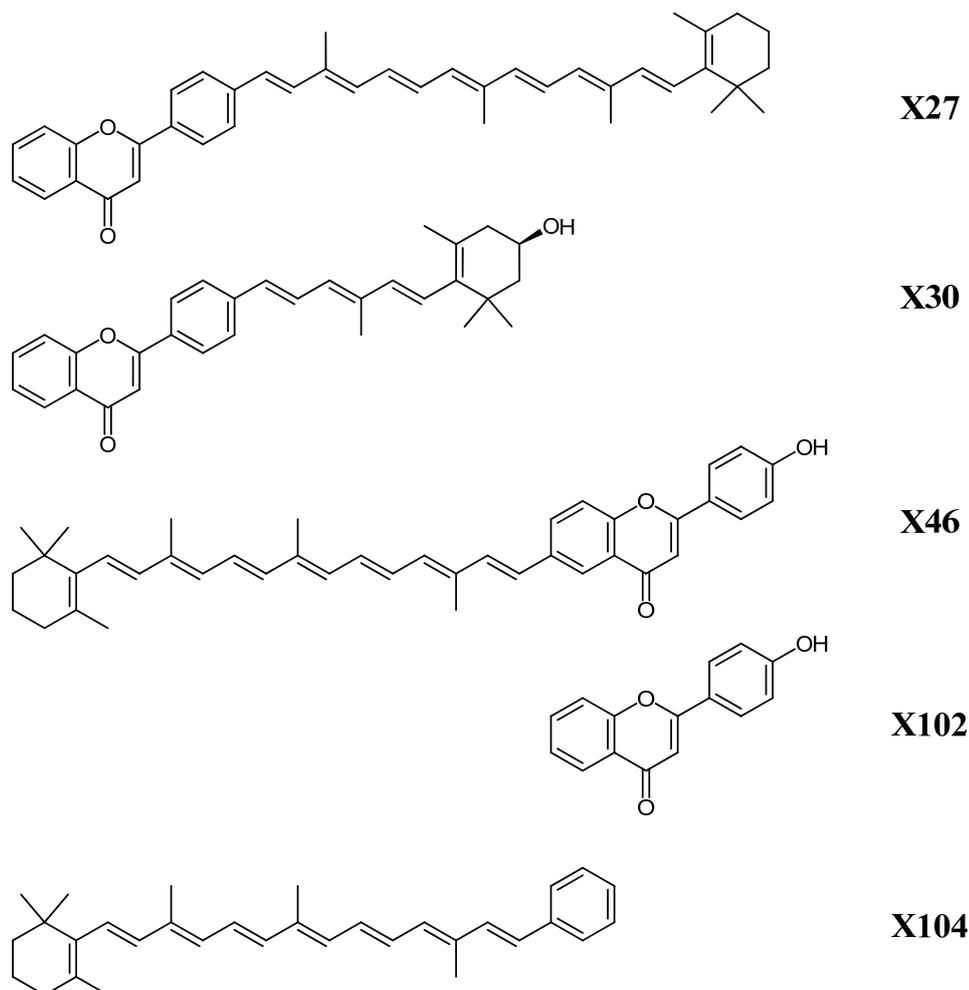


Fig. 1: In present work synthesised carotenylflavonoids and subunits

The compounds prepared in this work were characterised extensively by one- and two-dimensional NMR-methods, absorption-spectroscopy in the UV-, VIS- and IR-range, mass spectrometry and melting point analysis. Furthermore, the identity of new compounds was confirmed by combustion analysis or high-resolution mass spectrometry (HRMS), respectively.

In cultured human dermal fibroblasts an inherent toxicity of the substances up to a concentration of 10 μM was ruled out. However, none of the compounds counteracted UVA-induced photo-toxicity.

In contrast to the results from the toxicity-assay under UVA-exposure, compounds affected photooxidation-induced expression of the biomarker heme oxygenase-1. The carotenylflavonoid **X46** and the phenyl-carotenoid **X104** significantly decreased the expression of the marker already at a concentration of 1.5 μM . This may be due to inhibition of photo-oxidative processes, and is in particular caused by deactivation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$).

The absorption spectra of the parent carotenoids were extended to the UV-range adding the flavonoid-subchromophores. This results in an additional protection against UV-induced damage.

In the present work the outstanding antioxidative properties and dual-functional nature of these novel, natural product-related group of antioxidants was confirmed in a complex system as human dermal fibroblasts in cell-culture. The diverse modes of deactivating singlet oxygen or reactive oxygen-radicals, respectively, were shown to be accounted to the different structural characteristics of these novel hybrids.

4 Experimentalteil

4.1 Synthetische Experimente

4.1.1 Allgemeines

Die synthetisierten Verbindungen wurden, soweit möglich, nach der aktuell gültigen speziellen IUPAC-Carotinoid^[10]- bzw. Flavonoid^[14]- Nomenklatur benannt. Die zugehörigen Namen nach der generellen IUPAC-Nomenklatur werden im Substanzverzeichnis am Ende dieser Arbeit angegeben. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome entspricht den Lokanten für die Zuordnung der NMR-Signale und nicht der Nummerierung in der entsprechenden Nomenklatur. Die Diketone **X23**, **X40** und **X100** stehen mit den entsprechenden Enolformen im Tautomerengleichgewicht, in den NMR-Zuordnungen als **Keto** bzw. **Enol** bezeichnet (*Abb. 78*).

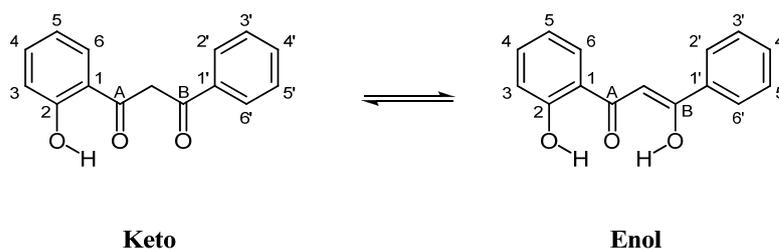


Abb. 78: Keto-Enol-Tautomerie des Grundgerüsts der Diketone X23, X40 und X100

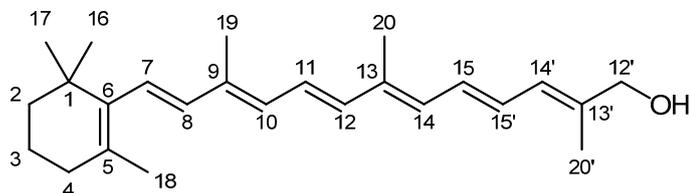
Folgende Geräte und Hilfsmittel wurden zur Darstellung, Charakterisierung und Messung der Verbindungen verwendet:

Massenfeinbestimmung	MPI für Kohlenforschung in Mülheim a. d. R.: Bruker APEX III (ESIpos, FTICR-MS) Finnigan MAT95 (EI)
Elementaranalysen:	Institut für Pharmazeutische Chemie, HHU Düsseldorf
UV/VIS-Spektroskopie	Perkin Elmer Lambda 19
Abkürzungen UV-VIS	sh = Schulter einer Absorptionsbande

¹ H-NMR-Spektroskopie	Bruker Advance DRX 500 (500 MHz) Bruker Advance DRX 200 (200 MHz)
Abkürzungen ¹ H-NMR	[s = Singlett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett vom Dublett usw., m = Multiplett, n.a. = nicht aufgelöst] $ N = ^3J^o + ^5J^p $ - Kopplung in [AB] ₂ -Systemen NMR _{xyz} = xyz MHz Messfrequenz
¹³ C- ¹ H-NMR-Spektroskopie	Bruker Advance DRX 500 (125 MHz)
³¹ P- ¹ H-NMR-Spektroskopie	Bruker Advance DRX 500 (202 MHz) Bruker Advance DRX 200 (81 MHz)
FT-IR-Spektroskopie	Bruker Vektor 22 (KBr-Presslinge) Thermo Nicolet 6700 FT-IR mit Thermo Smart Performer (Diamant, S-ATR, Golden Gate, Messung in Reinsubstanz)
Abkürzungen IR	s = starke, m = mittelstarke, w = schwache Absorption, Def. = Deformationschwingung, Val. = Valenzschwingung, oop = out of plane
Schmelzpunkte	Reichardt Thermovar (unkorrigiert)
Dünnschichtchromatographie	DC-Alufolien Kieselgel 60 mit UV-Indikator F254, Merck
Säulenchromatographie	Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm), Macherey-Nagel
Massenspektroskopie	Bruker Ultraflex TOF (Maldi) Finnigan Trace DSQ (GC/EI) Finnigan MAT 8200 (FAB, EI) Finnigan LC-DECA (ESI)
Mikrowellensynthese	CEM Discover
Lithiumethanolat-Lösung	694 mg Lithium (Merck) wurden unter Rühren und Eiskühlung zu 100 ml absolutem Ethanol (VWR) gegeben und unter Argon aufbewahrt (1 M)

4.1.2 Versuchsbeschreibungen

4.1.2.1 V1: 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (**X6**)



Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss werden 1.27 g (3.62 mmol) C_{25} -Aldehyd (**BASF2**) und 1.00 g (26.4 mmol) Natriumborhydrid (Merck, Feingranulat z. S.) in 150 ml absolutem Ethanol bei Raumtemperatur drei Stunden lang gerührt bis kein Aldehyd mehr vorhanden ist (DC-Kontrolle). Nach sehr vorsichtiger Neutralisation mit gesättigter Ammoniumchloridlösung wird zweimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert, mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel 60 mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Diethylether [DCM/Et₂O im Verhältnis 19:1 (DC: R_f = 0.23)] als Laufmittel chromatographiert. Es wird ein orangefarbener, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.15 g (3.26 mmol), $M(C_{25}H_{36}O) = 352.6 \text{ g/mol}$

90 % der Theorie (Lit.^[31]: 96 %)

Smp.: 59 °C

Lit.^[31]: nicht angegeben

¹H-NMR₅₀₀ ($T = 296 \text{ K}$, CDCl₃):

$\delta = 1.03$ (s, 6H, **16-**, **17-CH₃**), 1.44-1.49 (m, 2H, **2-CH₂**), 1.57-1.65 (m, 2H, **3-CH₂**), 1.71 (s, 3H, **18-CH₃**), 1.83 (s, 3H, **20'-CH₃**), 1.95 (s, 3H, **19-CH₃**), 1.97 (s, 3H, **20-CH₃**), 2.02 (m, 2H, **4-CH₂**), 4.11 (s, 2H, **12'-CH₂**), 6.12 (d, 1H, ³ $J = 16.0 \text{ Hz}$, **8-CH**), 6.14 (d, 1H, ³ $J = 11.0 \text{ Hz}$, **14'-CH**), 6.18 (d, 1H, ³ $J = 16.0 \text{ Hz}$, **7-CH**), 6.20 (d, 1H, ³ $J = 11.4 \text{ Hz}$, **10-CH**), 6.20 (d, 1H, ³ $J = 11.4 \text{ Hz}$, **14-CH**), 6.34 (d, 1H, ³ $J = 15.0 \text{ Hz}$, **12-CH**), 6.49 (dd, 1H, ³ $J = 11.0 \text{ \& } 11.4 \text{ Hz}$, **15'-CH**), 6.59 (dd, 1H, ³ $J = 11.4 \text{ \& } 14.4 \text{ Hz}$, **15-CH**), 6.64 (dd, 1H, ³ $J = 11.4 \text{ \& } 15.0 \text{ Hz}$, **11-CH**) ppm.

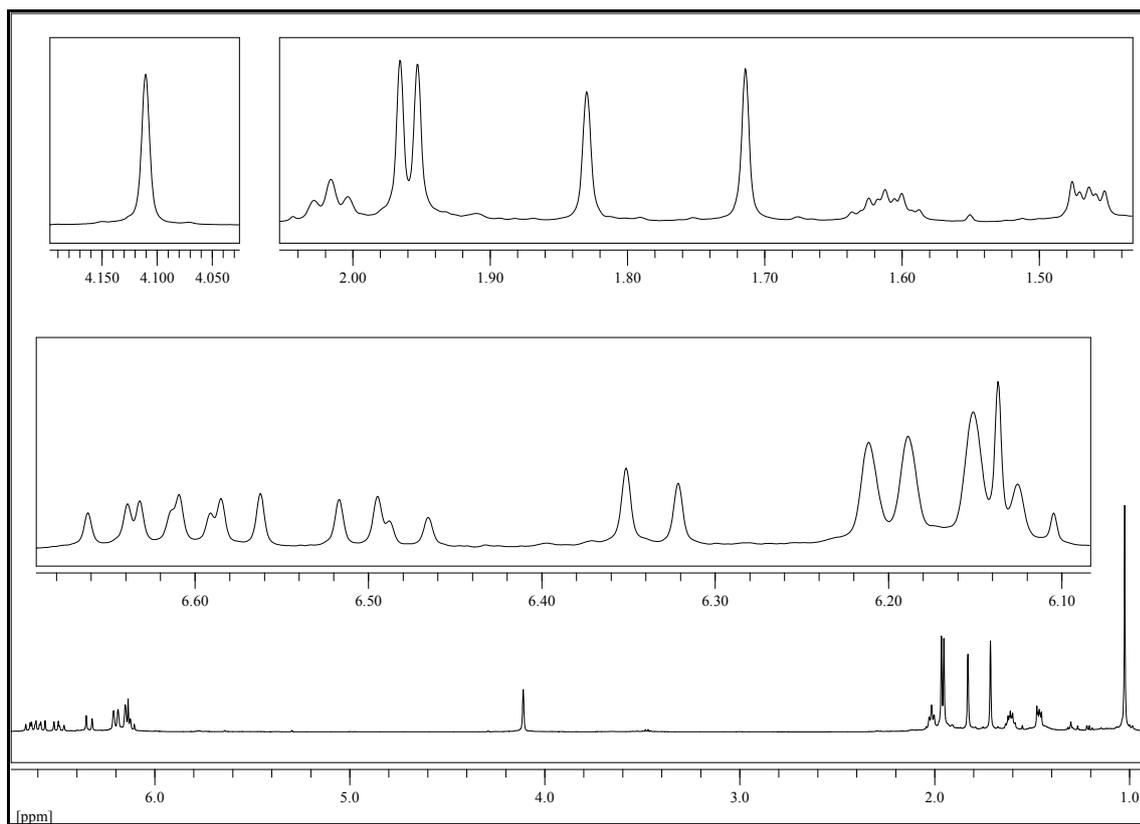


Abb. 79: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (X6), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR $_{125}$ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 12.75$ (20- CH_3), 12.77 (19- CH_3), 14.37 (20'- CH_3), 19.26 (3- CH_2), 21.76 (18- CH_3), 28.96 (2C, 16-, 17- CH_3), 33.09 (4- CH_2), 34.26 (1-C), 39.62 (2- CH_2), 68.56 (12'- CH_2), 124.94 (11- CH), 125.69 (10- CH), 126.61 (7- CH), 128.76 (15'- CH), 129.33 (5-C), 129.48 (15- CH), 130.68 (14'- CH), 131.13 (12- CH), 131.76 (14- CH), 135.94 (13'-C), 136.20 (9- CH), 137.67 (13-C), 137.74 (8- CH), 137.89 (6-C) ppm.

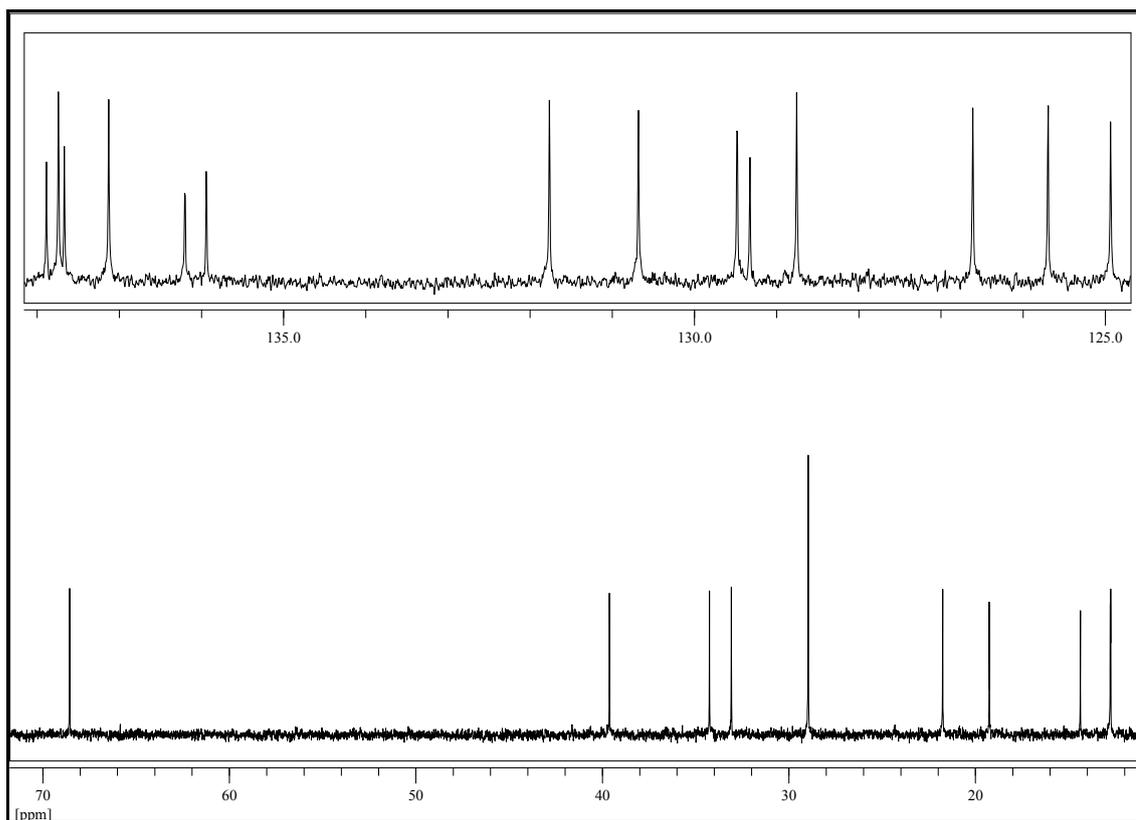


Abb. 80: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR $_{125}$ (CDCl_3) von 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (X6), $T = 296\text{ K}$

UV-VIS (Chloroform):

λ_{max} . ($\log \epsilon$) = 284 (3.69), 360 (sh), 381 (4.54), 400 (4.56) nm.

Lit.^[31]: λ_{max} (Aceton) = 351, 376, 391 nm.

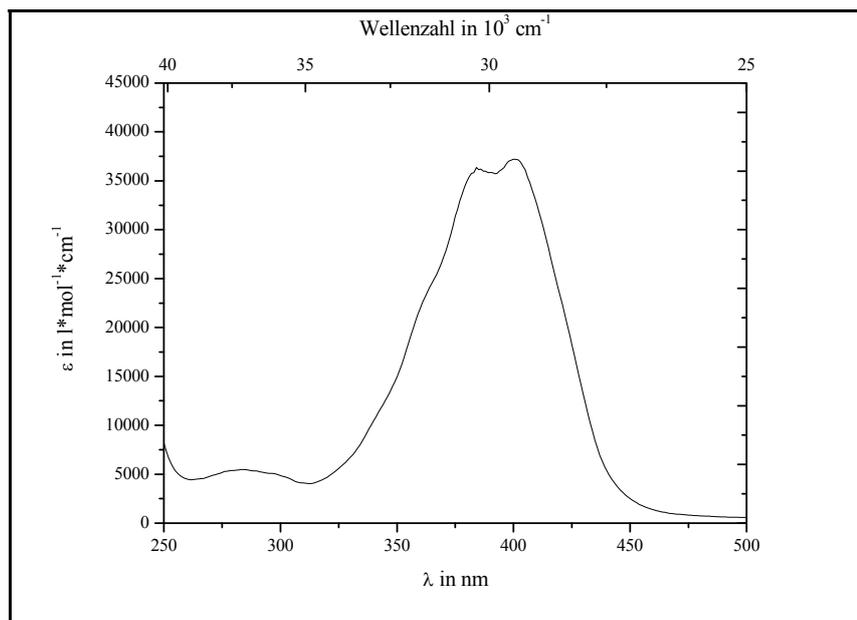


Abb. 81: UV-VIS-Spektrum (CHCl_3) von 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (X6)

IR (Golden Gate):

$\tilde{\nu}$ = 3398 (m, breit, OH-Val.), 3030 (w, C=C-H, CH-Val.), 2957, 2930, 2865 (m, m, m, CH_2/CH_3 -Val.), 1717 (m), 1671 (m, konjugierte C=C), 1447 (m, CH_2/CH_3 -Def.), 1368 (m, sym. CH_3 -Def.), 1260 (m, OH-Def.), 964 (s, C=C-H-Def., oop, all-trans), 730 (m, CH_2 -rocking Schwingung) cm^{-1} .

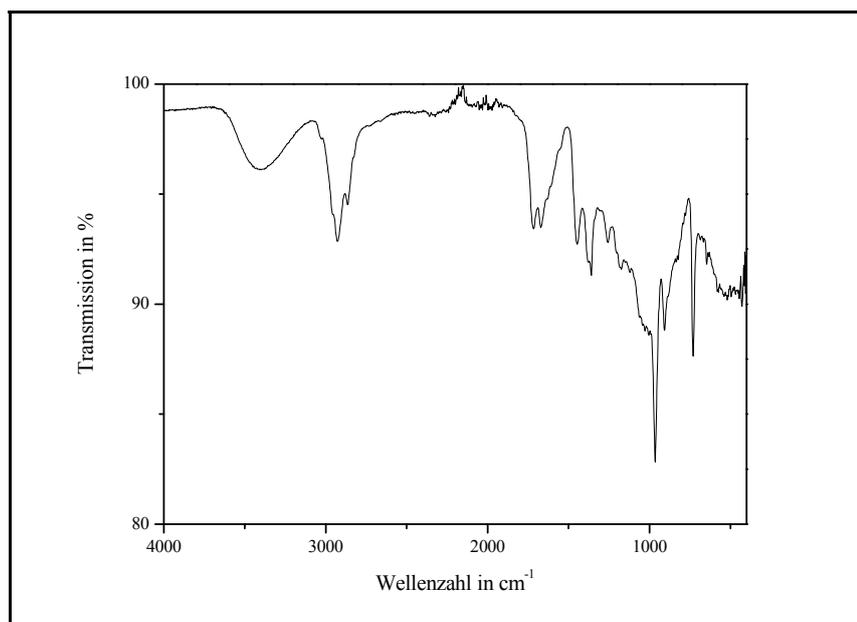


Abb. 82: IR-Spektrum (Golden Gate) von 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (X6)

Massenspektrum MALDI, DIT (CHCl₃):

m/z (%) = 352.1 (100) [M^+], 335.1 (35) [-OH].

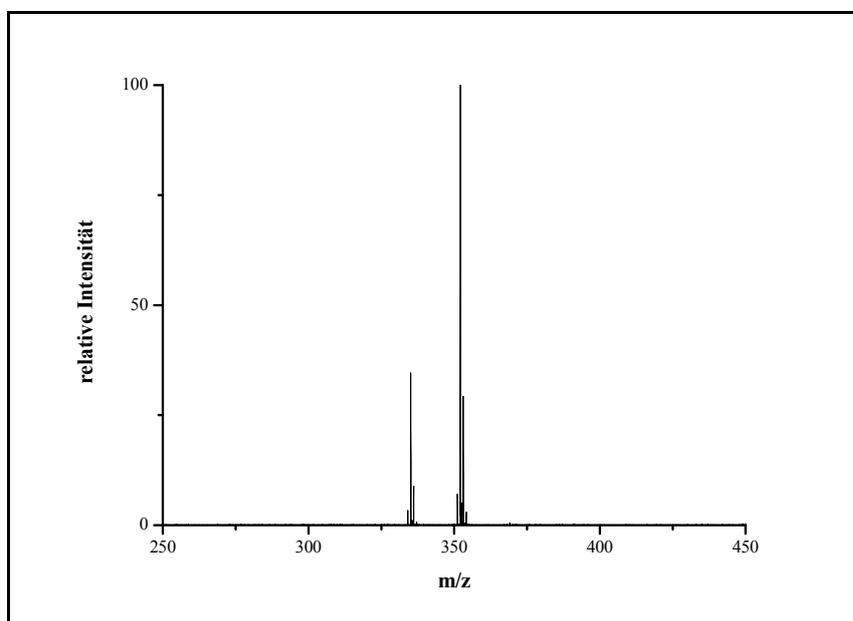
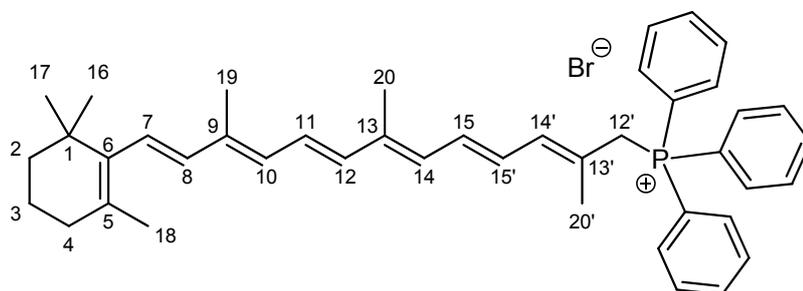


Abb. 83: MALDI-Spektrum von 12'-Apo- β -carotin-12'-ol (X6)

4.1.2.2 V2: 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (**X21**)

Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss werden 1.10 g (3.12 mmol) des Alkohols **X6** und 2.01 g (3.12 mmol) Triphenylphosphinhydrobromid in 75 ml Methanol bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Der Ansatz wird im Vakuum bis auf ca. 10 ml konzentriert, mit Wasser versetzt und zweimal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert, mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Aufreinigung wird das Rohprodukt in einer minimalen Menge Dichlormethan gelöst und langsam unter heftigem Rühren in 500 ml Diethylether eingetropft. Nach Filtration des Feststoffes wird die Prozedur wiederholt und es wird ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.15 g (3.26 mmol), $M(C_{43}H_{50}BrP) = 677.7 \text{ g/mol}$
 54 % der Theorie (Lit.^[31]: 72 % bei 90%iger Reinheit)
 Smp.: 111 °C Lit.^[31]: nicht angegeben

$^1\text{H-NMR}_{500} (T = 296 \text{ K}, \text{CDCl}_3)$:

$\delta = 0.98$ (s, 6H, **16- & 17-CH₃**), 1.39-1.47 (m, 2H, **2-H**), 1.54-1.62 (m, 2H, **3-H**), 1.57 (d, 3H, $^4J_{\text{H-P}} = 4.9 \text{ Hz}$, **20'-CH₃**) 1.67 (s, 3H, **18-CH₃**), 1.85 (s, 3H, **19- oder 20-CH₃**), 1.92 (s, 3H, **19- oder 20-CH₃**), 1.93-2.02 (m, 2H, **4-H**), 4.81 (d, 2H, $^2J_{\text{H-P}} = 15.8 \text{ Hz}$, **12'-CH₂**), 6.00-6.40 (m, 8H, **olefinische H**), 6.62 (dd, 1H, $^3J = 11.9 \text{ Hz}$, $^3J = 14.9 \text{ Hz}$, **11-CH**), 7.65-7.90 (m, 15H, **PPh₃**) ppm.

Resonanzen von restlichem Diethylether ($\delta = 1.21$ und 3.48 ppm) im Protonenspektrum wurden für eine bessere Übersichtlichkeit herausgeschnitten (**Abb. 84**).

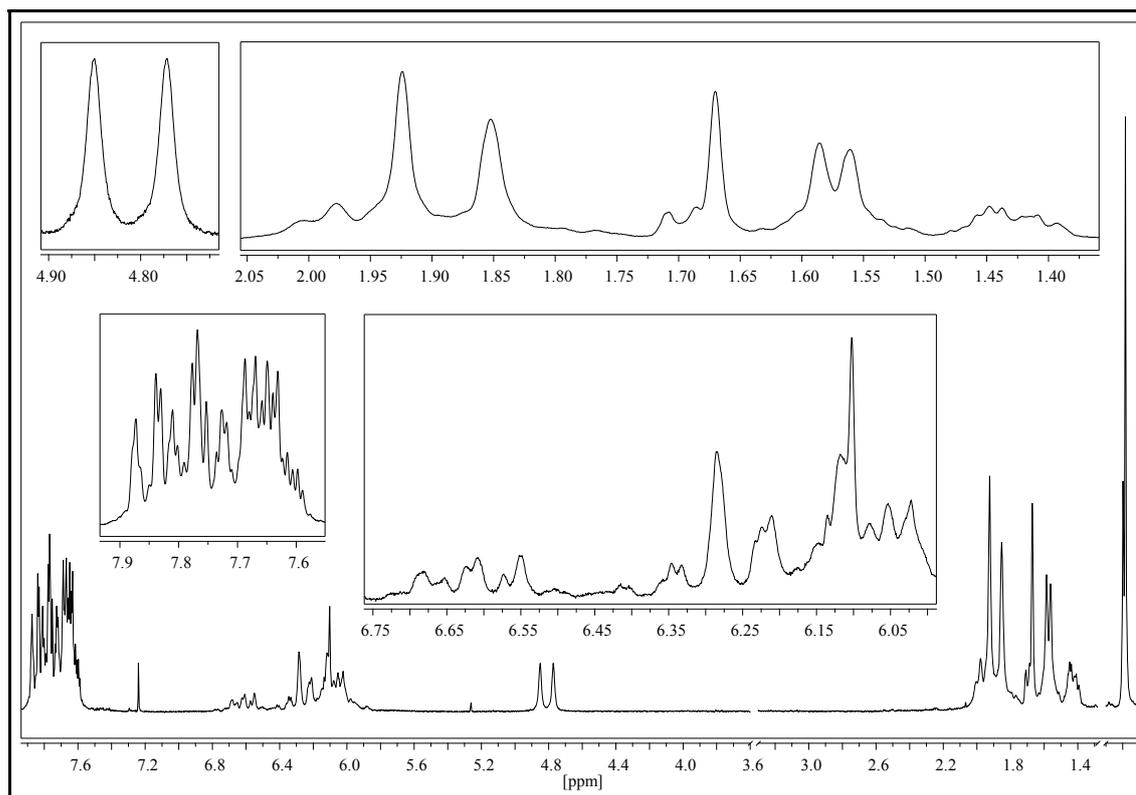


Abb. 84: $^1\text{H-NMR}_{200}$ (CDCl_3) von 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (**X21**),
 $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

(Signalstärke olefinischer und quartärer Kohlenstoffe zu gering!)

$\delta = 12.71$ (**19- oder 20-CH₃**), 12.81 (**19- oder 20-CH₃**), 19.20 (**3-CH₂**), 19.21 ($^3J_{\text{C-P}}$ n.a., **20'-CH₃**), 21.71 (**18-CH₃**), 28.92 (**2C, 16- & 17-CH₃**), 33.04 (**4-CH₂**), 34.96 ($^1J_{\text{C-P}} = 45.8\text{ Hz}$, **12'-CH₂**), 39.56 (**2-CH₂**), 118.41 ($^1J_{\text{C-P}} = 85.0\text{ Hz}$, **ipso-C, PPh₃**), 125.66 (**11-CH**), 130.18 , ($^3J_{\text{C-P}} = 12.4\text{ Hz}$, **meta-C, PPh₃**), 134.17 ($^2J_{\text{C-P}} = 9.8\text{ Hz}$, **ortho-C, PPh₃**), 134.89 ($^4J_{\text{C-P}} = 2.7\text{ Hz}$, **para-C, PPh₃**) ppm.

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₈₁ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 20.80\text{ ppm}$.

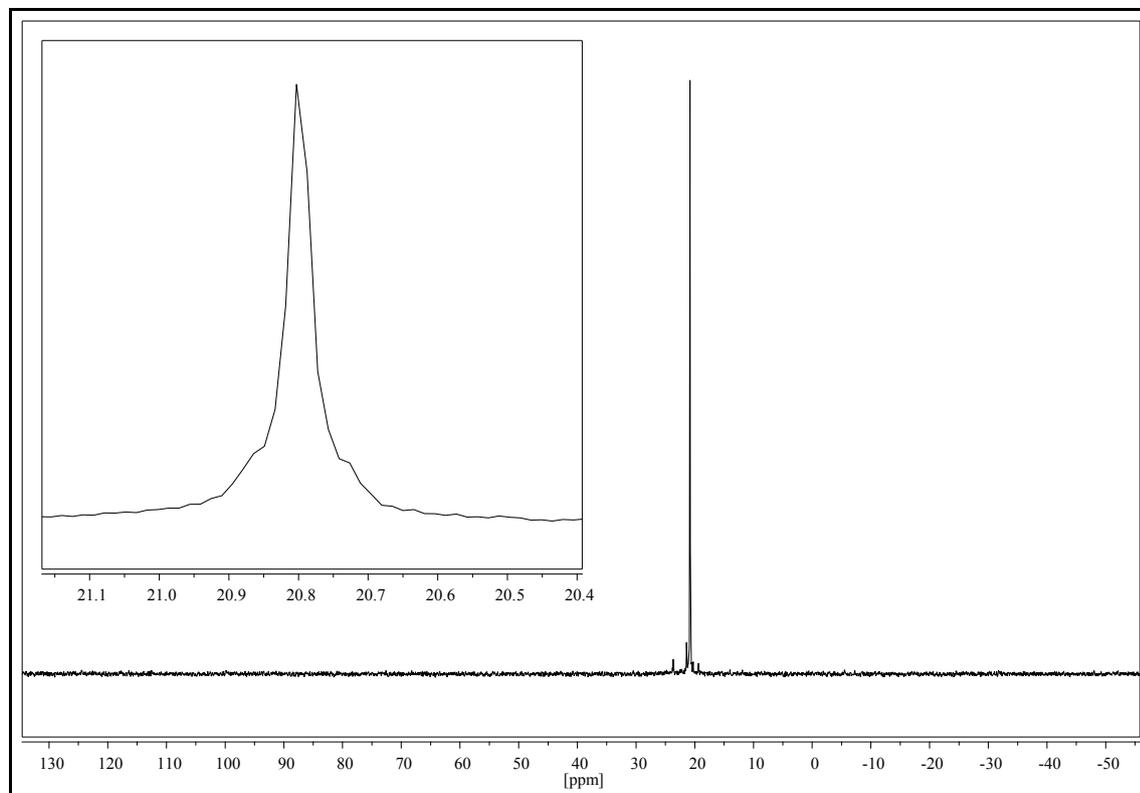


Abb. 85: $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₈₁ (CDCl_3) von 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (X21),
 $T = 296\text{ K}$

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\max.} (\log \epsilon) = 268 (4.13), 275 (4.13), 362 (\text{sh}), 386 (4.79), 401 (4.78) \text{ nm}.$

Lit.^[31]: $\lambda_{\max} (\text{Methanol}) = 270, 360, 385, 400 \text{ nm}.$

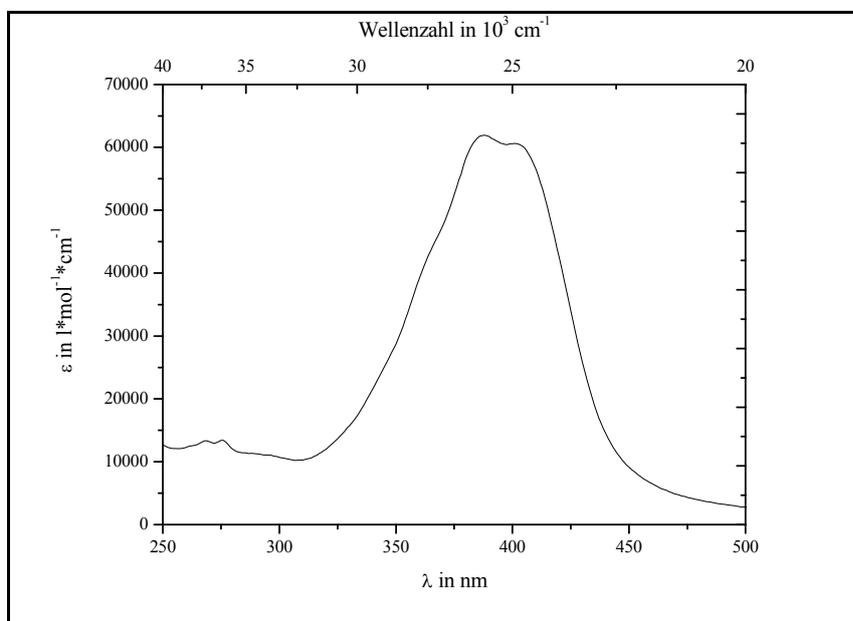


Abb. 86: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (X21)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3058$ (w, C=C-H, CH-Val.), 2960, 2927, 2863 (m, m, m, CH₂/CH₃-Val.), 1655 (m, konjugierte C=C), 1439 (s, Phenyl-P), 1386 (m, sym. CH₃-Def.), 1110 (s, aromat. C-P), 971 (s, C=C-H-Def., oop, all-trans), 720 (m, CH₂-rocking Schwingung) cm⁻¹.

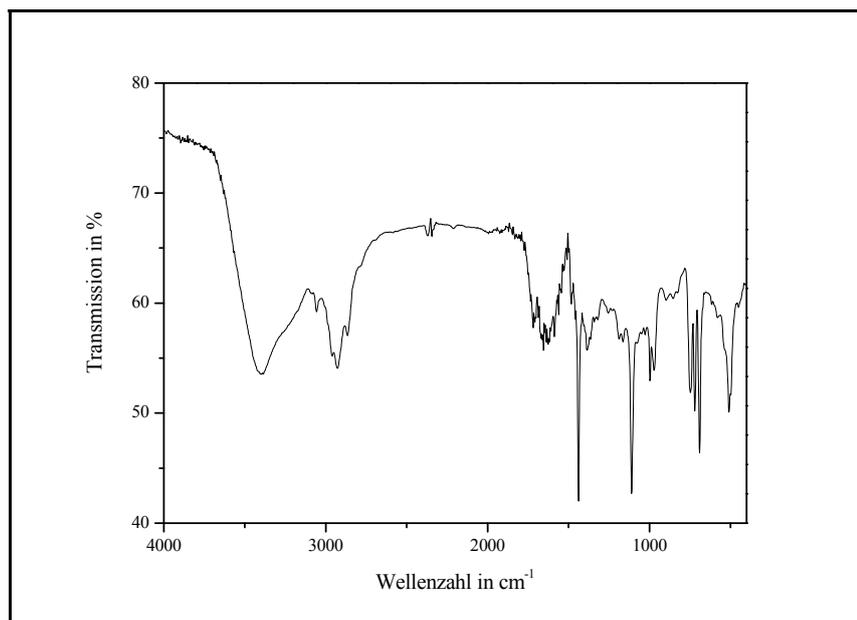


Abb. 87: IR-Spektrum (KBr) von 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (X21)

Massenspektrum MALDI (DIT, CHCl_3):

m/z (%) = 597.2 (100) [M^+], 613.3 (18.5) [$+\text{O}$], 629.2 (7.2) [$+2\text{O}$], 645.2 (4.0) [$+3\text{O}$].

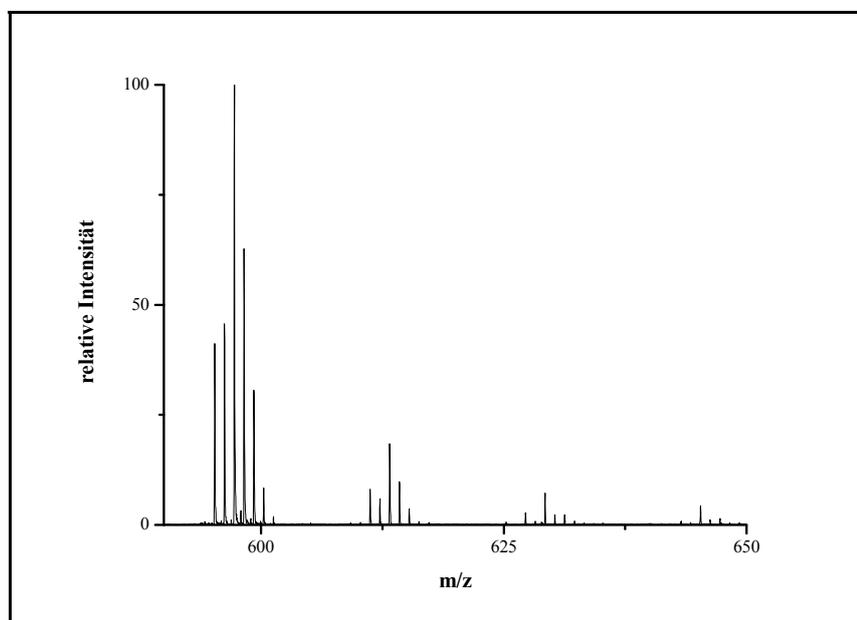
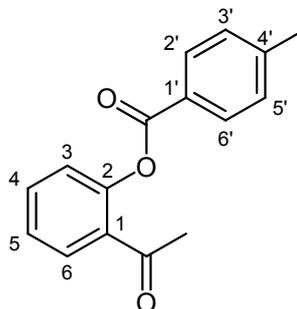


Abb. 88: MALDI-Spektrum (CHCl_3) von 12'-Apo- β -carotiny-12'-triphenylphosphonium-bromid (X21)

4.1.2.3 V3: (2-Acetylphenyl)-4-methylbenzoat (**X22**)

Unter Feuchtigkeitsausschluss werden 6.05 g (44.4 mmol) 2'-Hydroxyacetophenon (Merck, z.S.) und 10.3 g (66.5 mmol) *p*-Tolylsäurechlorid (Aldrich, 98 %) in 10 ml absolutem Pyridin bis zum Ende der Wärmeentwicklung (20 min) gerührt. Unter gutem Rühren wird die Mischung auf 300 ml verdünnte Salzsäure (3 %), welche 100 g Eis enthält, gegossen. Der ausgefallene Feststoff wird nacheinander mit etwas kaltem Methanol und Wasser gewaschen, bevor er im Exsiccator mit Orangegel getrocknet wird. Durch Umkristallisation aus Methanol erhält man einen voluminösen, farblosen Feststoff.

Ausbeute: 7.21 g (28.4 mmol), $M(C_{16}H_{14}O_3) = 254.3$ g/mol
64 % der Theorie

Smp.: 99 °C Lit.^[36]: 101 °C

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.46$ (s, 3H, **4'-CH₃**), 2.54 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 7.23 (dd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, 4J n.a., **4-H**), 7.33 (m, 2 H, $|N| = 8.1$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H**), 7.36 (ddd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 4J n.a., **3-H**), 7.58 (ddd, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, **6-H**), 7.86 (dd, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, **5-H**), 8.11 (m, 2 H, $|N| = 8.1$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H**) ppm.

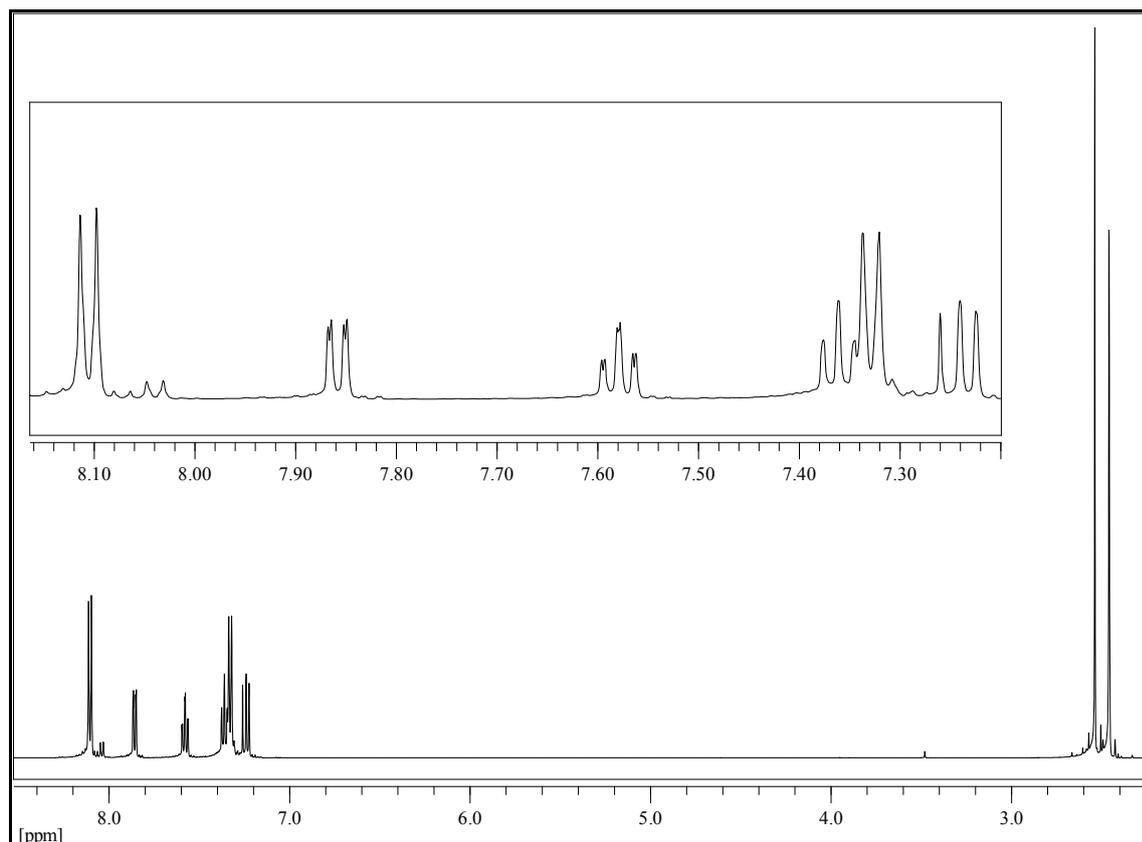


Abb. 89: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von (2-Acetylphenyl)-4-methylbenzoat (**X22**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 21.77$ (**4'-CH₃**), 29.90 (**Ac-CH₃**), 123.91 (**4-CH**), 126.06 (**3-CH**), 126.42 (**1'-C**), 129.42 (**3', 5'-CH**), 130.18 (**5-CH**), 130.34 (**2', 6'-CH**), 131.42 (**1-C**), 133.32 (**6-CH**), 144.76 (**4'-C**), 149.46 (**2-C**), 165.14 (**-COO**), 197.61 (**Ac-C=O**) ppm.

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3070, 2999$ (w, w, Aryl-H-Val.), 2920 (w, CH_3 -Val.), 1737 (s, Ester, C=O-Val.), 1685 (s, Arylketon, C=O-Val.), 1602 (m, aromat. C=C-Val.), 1451 (m, CH_3 -Def.), 1358 (m, sym. CH_3 -Def.), $1266, 1066$ (s, s, Ester, C-O-Val.), 826 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 739 (s, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm^{-1} .

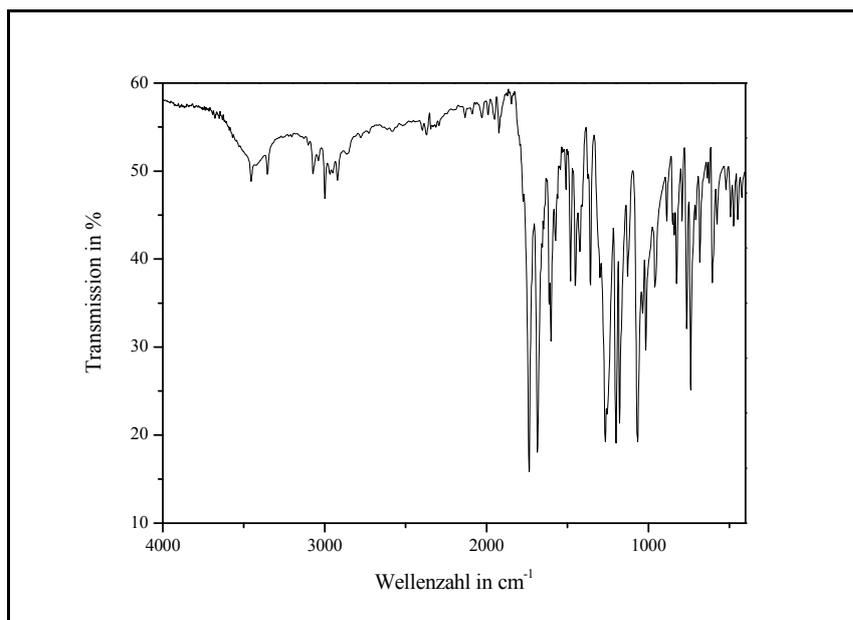
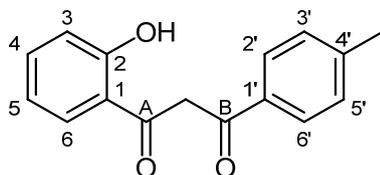


Abb. 90: IR-Spektrum (KBr) von (2-Acetylphenyl)-4-methylbenzoat (X22)

Massenspektrum (GC/MS(EI)):

m/z (%) = 254.0 (1.8) [M^+], 120.0 (11), 119.0 (100), 92.0 (3.7), 91.0 (30), 65.0 (10).

4.1.2.4 V4: 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-tolyl)propan-1,3-dion (**X23**)

6.74 g (26.5 mmol) **X22** werden in 50 ml absolutem Pyridin gelöst und auf 50 °C erwärmt. Zu der Lösung werden 2.20 g (39.2 mmol) heißes pulverisiertes Kaliumhydroxid gegeben und für zwei Stunden bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit 250 ml 10%iger Essigsäure versetzt. Der abfiltrierte Feststoff wird mit viel Wasser gewaschen, bevor er aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält feine gelbe Nadeln.

Ausbeute: 5.85 g (23.0 mmol), $M(C_{16}H_{14}O_3) = 254.3$ g/mol

87 % der Theorie

Smp.: 109 °C

Lit.^[36]: 109-110 °C

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.44$ (s, 3.45H, **4'-CH₃**), 4.61 (s, 0.3H, **CH₂, Keto**), 6.82 (s, 1H, **CH, Enol**), 6.92 (t, 1.15H, $^3J = 7.8$ Hz, **5-H, Keto & Enol**), 6.92 (dd, 0.15H, $^3J = 8.3$ Hz, 4J n.a., **3-H, Keto**), 7.00 (dd, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, 4J n.a., **3-H, Enol**), 7.29 (m, 2.3H, $|N| = 8.2$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H, Keto & Enol**), 7.46 (dt, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, 4J n.a., **4-H, Enol**), 7.49 (dt, 0.15H, $^3J = 7.8$ Hz, 4J n.a., **4-H, Keto**), 7.78 (dd, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, 4J n.a., **6-H, Enol**), 7.81 (dd, 0.15H, $^3J = 7.8$ Hz, 4J n.a., **6-H, Keto**), 7.84 (m, 2H, $|N| = 8.1$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H, Enol**), 7.91 (m, 0.3H, $|N| = 8.1$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H, Keto**), 11.97 (s, 0.15H, **2-OH, Keto**), 12.14 (s, 1H, **2-OH, Enol**), 15.62 (s, 1H, **Enol-OH**) ppm.

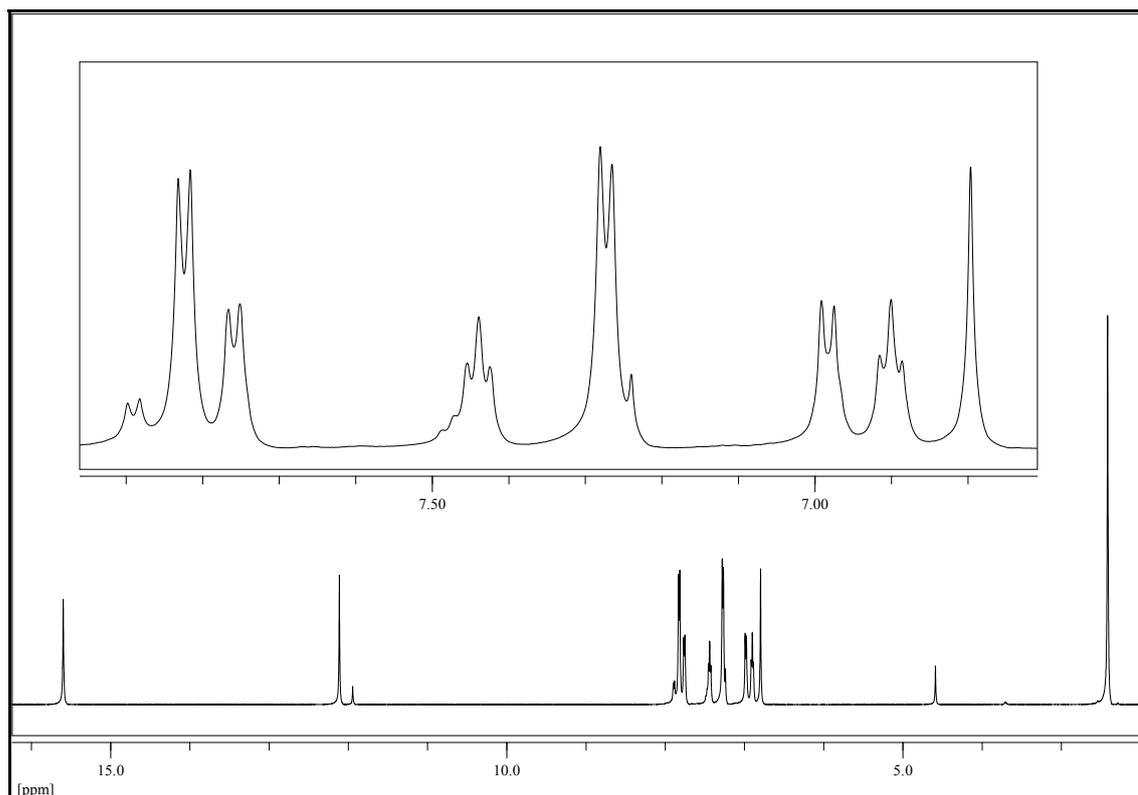


Abb. 91: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-tolyl)propan-1,3-dion (**X23**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 21.63$ (1C, **4'-CH₃, Enol**), 21.71 (0.15C, **4'-CH₃, Keto**), 49.95 (0.15H, **CH₂, Keto**), 91.71 (s, 1C, **CH, Enol**), 118.60 (0.2C, **3-CH, Keto**), 118.74 (1C, **3-CH, Enol**), 119.01 (1C, **5-C, Enol**), 119.01 (1C, **1-C, Enol**), 119.25 (0.15C, **5-CH, Keto**), 119.43 (0.15C, **1-C, Keto**), 126.82 (2.3C, **2', 6'-CH, Keto & Enol**), 128.43 (1C, **6-CH, Enol**), 128.91 (0.15C, **6-CH, Keto**), 129.50 (2C, **3', 5'-CH, Enol**), 129.55 (0.3C, **3', 5'-CH, Keto**), 130.73 (1C, **1'-C, Enol**), 130.93 (0.15C, **1'-C, Keto**), 135.64 (1C, **4-CH, Enol**), 136.99 (0.15C, **4-CH, Keto**), 143.29 (1C, **4'-C, Enol**), 145.01 (0.15C, **4'-C, Keto**), 162.37 (1C, **2-C, Enol**), 162.78 (0.15C, **2-C, Keto**), 177.78 (1C, **=C_B-OH, Enol**), 192.99 (0.15C, **C_B=O, Keto**), 195.36 (1C, **C_A=O, Enol**), 200.36 (0.15C, **C_A=O, Keto**) ppm.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3033 (w, Aryl-H-Val.), 2921 (w, CH₃-Val.), 1613 (s, arom. C=C-Val.), 1570 (s, C=O \cdots H), 1436 (m, CH₂/CH₃-Def.), 1336 (m, sym. CH₃-Def.), 800 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 743 (s, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

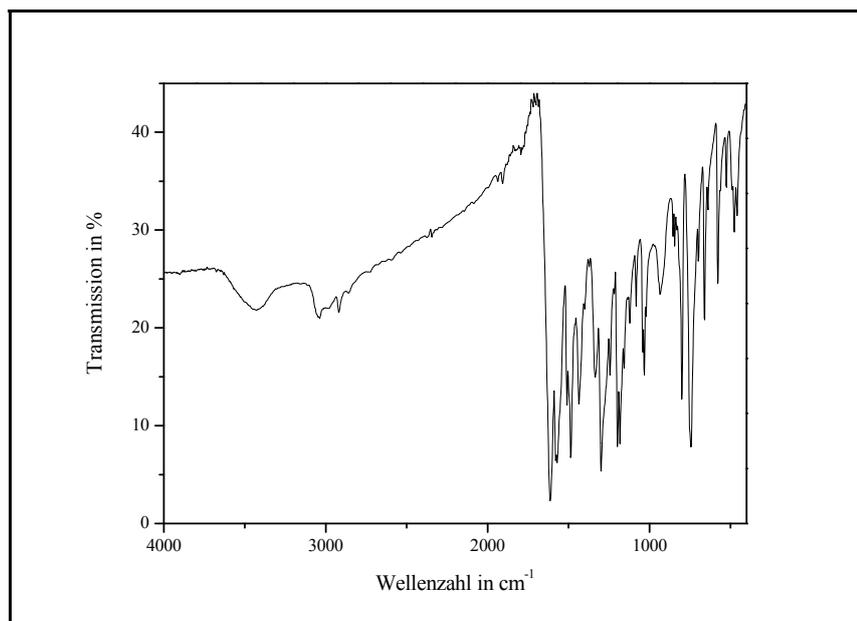
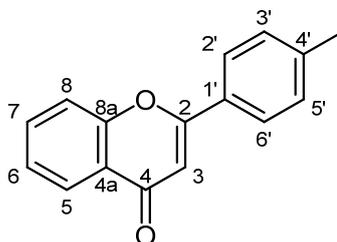


Abb. 92: IR-Spektrum (KBr) von 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-tolyl)propan-1,3-dion (**X23**)

Massenspektrum (GC/MS(EI)):

m/z (%) = 254.0 (24) [M^+], 121.0 (15), 120.0 (11), 119.0 (100), 92.0 (4.4), 91.1 (21), 65.0 (10).

4.1.2.5 V5: 4'-Methylflavon (**X24**)

5.35 g (21.0 mmol) **X23** werden in 65 ml Eisessig gelöst und mit 1.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und für eine Stunde unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wird unter heftigem Rühren auf ca. 200 g Eis gegeben. Das ausgefallene Flavon wird abfiltriert und mit viel Wasser (ca. 300 ml) säurefrei gewaschen bevor es aus 800 ml Leichtbenzin (60 – 80 °C) umkristallisiert wird. Man erhält beige Nadeln.

Ausbeute: 4.00 g (16.9 mmol), $M(C_{16}H_{12}O_2) = 236.3$ g/mol

81 % der Theorie

Smp.: 115 °C

Lit.^[36]: 116 °C

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 298$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.44$ (d, 3H, 4J n.a., **4'-CH₃**), 6.80 (s, 1H, **3-H**), 7.32 (m, 2H, $|N| = 8.1$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H**), 7.41 (ddd, 1H, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz, **6-H**), 7.56 (dd, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, 4J n.a., **8-H**), 7.69 (ddd, 1H, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, **7-H**), 7.82 (m, 2H, $|N| = 8.1$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H**), 8.23 (dd, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, **5-H**) ppm.

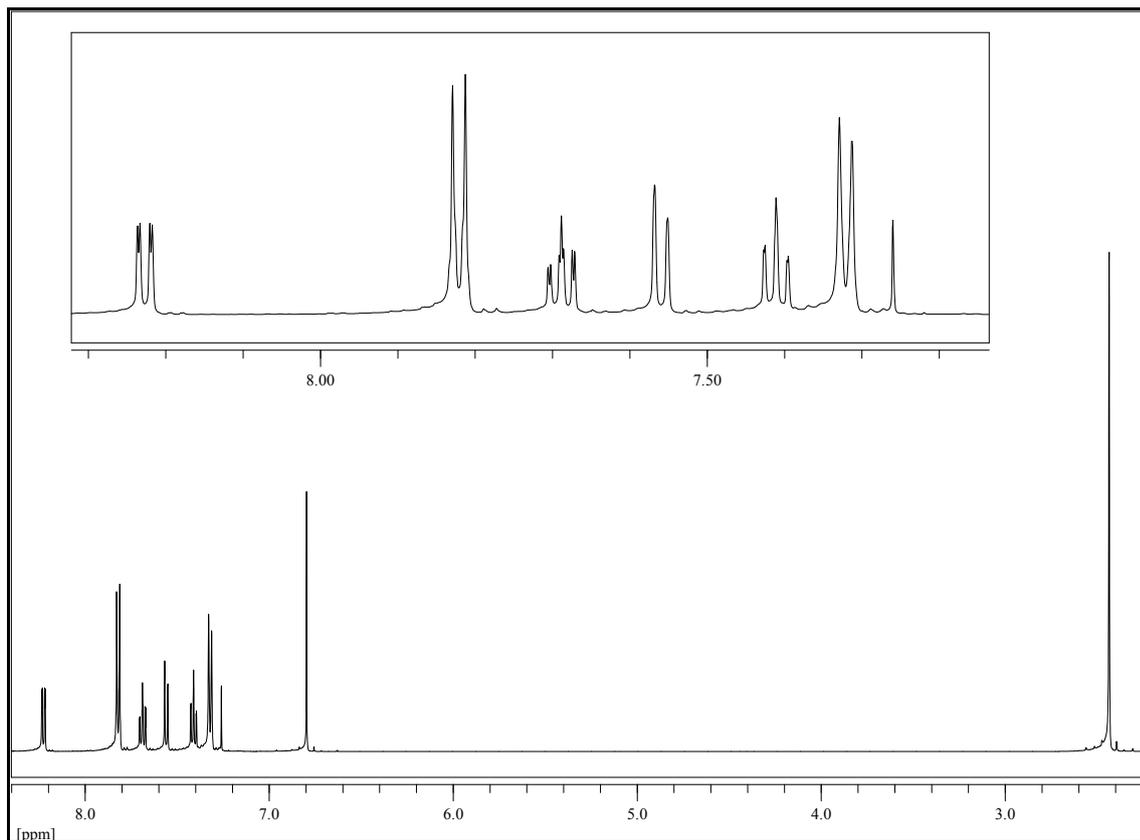


Abb. 93: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-Methylflavon (**X24**), $T = 298\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{125}$ ($T = 298\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 21.51$ (**4'-CH₃**), 106.95 (**3-CH**), 118.03 (**8-CH**), 123.96 (**4a-C**), 125.11 (**6-CH**), 125.65 (**5-CH**), 126.21 (**2C, 2', 6'-CH**), 128.93 (**1'-C**), 129.75 (**2C, 3', 5'-CH**), 133.63 (**7-CH**), 142.23 (**4'-C**), 156.22 (**8a-C**), 163.58 (**2-C**), 178.45 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Dichlormethan):

$\lambda_{\max.} (\log \varepsilon) = 251 (4.25), 298 (4.45) \text{ nm.}$

Lit.^[37]: $\lambda_{\max.} (\log \varepsilon, \text{Methanol}) = 303 (4.44) \text{ nm.}$

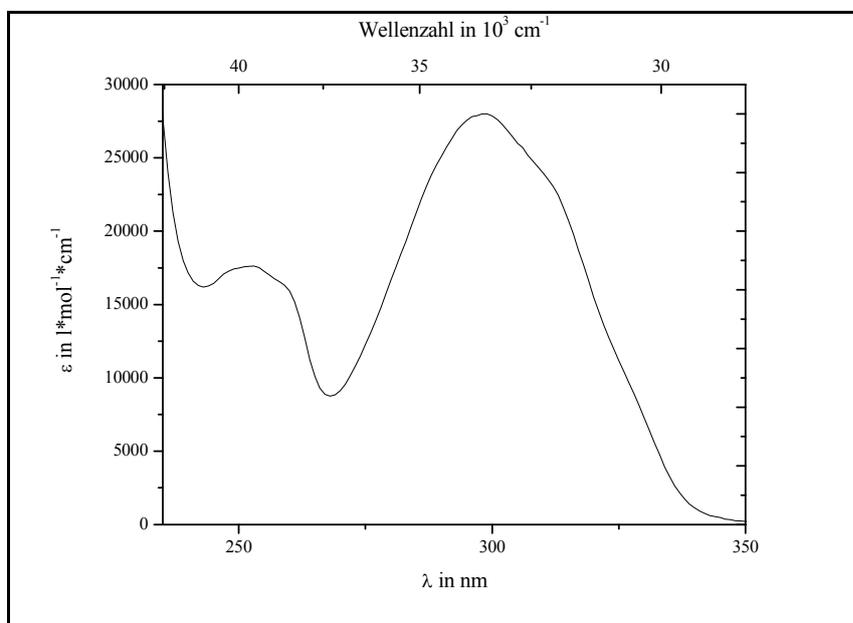


Abb. 94: UV-VIS-Spektrum (DCM) von 4'-Methylflavon (X24)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3068 (w, Aryl-H-Val.), 3024 (w, Aryl-H-Val.), 2917 (w, CH₃-Val.), 1637 (s, α,β -unges. Keton), 1605 (m, arom. C=C-Val.), 1465 (m, CH₃-Def.), 1371 (m, sym. CH₃-Def.), 817 (s, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 752 (s, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

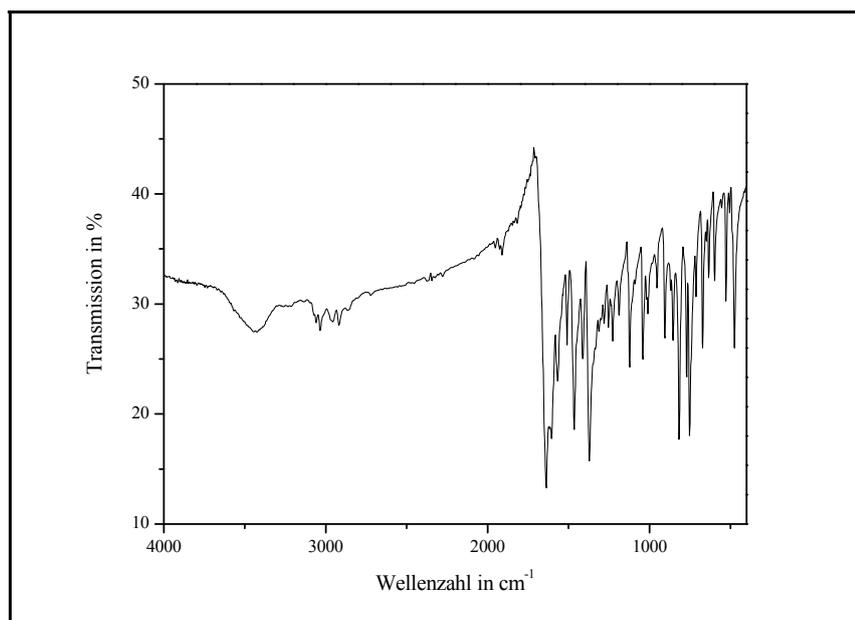
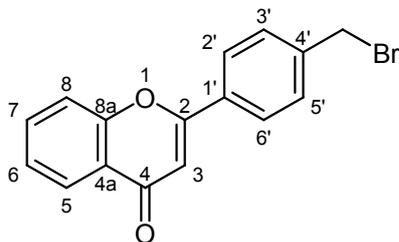


Abb. 95: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Methylflavon (X24)

Massenspektrum (GC/MS(EI), MeOH, RT = 11.52 min):

m/z (%) = 236.0 (100) [M⁺], 235.0 (25), 221.0 (31), 208.0 (34), 120.0 (39), 116.0 (19), 115.0 (32), 114.1 (10), 92.0 (21), 89.0 (10), 64.0 (6.5), 63.0 (6.9).

4.1.2.6 V6: 4'-Brommethylflavon (**X25**)

3.50 g (14.8 mmol) des Flavons **X24** werden in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. 2.96 g (16.7 mmol) *N*-Bromsuccinimid (NBS) und 0.400 g (2.43 mmol) Azo-bis-isobutyronitril (AIBN) werden hinzugefügt und fünf Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach leichtem Abkühlen wird das ausgefallene Succinimid abfiltriert. Nach weiterer Abkühlung kristallisiert das 4'-Brommethylflavon **X25** als hellgelber Feststoff.

Ausbeute: 3.22 g (10.2 mmol), $M(C_{16}H_{11}BrO_2) = 315.2$ g/mol

69 % der Theorie

Smp.: 133 °C

Lit.^[34]: 135 °C

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296$ K, CDCl_3):

$\delta = 4.53$ (s, 2H, **4'-CH₂Br**), 6.84 (s, 1H, **3-H**), 7.42 (ddd, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, **6-H**), 7.52 (m, 2H, $|N| = 8.4$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.56 (dd, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, $4J$ n.a., **8-H**), 7.70 (ddd, 1H, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, **7-H**), 7.90 (m, 2H, $|N| = 8.4$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**), 8.23 (dd, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, **5-H**) ppm.

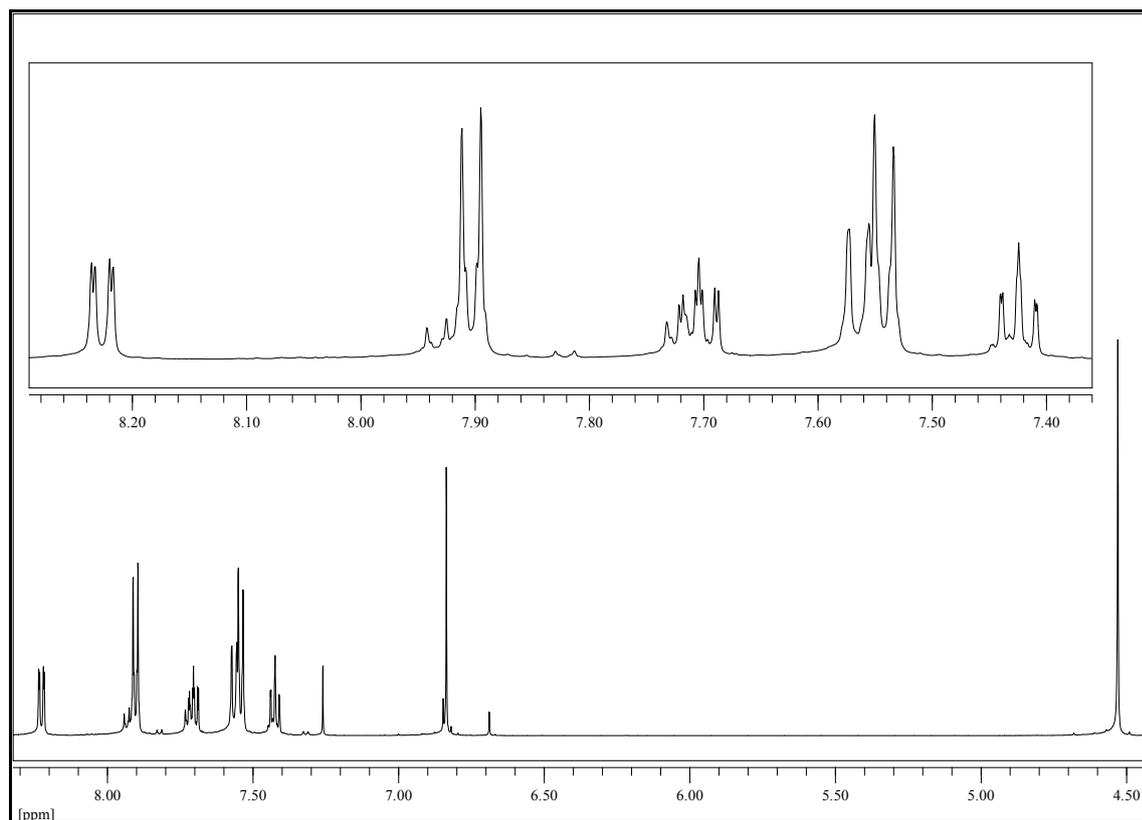


Abb. 96: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-Brommethylflavon (**X25**), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 32.18$ (**4'-CH₂Br**), 107.76 (**3-CH**), 118.05 (**8-CH**), 123.89 (**4a-C**), 125.31 (**6-CH**), 125.70 (**5-CH**), 126.71 (2C, **2'**, **6'-CH**), 129.75 (2C, **3'**, **5'-CH**), 131.70 (**1'-C**), 133.87 (**7-CH**), 141.34 (**4'-C**), 156.18 (**8a-C**), 162.63 (**2-C**), 178.37 (**4-C**) ppm.

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3048$ (w, Aryl-H-Val.), 3032 (w, Aryl-H-Val.), 2984 (w, CH_2 -Val.), 1637 (s, α,β -unges. Keton), 1605 , 1565 , 1508 (m, w, w, arom. $\text{C}=\text{C}$ -Val.), 1465 (m, CH_2 -Def.), 1377 (s), 840 (s, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 758 (s, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm^{-1} .

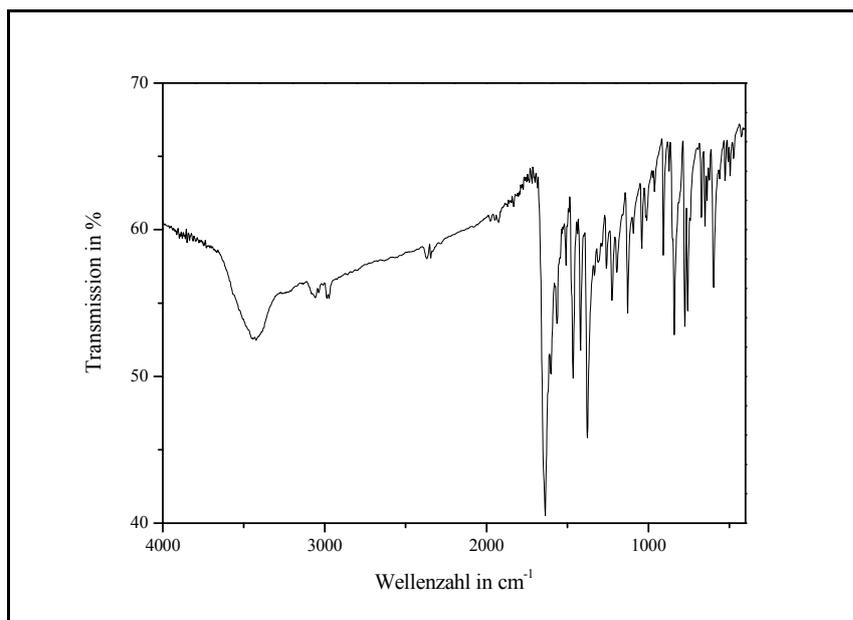
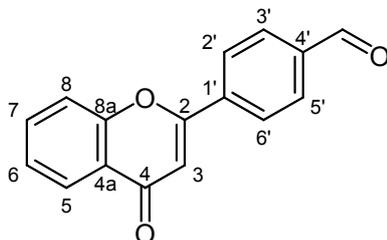


Abb. 97: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Brommethylflavon (X25)

Massenspektrum (EI, 110 °C):

m/z (%) = 316.1 (20) [M^+ (^{81}Br)], 314.1 (22) [M^+ (^{79}Br)], 236.2 (71), 235.2 (100), 221.2 (6.4), 208.3 (13), 207.3 (21), 120.2 (19), 116.3 (11), 115.3 (18), 103.7 (8.8), 92.2 (18), 89.2 (9.5), 64.2 (4.8).

4.1.2.7 V7: 4'-Formylflavon (**X26**)

1.70 g (5.02 mmol) **X25** und 8.00 g (57.2 mmol) Hexamethylentetraamin werden in 60 ml 50%iger Essigsäure für vier Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 20 ml halbkonzentrierter Salzsäure wird für eine weitere Stunde zum Rückfluss erhitzt. Die Mischung wird auf Eiswasser gegeben und filtriert. Nach dem Trocknen wird aus Hexan-Ethylacetat (1:4) umkristallisiert. Nach drei Tagen bei 4 °C fällt das 4'-Formylflavon in leicht gelben Nadeln.

Ausbeute: 900 mg (3.60 mmol), $M(C_{16}H_{10}O_3) = 250.3 \text{ g/mol}$

72 % der Theorie

Smp.: 171 °C

Lit.^[35]: 179 °C (Ethylacetat)

Elementaranalyse

Berechnet: 76.8 % C, 4.0 % H; Gefunden: 76.7 % C, 4.1 % H

$^1\text{H-NMR}_{500} (T = 296 \text{ K}, \text{CDCl}_3)$:

$\delta = 6.91$ (s, 1H, **3-H**), 7.45 (ddd, 1H, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 4J n.a., **6-H**), 7.60 (dd, 1H, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 4J n.a., **8-H**), 7.74 (ddd, 1H, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, $^4J = 1.3 \text{ Hz}$, **7-H**), 8.04 (m, 2H, $|N| = 8.3 \text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 8.10 (m, 2H, $|N| = 8.3 \text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**), 8.1 (dd, 1H, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, **5-H**), 10.11 (s, 1H, **CHO**) ppm.

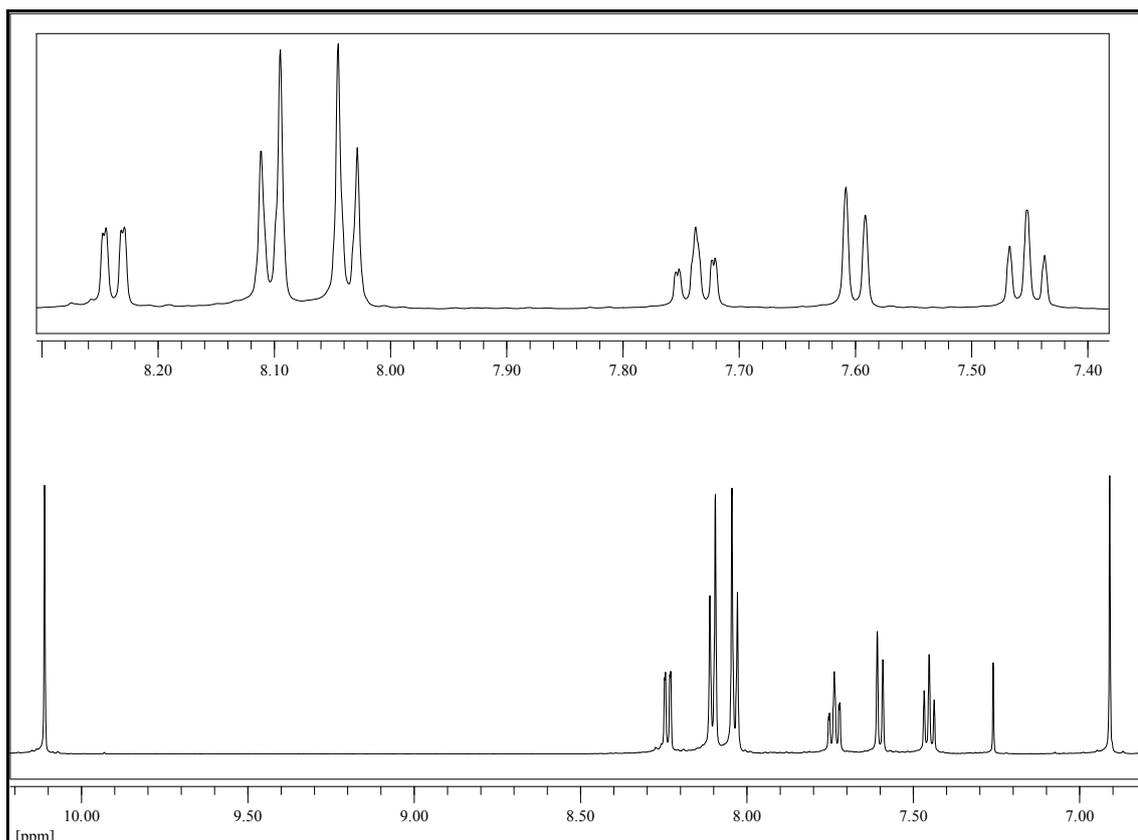


Abb. 98: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-Formylflavon (**X26**), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 109.13$ (**3-CH**), 118.12 (**8-CH**), 123.93 (**4a-C**), 125.57 (**6-CH**), 125.79 (**5-CH**),
 126.85 (2C, **2'**, **6'-CH**), 130.13 (2C, **3'**, **5'-CH**), 134.16 (**7-CH**), 137.08 (**1'-C**), 138.06
(**4'-C**), 155.20 (**8a-C**), 161.64 (**2-C**), 178.18 (**4-C**), 191.23 (**CHO**) ppm.

UV-VIS (Dichlormethan):

$\lambda_{\max.} (\log \varepsilon) = 261 \text{ (sh)}, 268 \text{ (4.33)}, 300 \text{ (4.46)} \text{ nm.}$

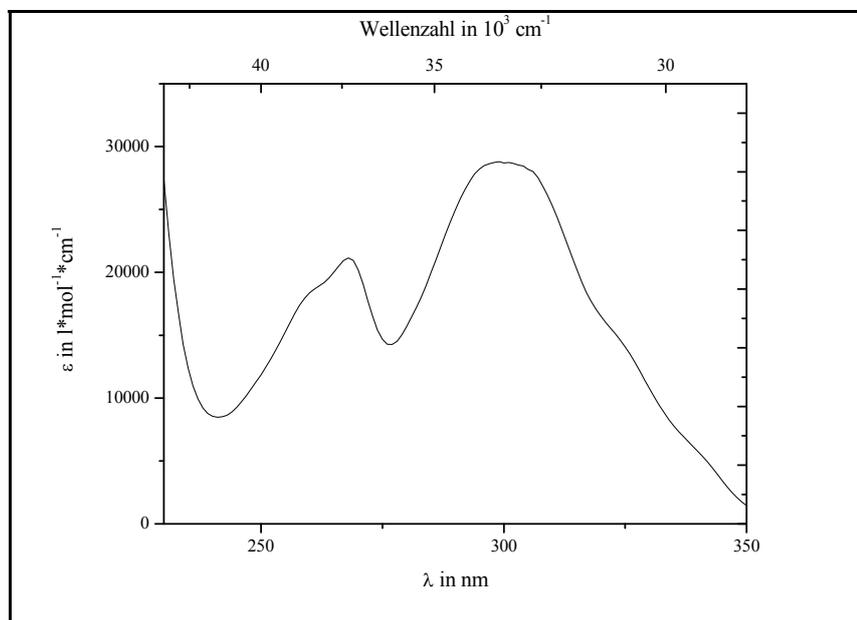


Abb. 99: UV-VIS-Spektrum (DCM) von 4'-Formylflavon (X26)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3076$ (w, Aryl-H-Val.), 3020 (w, Aryl-H-Val.), 2844 (w, Aldehyd, C-H-Val.), 2749 (w, Aldehyd, CH-Val.), 1701 (s, Aryl-Aldehyd, C=O), 1642 (s, α,β -unges. Keton, C=O), 1604 (m, Aromat. C=C-Val.), 1573 (s, Aromat. C=C-Val), 1465 (s), 1420 (s), 1379 (s), 1212 (s), 1128 (s), 827 (s, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 754 (s, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm^{-1} .

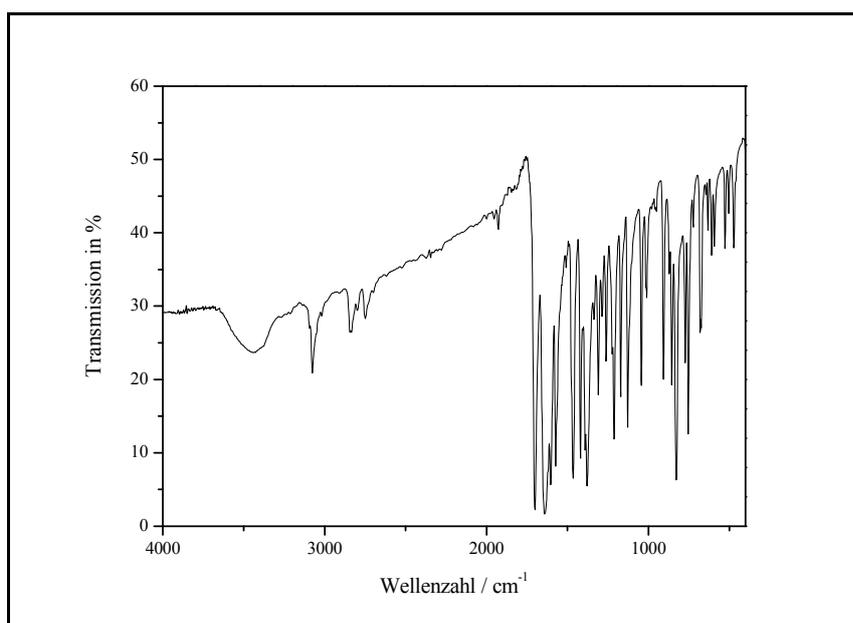
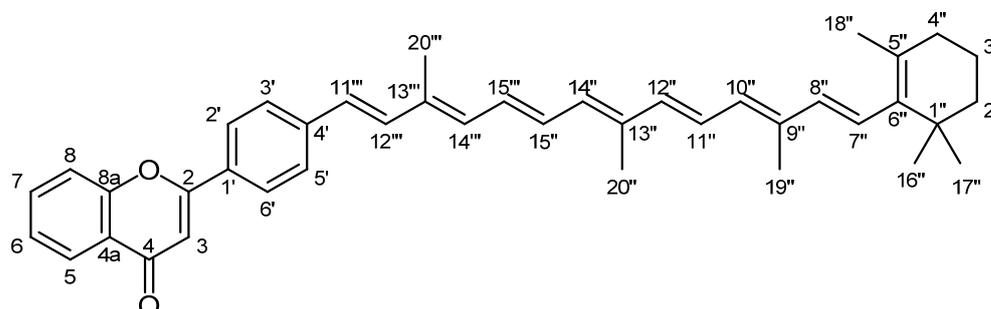


Abb. 100: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Formylflavon (**X26**)

Massenspektrum (EI, 100 °C):

m/z (%) = 251.2 (20), 250.2 (100) [\mathbf{M}^+], 249.2 (16), 222.2 (21), 221.2 (15), 165.3 (6.6), 120.2 (35), 92.2 (20), 89.2 (9.5), 64.2 (7.1).

4.1.2.8 V8: 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (**X27**)

Unter Argon und Lichtausschluss werden 0.14 g (0.20 mmol) des C_{25} -Phosphoniumsalzes **X21** und 50 mg (0.20 mmol) des Formylflavons **X26** bei 0 °C in 10 ml absolutem Pyridin gelöst. Langsam werden 0.50 ml (0.50 mmol) einer frisch hergestellten Lithiummethanolat-Lösung (1 M in Ethanol) hinzugegossen und vier Stunden lang bei RT weitergerührt. Der Ansatz wird mit Dünnsäure (~10%ige Schwefelsäure) hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend wird mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird an Kieselgel 60 mit einem DCM/Et₂O-Gemisch [Gradient von 10:1 (DC: R_f = 0.52) bis 1:1] als Laufmittel chromatographiert. Es wird ein dunkelroter amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 78 mg (0.14 mmol), $M(C_{41}H_{44}O_2) = 568.8$ g/mol

69 % der Theorie

Smp.: 185 °C

Massenfeinbestimmung (ESIpos, DCM+MeOH):

Berechnet ($C_{41}H_{44}O_2+H$): 569.3414; Gefunden: 569.3417

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 1.03$ (s, 6H, **16''**-, **17''**-**CH₃**), 1.46-1.48 (m, 2H, **2''**-**CH₂**), 1.56-1.67 (m, 2H, **3''**-**CH₂**), 1.72(s, 3H, **18''**-**CH₃**), 1.98 (s, 3H, **19''**-**CH₃**), 1.98-2.05 (m, 2H, **4''**-**CH₂**), 2.00 (s, 3H, **20'''**-**CH₃**), 2.05 (s, 3H, **20''**-**CH₃**), 6.14 (d, 1), 6.16 (d, 1), 6.19 (d, 1), 6.27 (d, 1H, $^3J = 10.8\text{ Hz}$, **14'''**-**CH**), 6.37 (d, 1H, $^3J = 14.9\text{ Hz}$, **12''**-**CH**), 6.44 (d, 1H, $^3J = 10.8\text{ Hz}$, **14''**-**CH**), 6.61 (d, 1H, $^3J = 15.9\text{ Hz}$, **11'''**-**CH**), 6.66 (dd, 1H, $^3J = 14.4\text{ Hz}$, $^3J = 11.3\text{ Hz}$, **15''**-**CH**), 6.69 (dd, 1H, $^3J = 14.7\text{ Hz}$, $^3J = 12.0\text{ Hz}$, **11''**-**CH**), 6.73 (dd, 1H, $^3J = 14.2\text{ Hz}$, $^3J = 11.2\text{ Hz}$, **15'''**-**CH**), 6.84 (s, 1H, **3-CH**), 7.01 (d, 1H, $^3J = 15.9\text{ Hz}$, **12'''**-**CH**), 7.42 (dt, 1H, $^3J = 7.5\text{ Hz}$, $^4J = 1.2\text{ Hz}$, **6-CH**), 7.56 (m, 2H, $|N| = 8.6\text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'-& 5'-CH**), 7.57 (dd, 1H, $^3J = 8.8\text{ Hz}$, $^4J \text{ n.a.}$, **8-CH**), 7.70 (dt, 1H, $^3J = 7.8\text{ Hz}$, $^4J = 1.6\text{ Hz}$, **7-CH**), 7.89 (m, 2H, $|N| = 8.5\text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'-& 6'-CH**), 8.24 (dd, 1H, $^3J = 7.9\text{ Hz}$, $^4J = 1.6\text{ Hz}$, **5-CH**) ppm.

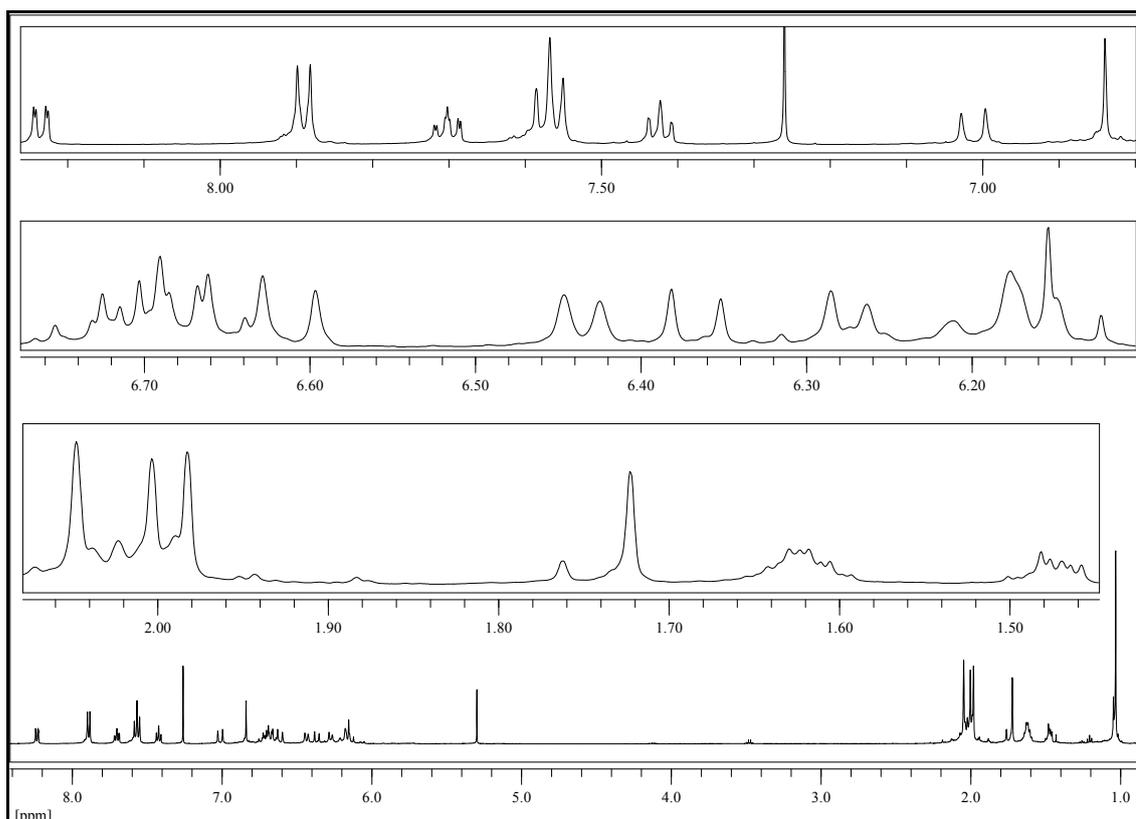


Abb. 101: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-(11'-Apo- β -carotinyll)flavon (**X27**), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 12.89$ (3C, $19''$ -, $20''$ -, $20'''$ - CH_3), 19.25 ($3''$ - CH_2), 21.77 ($18''$ - CH_3), 28.97 (2C, $16''$ -, $17''$ - CH_3), 33.11 ($4''$ - CH_2), 34.28 ($1''$ -C), 39.63 ($2''$ - CH_2), 107.02 (3- CH), 118.03 (8- CH), 124.02 (4a-C), 125.16 (6- CH), 125.60 ($11''$ - CH), 125.69 (5- CH), 126.13 ($11'''$ - CH), 126.59 (2C, $2'$ -, $6'$ - CH), 126.71 (2C, $3'$ -, $5'$ - CH), 126.93 ($7''$ - CH), 129.45 ($15''$ - CH), 129.49 ($5''$ -C), 129.83 ($1'$ -C), 130.72 ($10''$ - CH), 131.40 ($15'''$ - CH), 132.06 ($14'''$ - CH), 133.69 (7- CH), 134.81 ($14''$ - CH), 135.30 ($4'$ -C), 135.87 ($12'''$ - CH), 136.46 ($13''$ -C), 137.02 ($12''$ - CH), 137.50 ($9''$ -C), 137.70 ($8''$ -C), 137.89 ($6''$ -C), 141.29 ($13'''$ -C), 156.22 (8a-C), 163.13 (2-C), 178.39 (4-C) ppm.

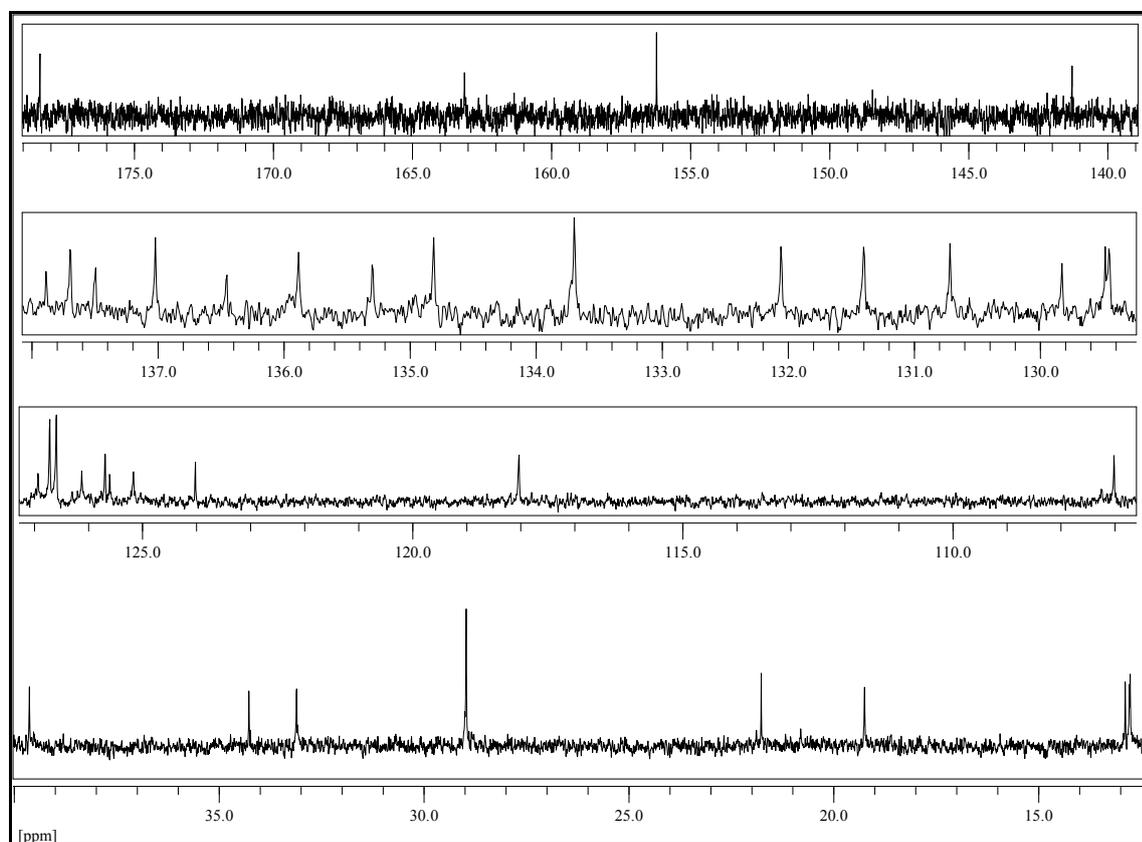


Abb. 102: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ (CDCl_3) von $4'$ -($11'$ -Apo- β -carotiny)flavon (X27), $T = 297\text{ K}$

UV-VIS (Tetrahydrofuran):

$\lambda_{\max.} (\log \epsilon) = 299 (4.35), 364 (4.35), 432 (\text{sh}), 454 (4.84), 480 (\text{sh}) \text{ nm.}$

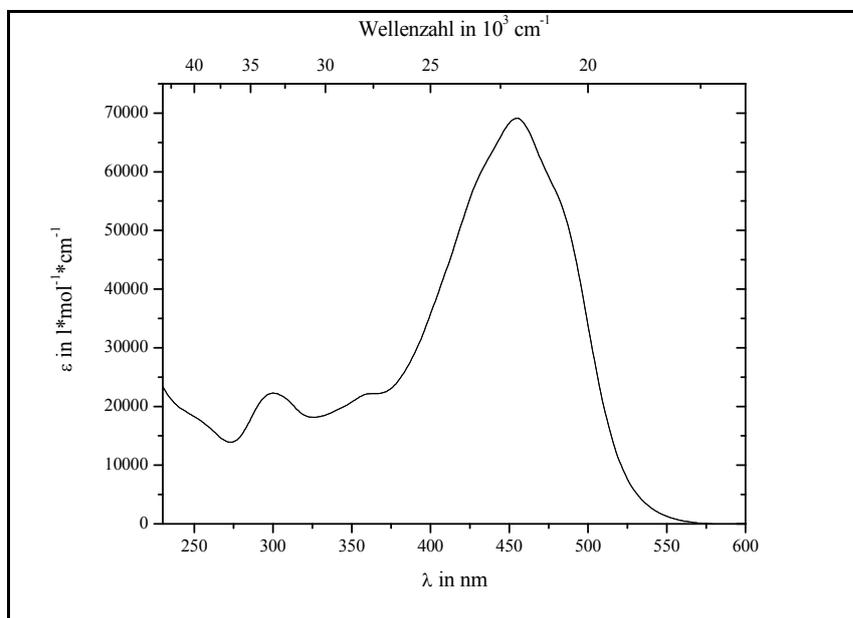


Abb. 103: UV-VIS (THF) von 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (X27)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3036$ (w, Aryl-H-Val.), 2960, 2920, 2856 (w, m, w, CH_2/CH_3 -Val.), 1643 (s, α, β -unges. Keton, C=O), 1599, 1570, 1508 (s, m, w, Aromat. C=C-Val.), 1463 (m, CH_2/CH_3 -Def.), 1369 (s, sym. CH_3 -Def.), 962 (s, C=C-H-Def., oop, all-trans), 841 (w, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 753 (m, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop), 730 (w, CH_2 -rocking Schwingung) cm^{-1} .

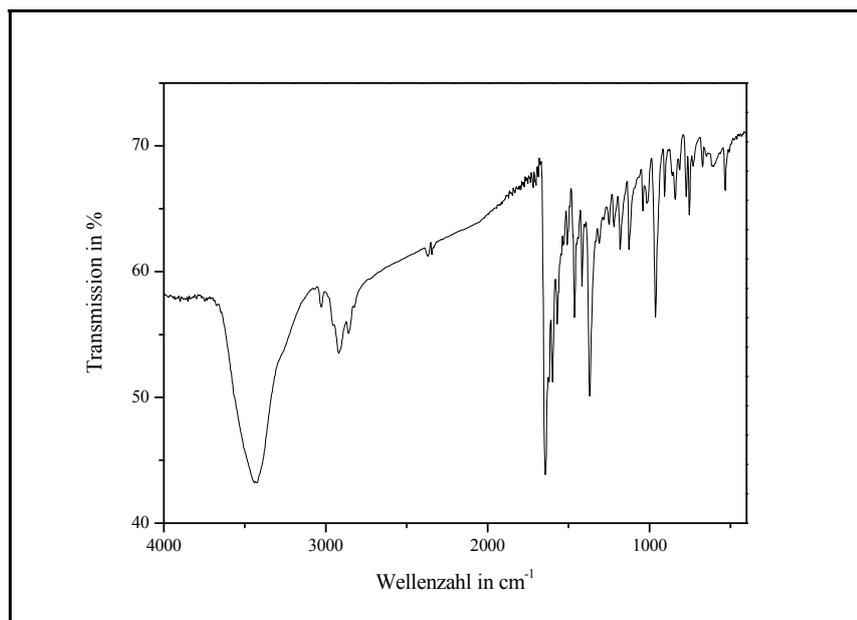


Abb. 104: IR-Spektrum (KBr) von 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (X27)

Massenspektrum: MALDI, DIT (CHCl₃):

m/z (%) = 569.3 (50), 569.3 (100) [M^+], 568.3 (42).

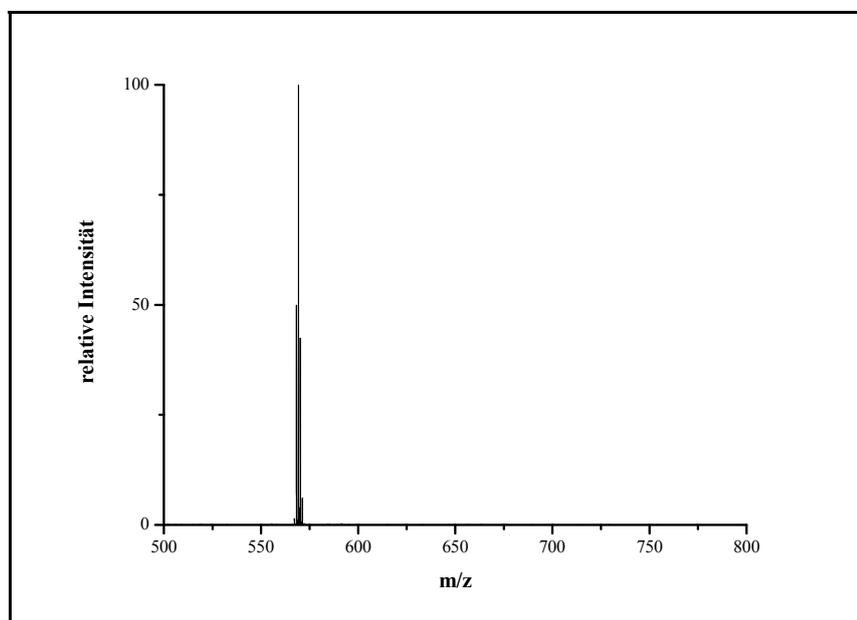
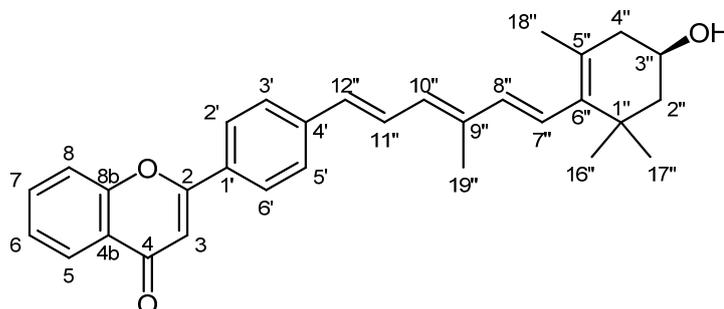


Abb. 105: MALDI-Spektrum (DIT [CHCl₃]) von 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (X27)

4.1.2.9 V9: 4'-(12-Apo-(*R*)-zeaxanthinyl)flavon (**X30**)

Unter Argon und Lichtausschluss werden 0.17 g (0.33 mmol) des C₁₅-Zea-P-Salzes (BASF SE Ludwigshafen) und 82 mg (0.33 mmol) des Formylflavons **X26** bei 0 °C in 10 ml absolutem Pyridin gelöst. Langsam werden 1.0 ml (1.0 mmol) einer frisch hergestellten Lithiumethanolat-Lösung (1M in Ethanol) hinzugegeben und drei Stunden lang bei RT weitergerührt. Der Ansatz wird mit Dünnsäure (~10%ige Schwefelsäure) hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend wird mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird an Kieselgel 60 mit einem DCM/Et₂O-Gemisch [1:1 (DC: R_f = 0.37)] als Laufmittel chromatographiert. Es wird ein gelber amorpher Feststoff erhalten, der in verdünnter Lösung hellgrün leuchtet. Man erhält ein Isomerengemisch (ca. 3:2) aus der all-*trans*-Form [*E*] und dem 11- *cis*-Isomer [*Z*], welches sich weder thermisch isomerisieren, noch säulenchromatographisch trennen lässt.

Ausbeute: 110 mg (0.24 mmol), M(C₃₁H₃₂O₃) = 452.6 g/mol

74 % der Theorie

Smp.: 169 °C

Massenfeinbestimmung (ESIpos, DCM+MeOH):

Berechnet (C₃₁H₃₂O₃+Na): 475.2244; Gefunden: 475.2244

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 1.08, 1.09$ (s, s, 6H, 6H, **Z-, E-(16''-, 17''-CH₃)**), 1.43-1.52 (m, m, 1H, 1H, **2''-CH₂(axial)**), 1.73, 1.75 (s, s, 3H, 3H, **Z-, E-18''-CH₃**), 1.75-1.81 (m, m, 1H, 1H, **2''-CH₂(äquatorial)**), 2.02, 2.06 (s, s, 3H, 3H, **Z-, E-19''-CH₃**), 2.00-2.12 (m, m, 1H, 1H, **4''-CH₂(ax.)**), 2.36-2.46 (m, m, 1H, 1H, **4''-CH₂(äq.)**), 3.94-4.10 (m, m, 1H, 1H, **3''-CH**), 6.14 (d, 1H, $^3J = 16.0\text{ Hz}$, **Z-8''-CH**), 6.16 (d, 1H, $^3J = 15.8\text{ Hz}$, **E-8''-CH**), 6.22 (d, d, 1H, 1H, $^3J = 16.0\text{ Hz}$, **7''-CH**), 6.25 (d, 1H, $^3J = 11.3\text{ Hz}$, **E-10''-CH**), 6.48 (d, 1H, $^3J = 11.5\text{ Hz}$, **Z-10''-CH**), 6.59 (d, 1H, $^3J = 12.2\text{ Hz}$, **Z-12''-CH**), 6.60 (d, 1H, $^3J = 15.2\text{ Hz}$, **E-8''-CH**), 6.73 (dd, 1H, $^3J = 12.2\text{ Hz}$, $^3J = 11.5\text{ Hz}$, **Z-11''-CH**), 6.83, 6.84 (s, s, 1H, 1H, **E-, Z-3-CH**), 7.29 (dd, 1H, $^3J = 15.3\text{ Hz}$, $^3J = 11.3\text{ Hz}$, **E-11''-CH**), 7.42 (dt, dt, 1H, 1H, $^3J = 7.2\text{ Hz}$, $^4J = 1.8\text{ Hz}$, **6-CH**), 7.51, 7.55 (m, m, 1H, 1H, $|N_Z| = 8.3\text{ Hz}$, $|N_E| = 8.6\text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **Z-, E-(3'- & 5'-CH)**), 7.57 (dd, dd, 1H, 1H, $^3J = 8.8\text{ Hz}$, $^4J = \text{n.a.}$, **8-CH**), 7.69 (m, m, 1H, 1H, $^3J = 7.7\text{ Hz}$, $^4J = 1.8\text{ Hz}$, **7-CH**), 7.87, 7.91 (m, m, 1H, 1H, $|N_E| = 8.4\text{ Hz}$, $|N_Z| = 8.3\text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **E-, Z-(2'- & 6'-CH)**), 8.23 (m, 1H, $^3J = 7.6\text{ Hz}$, **5-CH**) ppm.

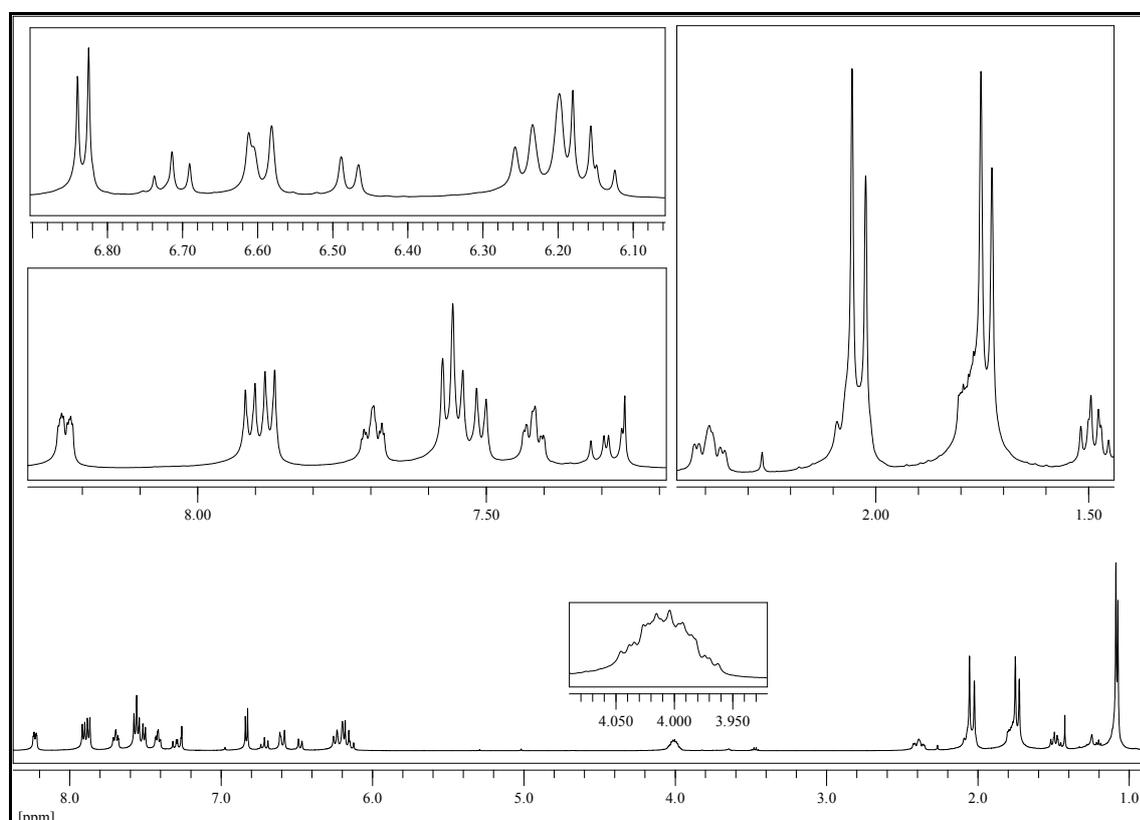


Abb. 106: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthinyl)flavon (**X30**), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{125}$ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 12.58, 12.90$ ($Z, E, 19''\text{-CH}_3$), 21.60 ($18''\text{-CH}_3$), $28.70, 30.23$ ($E, Z, 16''\text{-} \& 17''\text{-CH}_3$), 37.08 ($1''\text{-C}$), $42.45, 42.51$ ($Z, E, 4''\text{-CH}_2$), $48.29, 48.35$ ($Z, E, 2''\text{-CH}_2$), 64.96 ($3''\text{-CH}$), $107.03, 107.21$ ($E, Z, 3\text{-CH}$), 118.02 (8-CH), 123.97 (4a-C), 125.17 ($Z, 6\text{-CH}$), 125.19 ($E, 6\text{-CH}$), 125.65 (5-CH), 125.75 ($Z, 12''\text{-CH}$), 126.16 ($Z, 2'\text{-} \& 6'\text{-CH}$), 126.54 ($E, 2'\text{-} \& 6'\text{-CH}$), 126.58 ($Z, 5''\text{-C}$), 126.64 ($E, 5''\text{-C}$), 126.68 ($E, 3'\text{-} \& 5'\text{-CH}$), 127.11 ($7''\text{-CH}$), 127.73 ($E, 11''\text{-CH}$), 128.02 ($Z, 10''\text{-CH}$), 128.15 ($Z, 11''\text{-CH}$), 129.64 ($Z, 3'\text{-} \& 5'\text{-CH}$), 129.73 ($Z, 1'\text{-C}$), 129.96 ($E, 1'\text{-C}$), 130.13 ($E, 10''\text{-CH}$), 130.69 ($E, 12''\text{-CH}$), $133.71, 133.74$ ($E, Z, 7\text{-CH}$), $137.51, 137.55$ ($E, Z, 4'\text{-C}$), $138.06, 138.24$ ($E, Z, 8''\text{-CH}$), 139.49 ($6''\text{-C}$), $141.27, 141.32$ ($Z, E, 9''\text{-C}$), 156.18 (8a-C), 163.06 (2-C), 178.40 (4-C) ppm.

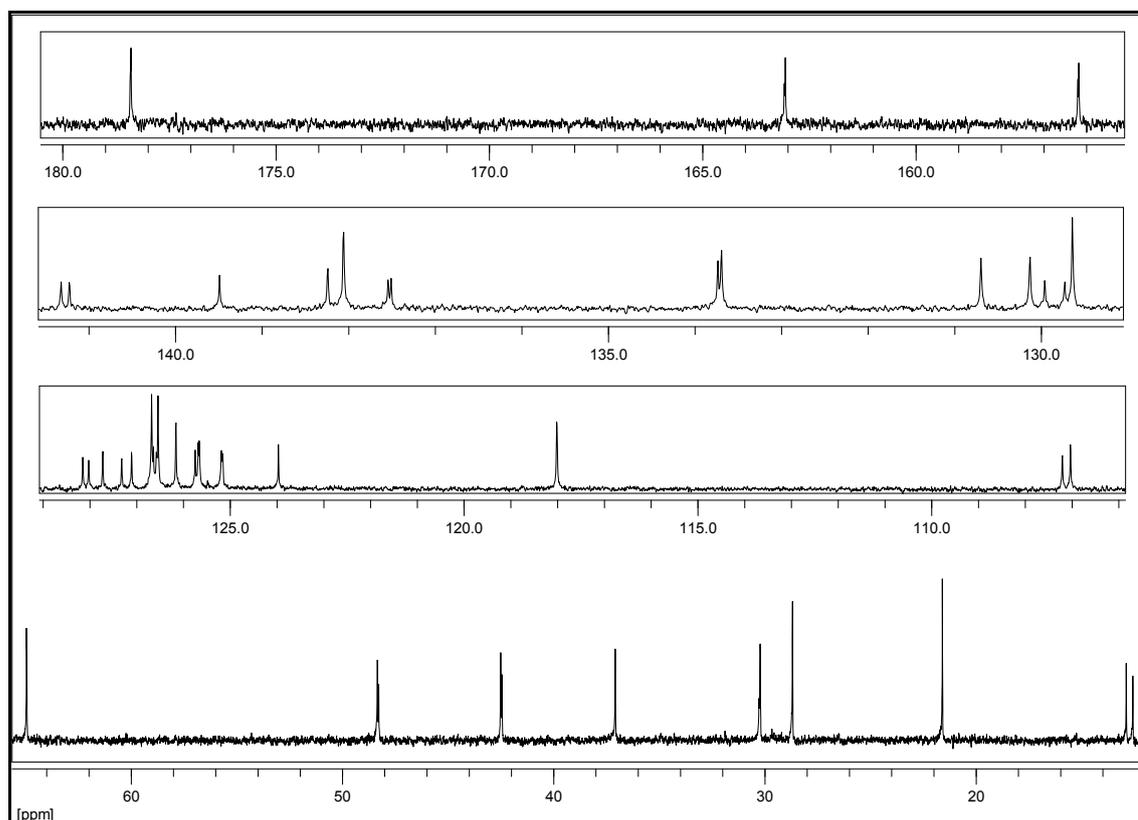


Abb. 107: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{125}$ (CDCl_3) von $4'\text{-}(12\text{-Apo-}(R)\text{-zeaxanthinyl)flavon (X30)}$, $T = 296\text{ K}$

UV-VIS (Tetrahydrofuran):

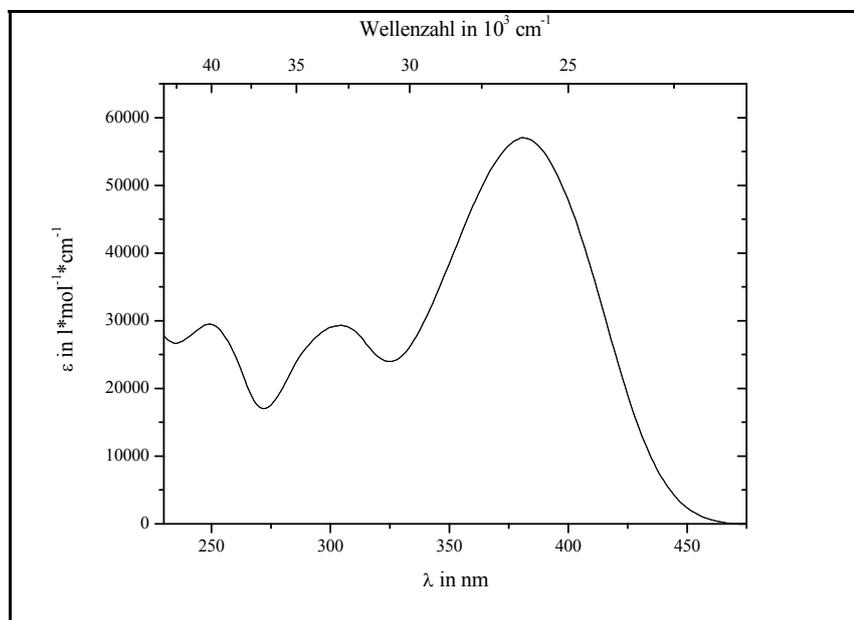
 $\lambda_{\max.} (\log \varepsilon) = 250 (4.47), 303 (4.47), 381 (4.76) \text{ nm.}$ 

Abb. 108: UV-VIS -Spektrum (THF) von 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthinyl)flavon (X30)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 2960, 2918, 2863$ (w, m, w, CH_2/CH_3 -Val.), 1643 (s, α, β -unges. Keton, $\text{C}=\text{O}$), $1599, 1568, 1507$ (m, m, w, Aromat. $\text{C}=\text{C}$ -Val.), 1465 (m, CH_2/CH_3 -Def.), 1376 (s, sym. CH_3 -Def.), 976 (m, $\text{C}=\text{C}$ -H-Def., oop, all-trans), 840 (w, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 752 (m, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm^{-1} .

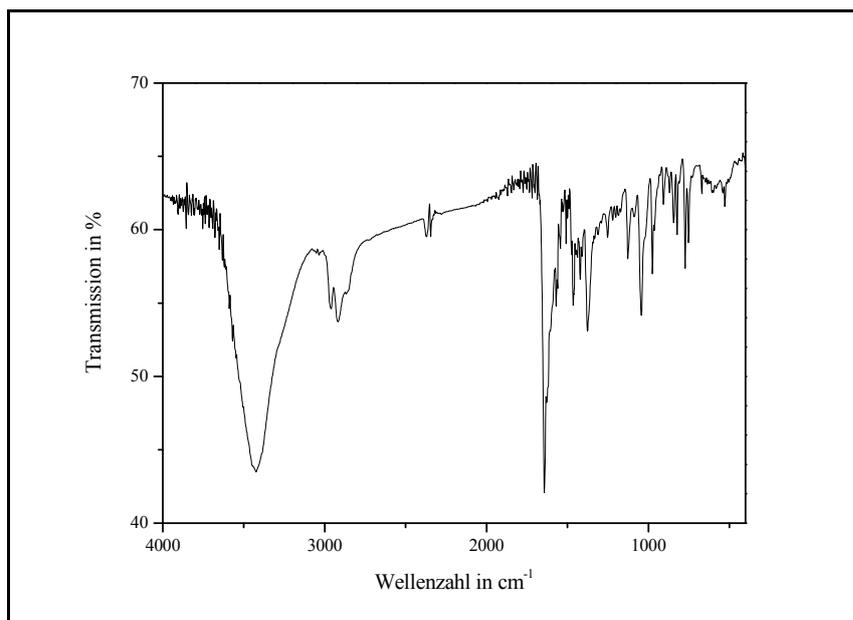


Abb. 109: IR-Spektrum (KBr) von 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthinyl)flavon (X30)

Massenspektrum: MALDI, DIT (CHCl₃):

m/z (%) = 454.1 (31), 453.1 (100) [M^+].

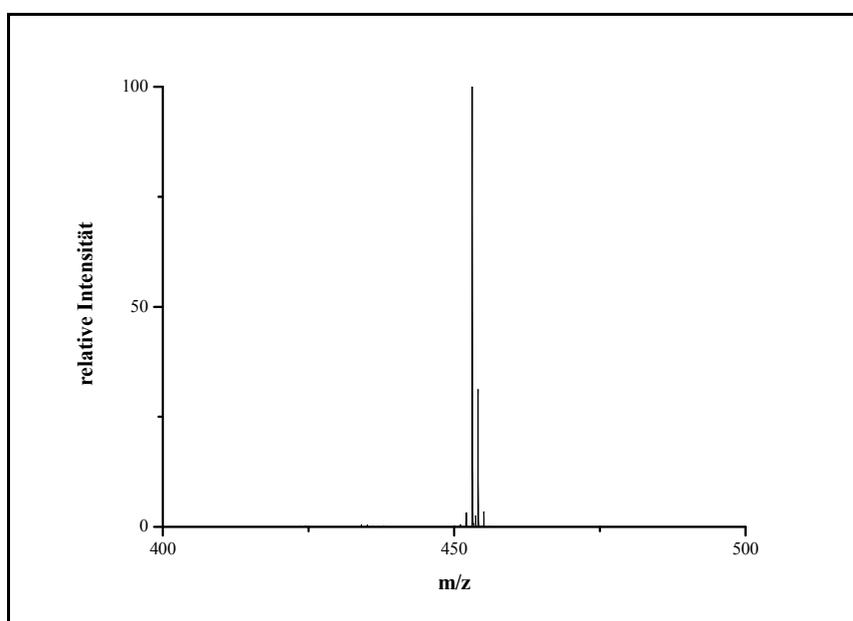
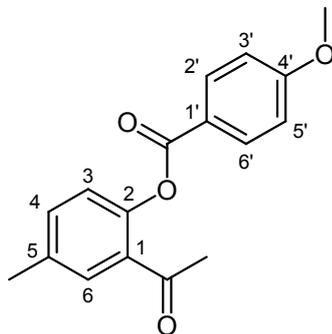


Abb. 110: MALDI-Spektrum (DIT, CHCl₃) von 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthinyl)flavon (X30)

4.1.2.10 V10: (2-Acetyl-4-methylphenyl)-4-methoxybenzoat (**X39**)

Unter Feuchtigkeitsausschluss werden 6.67 g (44.4 mmol) 2'-Hydroxy-5'-methylacetophenon (Acros, 98 %) und 10.0 g (66.5 mmol) *p*-Anisoylchlorid (Aldrich, 99 %) in 10 ml absolutem Pyridin bis zum Ende der Wärmeentwicklung (ca. 20 min.) gerührt. Unter gutem Rühren wird die Mischung auf 300 ml verdünnte Salzsäure(3 %), welche 100 g Eis enthält, gegossen. Der ausgefallene Feststoff wird nacheinander mit etwas kaltem Methanol und Wasser gewaschen, bevor er im Exsiccator über Orangegel getrocknet wird. Durch Umkristallisation aus Methanol erhält man einen voluminösen, farblosen Feststoff.

Ausbeute: 9.00 g (31.7 mmol), $M(C_{17}H_{16}O_4) = 284.3$ g/mol

71 % der Theorie

Smp.: 111 °C

Lit.^[46]: 115 °C

$^1\text{H-NMR}_{200}$ ($T = 296$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.41$ (dd, 3H, $^4J = 0.7$ Hz, $^4J = 0.6$ Hz, **5-CH₃**), 2.54 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 3.89 (s, 3H, **OCH₃**), 6.99 (m, 2 H, $|N| = 9.0$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H**), 7.10 (dd, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, 4J n.a., **3-H**), 7.36 (ddd, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 2.8$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, **4-H**), 7.64 (dd, 1H, $^4J = 2.2$ Hz, $^5J = 0.6$ Hz, **6-H**), 8.16 (m, 2 H, $|N| = 9.0$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H**) ppm.

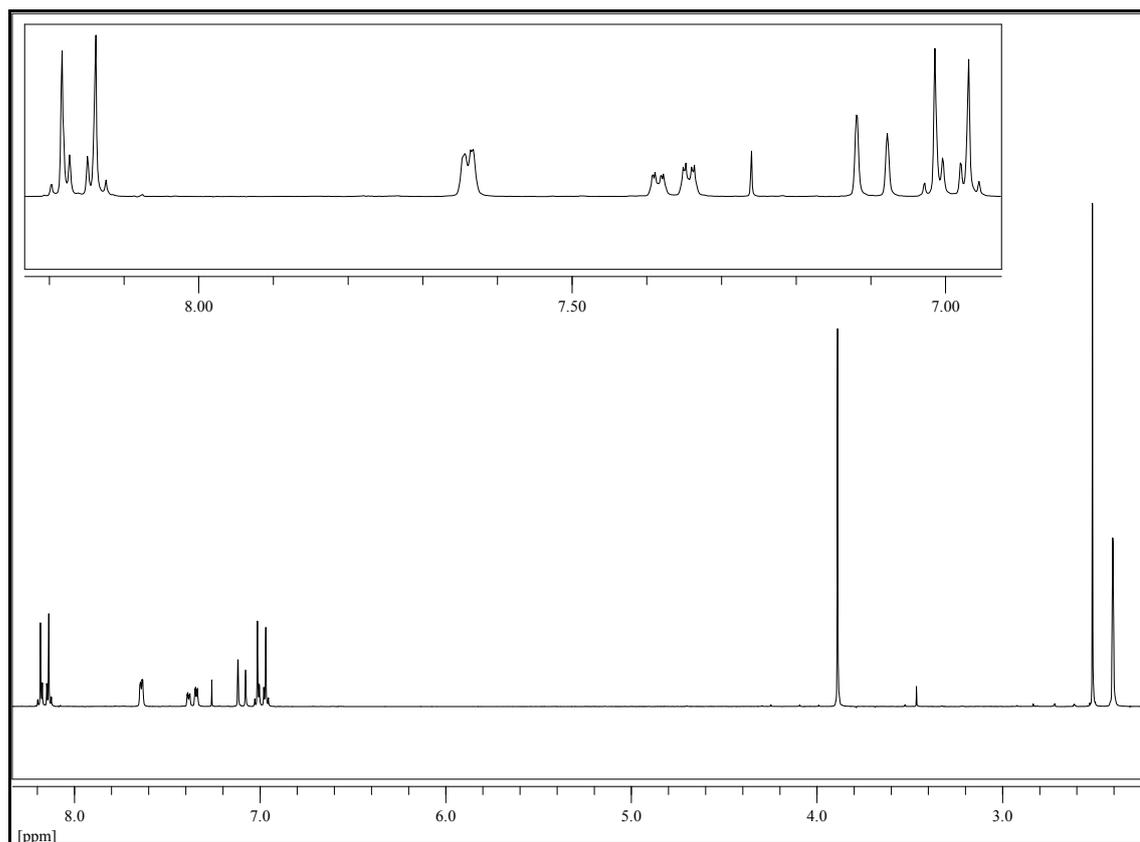


Abb. 111: $^1\text{H-NMR}_{200}$ (CDCl_3) von (2-Acetyl-4-methylphenyl)-4-methoxybenzoat (**X39**), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 298\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 20.79$ (**5-CH₃**), 29.96 (**Ac-CH₃**), 55.55 (**OCH₃**), 123.63 (**3-C**), 121.53 (**1'-C**), 113.94 (2C, **3', 5'-CH**), 130.42 (**6-CH**), 131.07 (**1-C**), 132.39 (2C, **2', 6'-CH**), 133.91 (**4-C**), 135.76 (**5-C**), 147.31 (**2-C**), 164.03 (**4'-C**), 164.91 (**COO**), 197.83 (**Ac-C=O**) ppm.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3007 (w, Aryl-H-Val.), 2924 (w, CH₃-Val.), 2845 (w, -OCH₃-Val.), 1720 (s, aromat. Ester, C=O-Val.), 1681 (s, Arylketon, C=O-Val.), 1608, 1579, 1510 (s, m, s aromat. C=C-Val.), 1421 (m, CH₃-Def.), 1364 (m, sym. CH₃-Def.), 1279 (s, Ester, C-O-Val.), 1257 (s, Aryl-alkylether, C-O-C-Val.), 1199 (s), 1168 (s), 1075 (s, Ester, C-O-Val.), 879 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 845 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

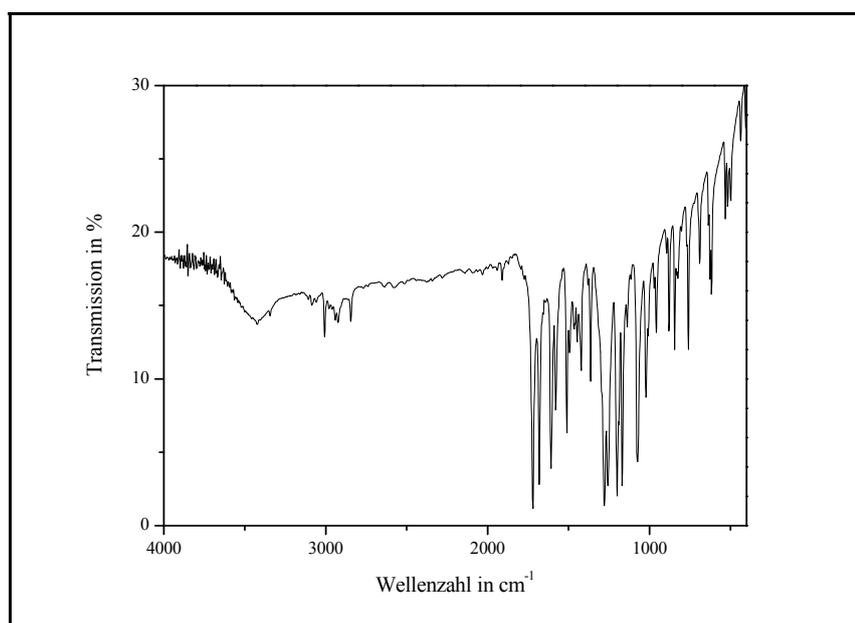
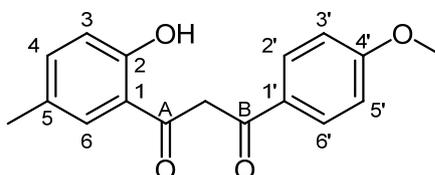


Abb. 112: IR-Spektrum (KBr) von (2-Acetyl-4-methylphenyl)-4-methoxybenzoat (X39)

Massenspektrum (EI, 70 °C):

m/z (%) = 284.3 (11) [\mathbf{M}^+], 136.2 (25), 135.2 (100), 107.3 (12), 92.2 (15), 77.2 (24), 64.2 (5.8).

4.1.2.11 V11: 1-(*o*-Hydroxy-5-methylphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion
(X40)



8.52 g (30.0 mmol) **X39** werden in 70 ml absolutem Pyridin gelöst und auf 50 °C erwärmt. Zu der Lösung werden 3.50 g (62.4 mmol) heißes pulverisiertes Kaliumhydroxid gegeben und zwei Stunden lang bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit 250 ml 10%iger Essigsäure versetzt. Der abfiltrierte Feststoff wird mit viel Wasser gewaschen bevor er aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält feine gelbe Nadeln.

Ausbeute: 7.90 g (27.8 mmol), $M(C_{17}H_{16}O_4) = 284.3$ g/mol

93 % der Theorie

Smp.: 136 °C

Lit.^[46]: 134 °C

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.28$ (s, 0.6H, **5-CH₃**, **Keto**), 2.31 (s, 3H, **5-CH₃**, **Enol**), 3.85 (s, 0.8H, **OCH₃**, **Keto**), 3.56 (s, 3H, **OCH₃**, **Enol**), 4.52 (s, 0.4H, **CH₂**, **Keto**), 6.72 (s, 1H, **CH**, **Enol**), 6.87 (d, 1.2H, $^3J = 8.4$ Hz, **3-H**, **Keto & Enol**), 6.94 (m, 0.4 H, $|N| = 8.8$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**, **Keto**), 6.96 (m, 2 H, $|N| = 8.8$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**, **Enol**), 7.23 (dd, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, **4-H**, **Enol**), 7.28 (dd, 0.2H, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, **4-H**, **Keto**), 7.50 (d, 1H, 4J n.a., **6-H**, **Enol**), 7.81 (d, 0.2H, 4J n.a., **6-H**, **Keto**), 7.90 (m, 2H, $|N| = 8.8$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**, **Enol**), 7.97 (m, 0.4H, $|N| = 8.8$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**, **Keto**), 11.80 (s, 0.2H, **2-OH**, **Keto**), 11.93 (s, 1H, **2-OH**, **Enol**), 15.82 (s, 1H, **Enol-OH**) ppm.

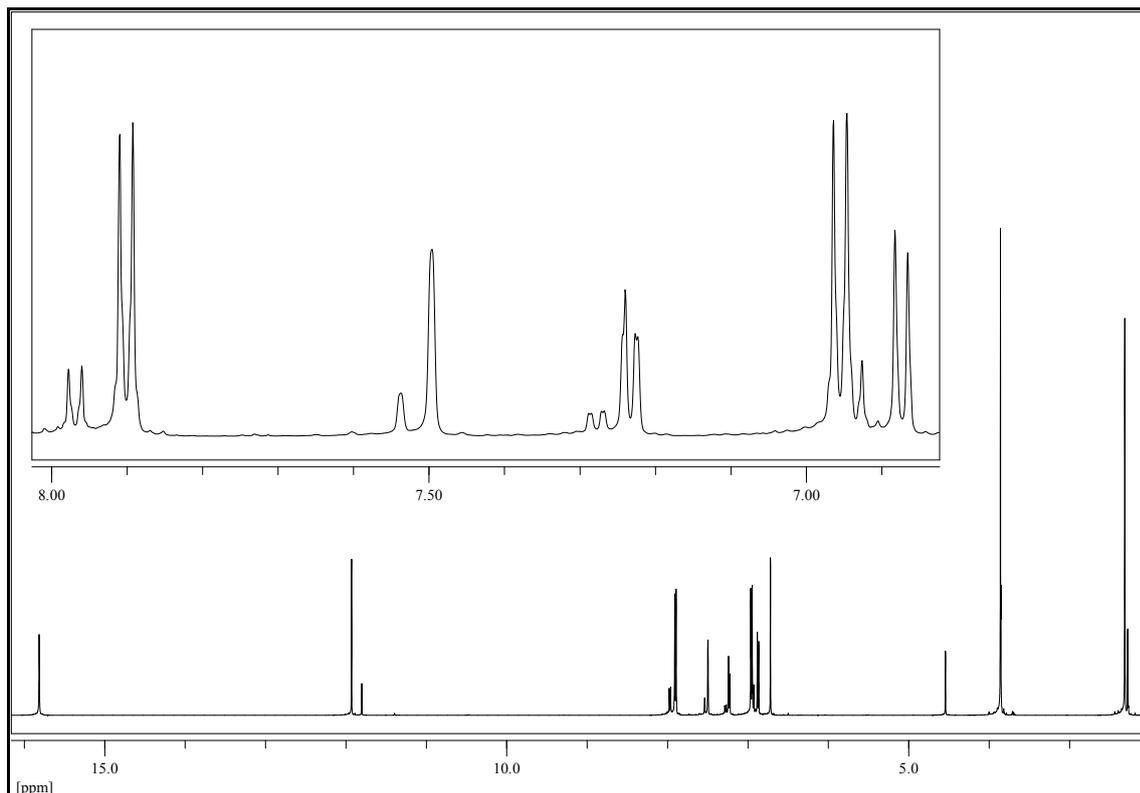


Abb. 113: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) von 1-(*o*-Hydroxy-5-methylphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (**X40**),
 $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 20.51$ (0.2C, **5-CH₃**, **Keto**), 20.55 (1C, **5-CH₃**, **Enol**), 49.76 (0.2C, **CH₂**, **Keto**),
 55.45 (1C, **OCH₃**, **Enol**), 55.51 (0.2C, **OCH₃**, **Keto**), 90.96 (s, 1C, **CH**, **Enol**), 113.98
(0.4C, **3', 5'-CH**, **Keto**), 114.08 (2C, **3', 5'-CH**, **Enol**), 118.30 (1C, **3-H**, **Keto**), 118.42
(1C, **3-CH**, **Enol**), 118.61 (1C, **1-C**, **Enol**), 119.10 (0.2C, **1-C**, **Keto**), 125.84 (1.2C,
1'-C, **Keto & Enol**), 128.04 (1C, **6-CH**, **Enol**), 128.02 (0.2C, **6-CH**, **Keto**), 128.78
(2C, **2', 6'-H**, **Enol**), 130.55 (0.4C, **2', 6'-H**, **Keto**), 131.19 (1.2C, **5-C**, **Keto & Enol**),
 136.53 (1C, **4-CH**, **Enol**), 138.12 (0.2C, **4-CH**, **Keto**), 160.13 (1C, **4'-C**, **Enol**), 160.72
(0.2C, **4'-C**, **Keto**), 163.13 (1C, **2-C**, **Enol**), 164.10 (0.2C, **2-C**, **Keto**), 177.59 (1C,
=C_B-OH, **Enol**), 191.90 (0.2C, **C_B=O**, **Keto**), 195.75 (1C, **C_A=O**, **Enol**), 200.33 (0.2C,
C_A=O, **Keto**) ppm.

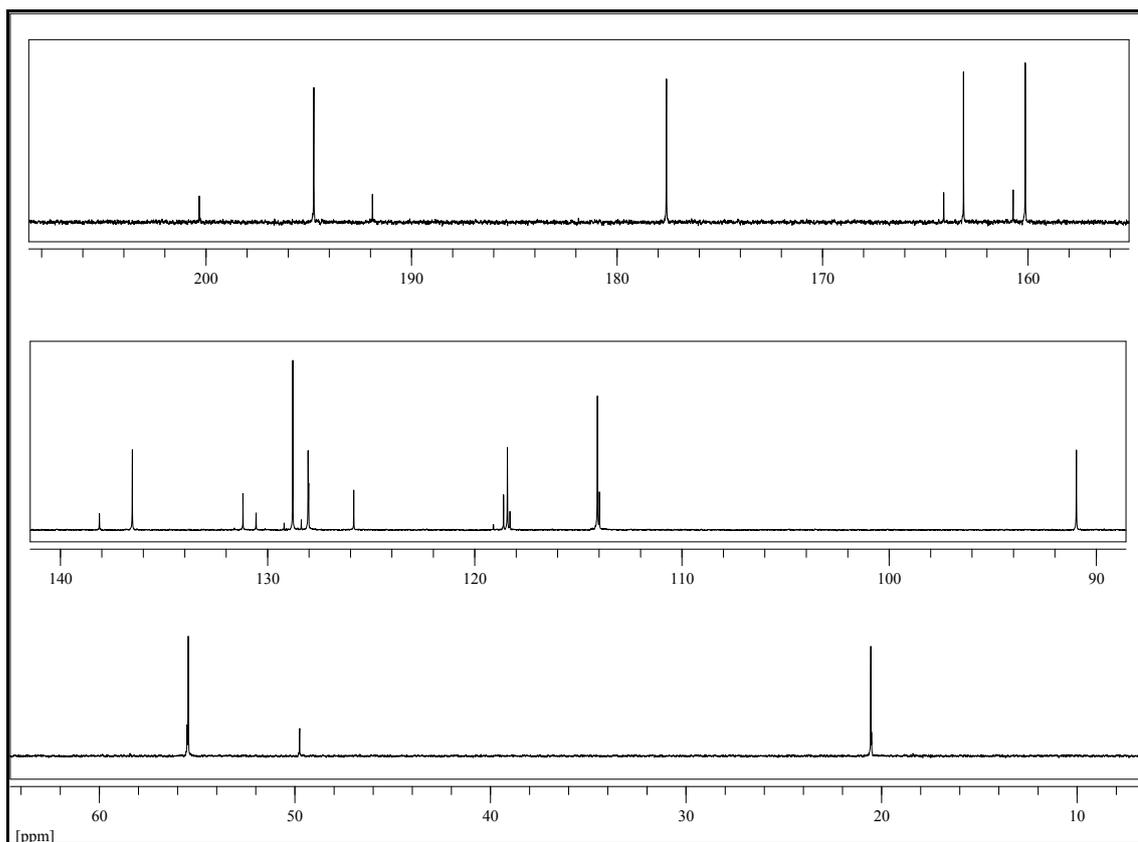


Abb. 114: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3) von 1-(*o*-Hydroxy-5-methylphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (X40), $T = 297\text{ K}$

IR (Golden Gate)

$\tilde{\nu}$ = 3053, 3004 (w, w, Aryl-H-Val.), 2933 (w, CH₃-Val.), 2839 (w, -OCH₃-Val.), 1602 (s, aromat. C=C-Val.), 1584 (m, C=O···H), 1504 (m, aromat. C=C-Val.), 1439 (m, CH₃-Def.), 1357 (w, sym. CH₃-Def.), 1295 (s), 1262 (s, Aryl-alkylether, C-O-C-Val.), 1172 (s), 799 (s, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

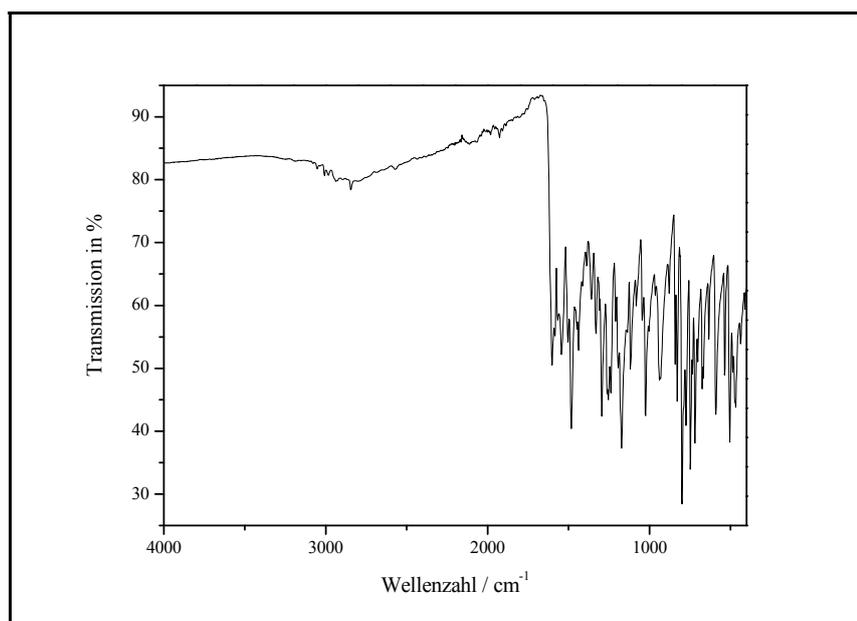
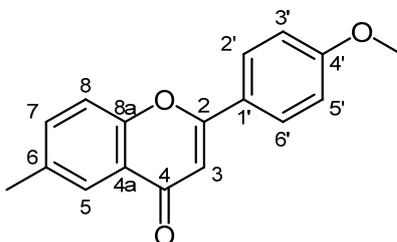


Abb. 115: FT-IR (Golden Gate) von 1-(*o*-Hydroxy-5-methylphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (X40)

Massenspektrum (EI, 80 °C):

m/z (%) = 284.3 (18) [M^+], 152.2 (56), 136.2 (8.6), 135.2 (100), 107.3 (6.7), 92.2 (5.1), 77.2 (8.7).

4.1.2.12 V12: 4'-Methoxy-6-methylflavon (**X41**)

5.70 g (20.0 mmol) des Diketons **X40** werden in 35 ml Eisessig gelöst und mit 1.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und eine Stunde lang unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wird unter heftigem Rühren auf ca. 200 g Eis gegeben. Das ausgefallene Flavon wird abfiltriert und mit viel Wasser (ca. 500 ml) säurefrei gewaschen bevor es getrocknet wird. Man erhält farblose Nadeln.

Ausbeute: 4.70 g (17.6 mmol), $M(C_{17}H_{14}O_3) = 266.3$ g/mol

88 % der Theorie

Smp.: 173 °C

Lit.^[46]: 170 °C

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.45$ (s, 3H, **6-CH₃**), 3.88 (s, 3H, **OCH₃**), 6.72 (s, 1H, **3-H**), 7.32 (m, 2H, $|N| = 8.9$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H**), 7.43 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, **8-H**), 7.47 (dd, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, **7-H**), 7.86 (m, 2H, $|N| = 9.0$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H**), 7.99 (d, 1H, $^4J = 2.0$ Hz, **5-H**) ppm.

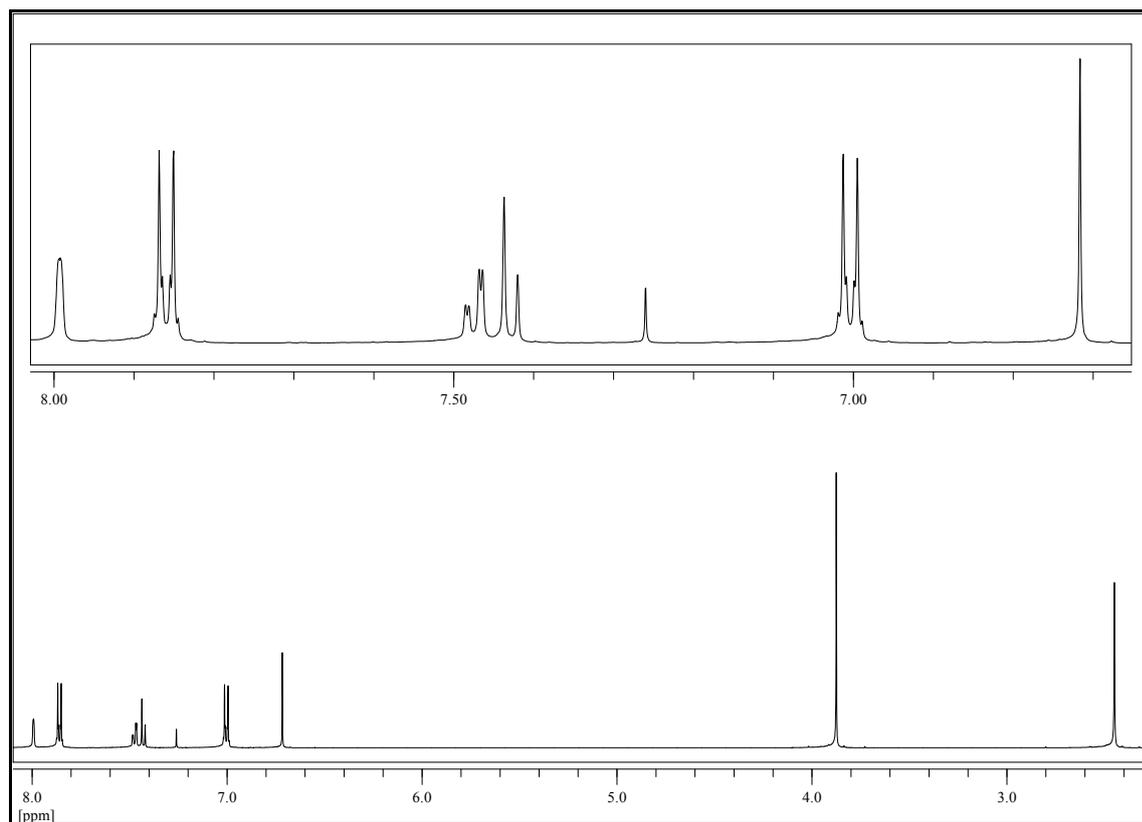


Abb. 116: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-Methoxy-6-methylflavon (**X41**), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 20.90$ (**6-CH₃**), 55.45 (**OCH₃**), 105.98 (**3-CH**), 114.38 (2C, **3'**, **5'-CH**), 117.67 (**8-CH**), 123.51 (**4a-C**), 124.09 (**1'-C**), 124.97 (**5-CH**), 127.91 (2C, **2'**, **6'-CH**), 134.72 (**7-CH**), 134.97 (**6-C**), 154.40 (**8a-C**), 162.27 (**4'-C**), 163.22 (**2-C**), 178.46 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\text{max.}} (\log \epsilon) = 259 (4.16), 319 (4.52) \text{ nm.}$

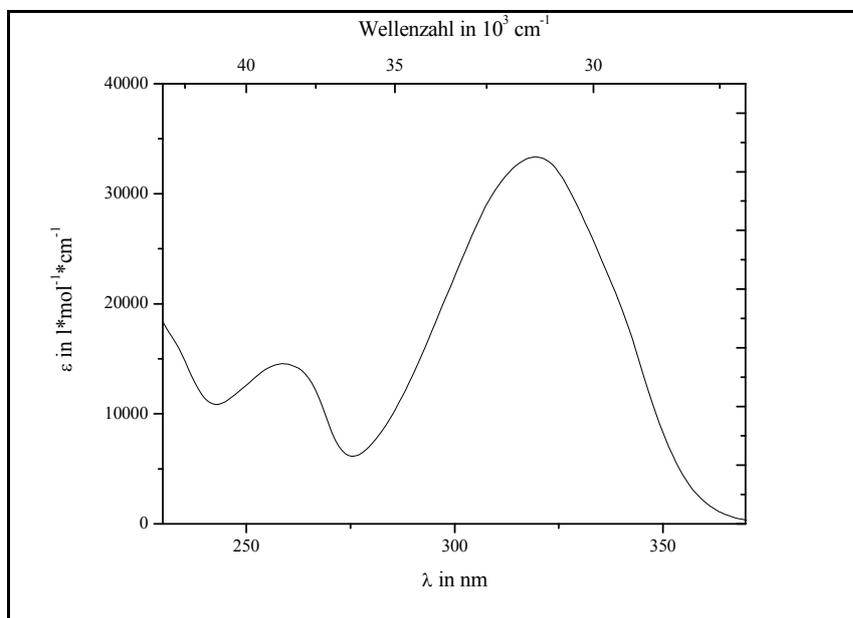


Abb. 117: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 4'-Methoxy-6-methylflavon (X41)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3077 (w, Aryl-H-Val.), 2930 (w, CH₃-Val.), 2852 (w, -OCH₃-Val.), 1649 (s, α,β -unges. Keton), 1607 (m, arom. C=C-Val.), 1515 (s, arom. C=C-Val.), 1438 (m, CH₃-Def.), 1368 (m, sym. CH₃-Def.), 1263 (s, C-O-C-Val.), 905 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 830 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

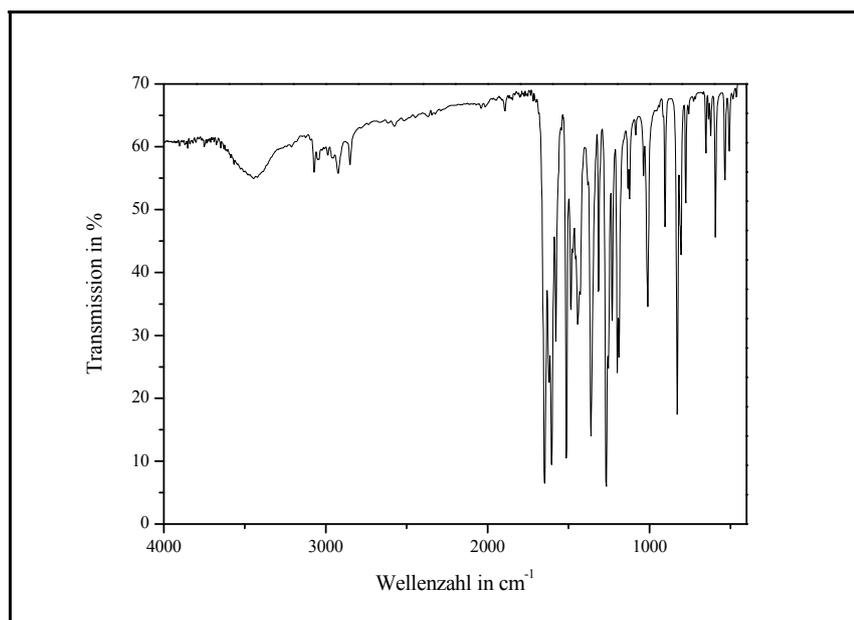
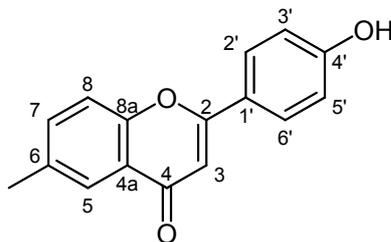


Abb. 118: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Methoxy-6-methylflavon (X41)

Massenspektrum (EI, 110 °C):

m/z (%) = 266.2 (100) [M^+], 265.3 (20), 134.2 (20), 132.2 (49), 117.2 (11).

4.1.2.13 V13: 4'-Hydroxy-6-methylflavon (**X42**)

Unter Argon werden 5.30 g (20.0 mmol) 4'-Methoxy-6-methylflavon **X41** in 25 ml absolutem Dichlormethan gelöst. 40.0 ml (40.0 mmol) einer Bortribromid-Lösung (1 M in DCM) werden innerhalb von ca. 15 Minuten hinzugegeben. Der Ansatz wird 72 Stunden lang bei RT gerührt. Der Ansatz wird auf Eis gegossen und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer gesättigten Natriumthiosulfatlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels wird das Produkt durch Umkristallisation aus Ethanol in Form von hellgrünen Nadeln erhalten.

Ausbeute: 2.64 g (10.5 mmol), $M(C_{16}H_{12}O_3) = 252.3$ g/mol
52 % der Theorie

Smp.: 188 °C Lit.^[47]: nicht angegeben

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297$ K, DMSO- d_6):

$\delta = 2.42$ (s, 3H, **6-CH₃**), 6.83 (s, 1H, **3-H**), 6.93 (m, 2H, $|N| = 8.8$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.61 (dd, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, **7-H**), 7.63 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, **8-H**), 7.81 (d, 1H, $^4J = 2.0$ Hz, **5-H**), 7.94 (m, 2H, $|N| = 8.8$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**), 10.30 (s, 1H, **4'-OH**) ppm.

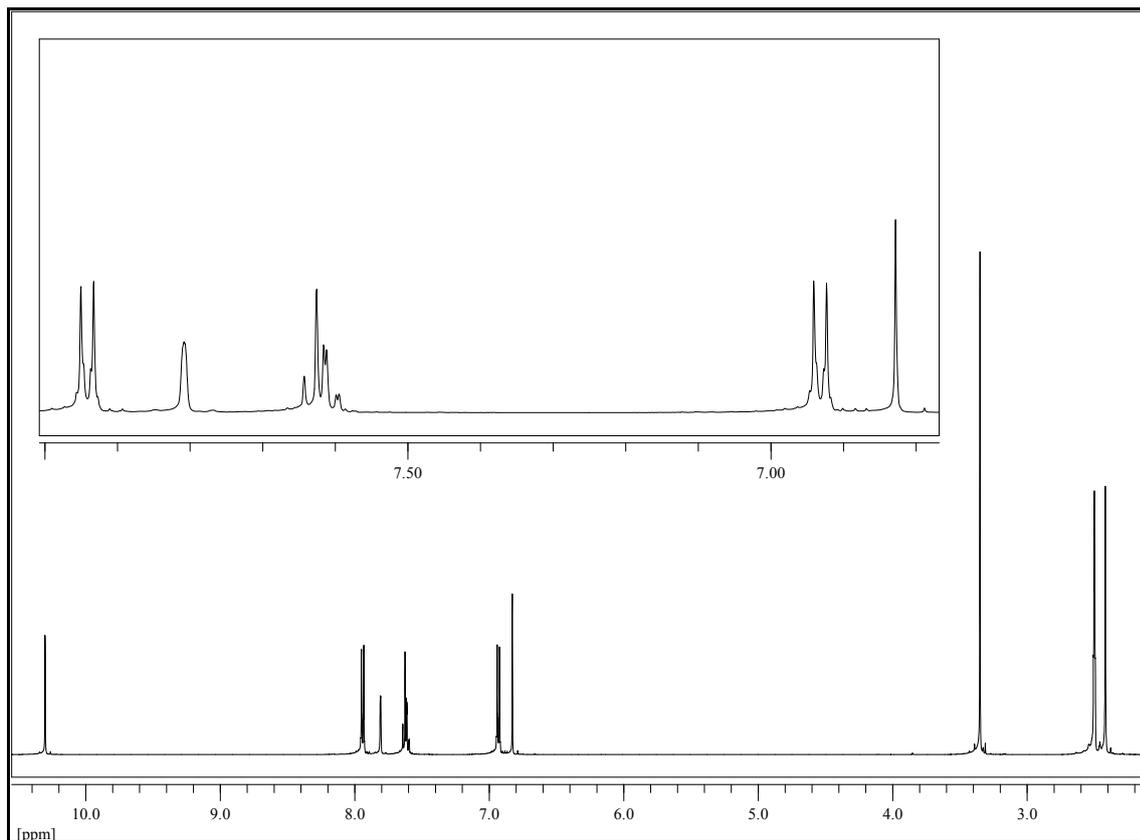


Abb. 119: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO-d_6) von 4'-Hydroxy-6-methylflavon (X42), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}_{125}$ ($T = 297\text{ K}$, DMSO-d_6):

$\delta = 20.21$ (**6-CH₃**), 104.20 (**3-CH**), 115.58 (2C, **3'**, **5'-CH**), 117.73 (**8-CH**), 122.52 (**4a-C**), 123.82 (**1'-C**), 123.75 (**5-CH**), 127.83 (2C, **2'**, **6'-CH**), 134.45 (**6-C**), 134.70 (**7-CH**), 153.76 (**8a-C**), 158.74 (**4'-C**), 162.65 (**2-C**), 176.75 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\text{max.}} (\log \epsilon) = 258 (4.14), 321 (4.47) \text{ nm.}$

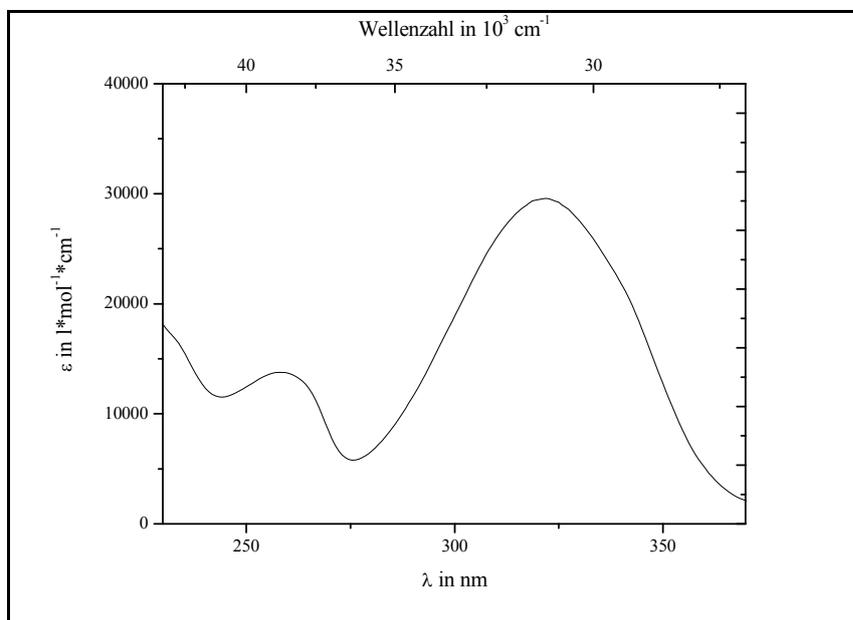


Abb. 120: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 4'-Hydroxy-6-methylflavon (X42)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3090 (s, breit, OH-Val.), 3022 (w, Aryl-H-Val.), 2930 (w, CH₃-Val.), 1633 (s, α,β -unges. Keton), 1607 (s, arom. C=C-Val.), 1515 (s, arom. C=C-Val.), 1447 (m, CH₃-Def.), 1368 (m, sym. CH₃-Def.), 1290 (s, Aryl-OH), 1249 (s, C-O-C-Val.), 905 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 840 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

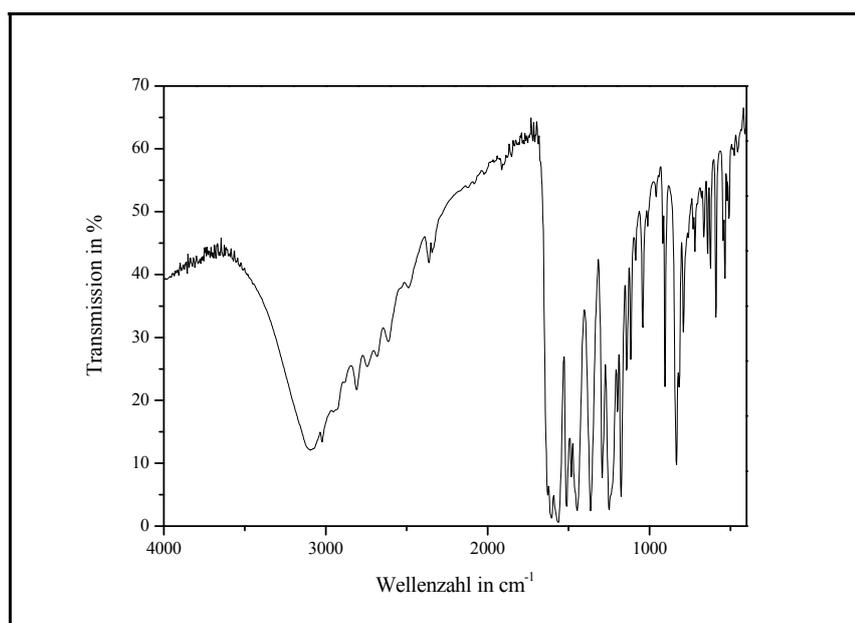
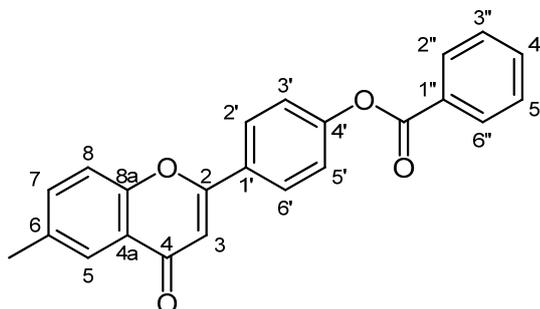


Abb. 121: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Hydroxy-6-methylflavon (X42)

Massenspektrum (EI, 140 °C):

m/z (%) = 253.3 (18), 252.2 (100) [M^+], 251.2 (20), 135.2 (35), 134.2 (30), 118.2 (10).

4.1.2.14 V14: 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (**X43**)

Unter Feuchtigkeitsausschluss werden 2.52 g (10.0 mmol) 4'-Hydroxy-6-methylflavon **X42** und 2.83 g (13.1 mmol) Benzoylchlorid (Merck, > 99%) in 5 ml absolutem Pyridin gelöst und 20 Minuten lang bei RT gerührt. Unter gutem Rühren wird die Mischung auf 60 ml verdünnte Salzsäure (3 %), welche 20 g Eis enthält, gegossen. Der ausgefallene Feststoff wird nacheinander mit etwas kaltem Methanol und Wasser gewaschen, bevor er im Exsiccator mit Orangegel getrocknet wird. Durch Umkristallisation aus Methanol erhält man einen farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 3.34 g (9.37 mmol), $M(C_{23}H_{16}O_4) = 356.4$ g/mol
94 % der Theorie

Smp.: 177 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 77.5 % C, 4.5 % H; Gefunden: 77.2 % C, 4.3 % H

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297$ K, CDCl_3):

$\delta = 2.48$ (s, 3H, **6-CH₃**), 6.81 (s, 1H, **3-H**), 7.40 (m, 2H, $|N| = 8.7$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.48 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, **8-H**), 7.52 (dd, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, **7-H**), 7.54 (tt, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, 4J n.a., **3''**, **5''-CH**), 7.67 (tt, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, 4J n.a., **4''-CH**), 8.00 (m, 2H, $|N| = 8.7$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**), 8.03 (d, 1H, $^4J = 2.0$ Hz, **5-H**), 8.23 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, **2''**, **6''-H**) ppm.

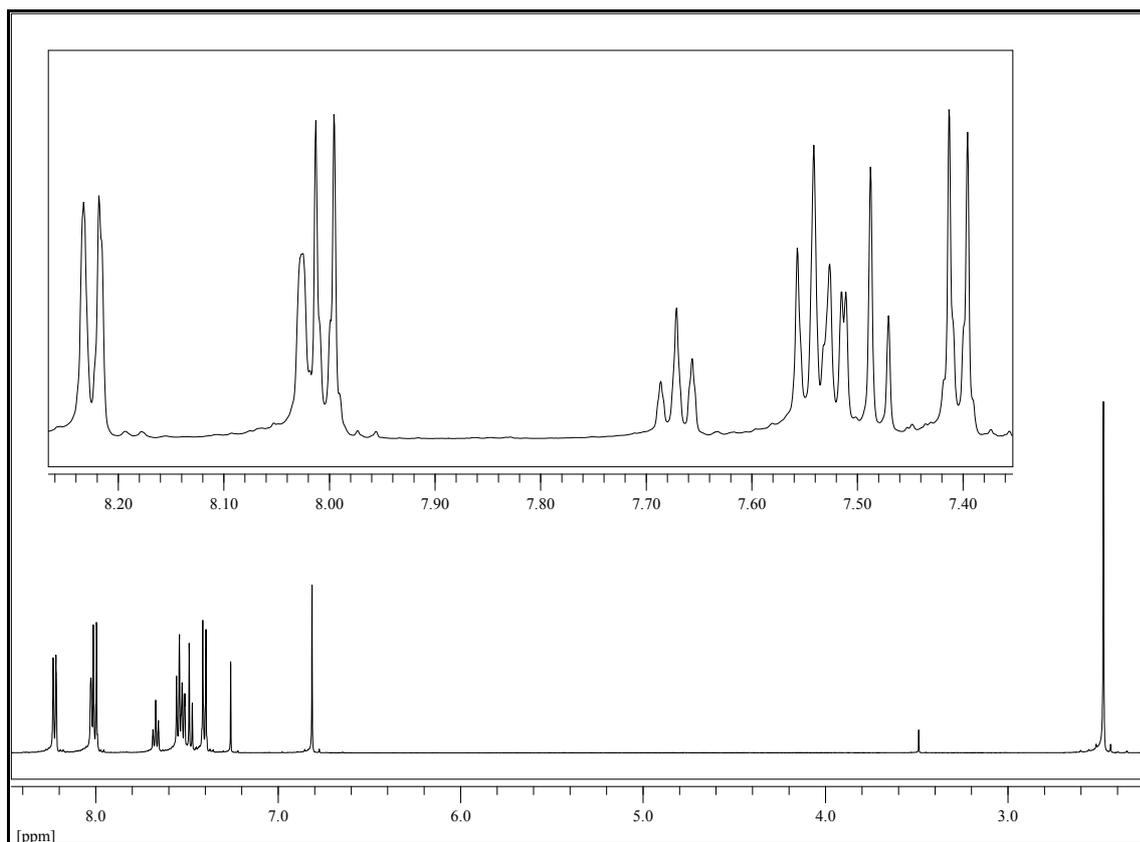


Abb. 122: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (**X43**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 20.92$ (**6-CH₃**), 107.42 (**3-CH**), 117.80 (**8-CH**), 122.45 (2C, **3'**, **5'-CH**), 123.55 (**4a-C**), 125.06 (**5-CH**), 127.65 (2C, **2'**, **6'-CH**), 128.67 (2C, **3''**, **5''-CH**), 129.03 (**1''-C**), 129.52 (**1'-C**), 130.24 (2C, **2''**, **6''-CH**), 133.91 (**4''-CH**), 135.02 (**6-C**), 135.27 (**7-CH**), 153.44 (**4'-C**), 154.49 (**8a-C**), 162.42 (**2-C**), 164.69 (**COO**), 178.43 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\max.} (\log \epsilon) = 259 (4.42), 301 (4.50) \text{ nm.}$

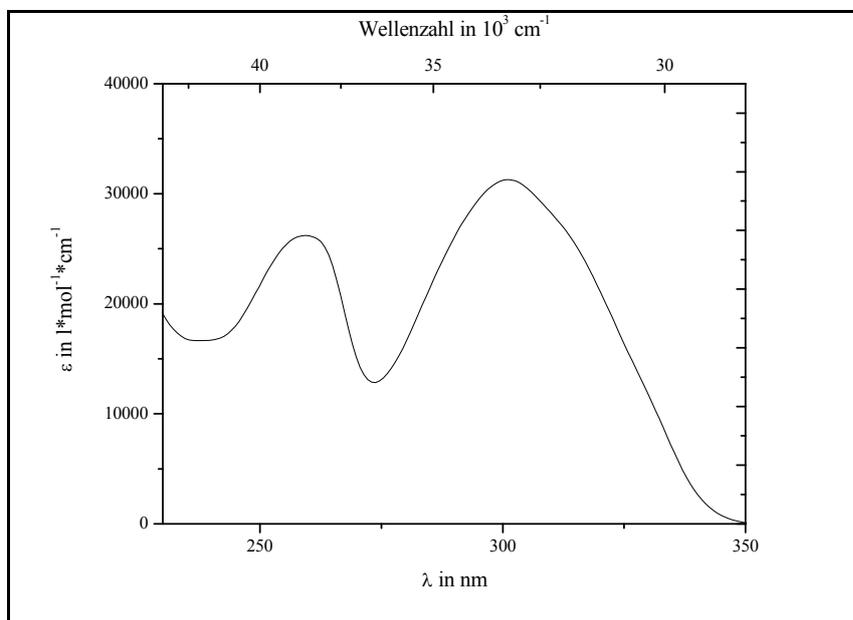


Abb. 123: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (X43)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3047 (w, Aryl-H-Val.), 2921 (w, CH₃-Val.), 1763 (s, arom. Ester, C=O-Val.), 1649 (s, α,β -unges. Keton), 1615 (s, arom. C=C-Val.), 1506 (m, arom. C=C-Val.), 1450 (m, CH₃-Def.), 1359 (m, sym. CH₃-Def.), 1261 (s, C-O-C-Val.), 905 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 849 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 708 (m, monosubst. Aromat, fünf benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

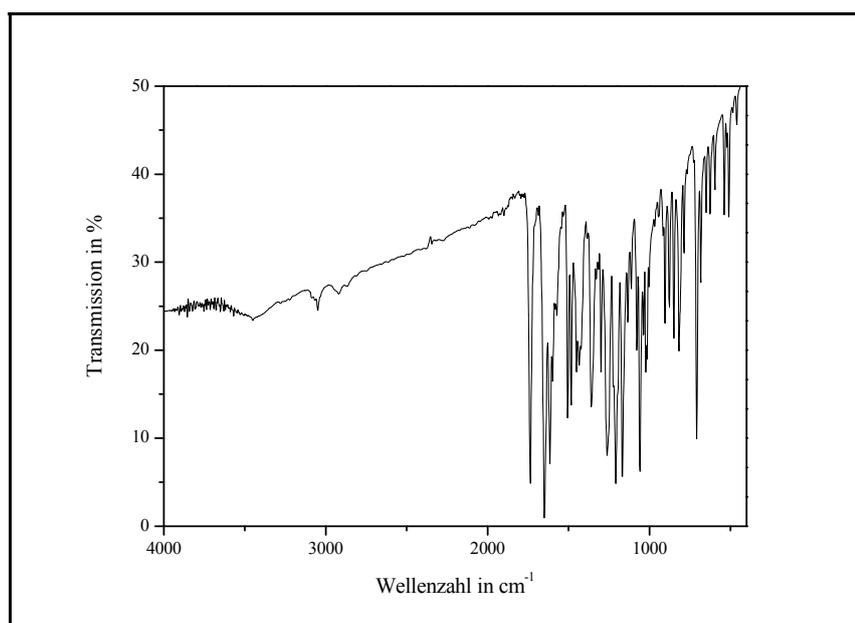
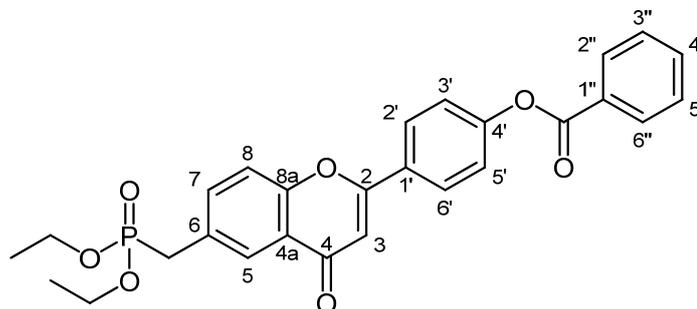


Abb. 124: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (X43)

Massenspektrum (EI, 140 °C):

m/z (%) = 356.3 (7.1) [M^+], 252.2 (4.8), 226.2 (5.8), 122.2 (18), 106.2 (9.1), 105.2 (100), 79.2 (55), 78.2 (12), 77.2 (41), 52.2 (28), 51.1 (26), 50.1 (12).

4.1.2.15 V15: 4'-Benzoyloxy-6-[(diethoxyphosphoryl)methyl]flavon (**X45**)

2.00 g (5.61 mmol) 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (**X43**) werden in 15 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. 1.11 g (6.30 mmol) NBS und 150 mg (0.911 mmol) AIBN werden hinzugefügt und es wird fünf Stunden lang unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach leichtem Abkühlen wird das ausgefallene Succinimid abfiltriert. Nach weiterer Abkühlung kristallisiert das 4'-Benzoyloxy-6-brommethylflavon (**X44**) als hellgelber Feststoff (1.12 g).

$M(C_{23}H_{15}^{81/79}BrO_4) = 435.27 \text{ g/mol}$; Massenspektrum (EI, 260 °C):

m/z (%) = 436.1 (46) [$M^+(^{81}Br)$], 434.1 (44) [$M^+(^{79}Br)$], 357 (58) [-Br, +H], 356 (75) [-Br], 223.2 (25) [RDA_{Dienophil}], 133.2 (48) [RDA_{Dien} -Br], 106.3 (77), 105.2 (100), 77.2 (89)

Ohne weitere Aufreinigung werden 1.10 g (ca. 2.5 mmol) des 4'-Benzoyloxy-6-brommethylflavons (**X44**) und 520 mg (3.25 mmol) Triethylphosphit (TEP, Aldrich, 98 %) sechs Stunden lang bei 140 °C unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das überschüssige TEP wird unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt aus Toluol umkristallisiert. Man erhält einen farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.960 g (1.95 mmol), $M(C_{27}H_{25}O_7P) = 492.5 \text{ g/mol}$
35 % über beide Stufen

Smp.: 145 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 65.9 % C, 5.1 % H; Gefunden: 65.9 % C, 5.1 % H

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 1.27$ (t, 6H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1\text{ Hz}$, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 3.27 (d, 2H, $^2J_{\text{P-H}} = 21.5\text{ Hz}$, 6-C CH_2P), 4.06 (dq, 4H, $^3J_{\text{P-H}} = 8.1\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1\text{ Hz}$, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}^*$), 6.82 (s, 1H, **3-H**), 7.41 (m, 2H, $|N| = 8.8\text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.54 (tt, 2H, $^3J = 7.8\text{ Hz}$, $^4J_{\text{n.a.}}$, **3''**, **5''-CH**), 7.55 (d, 1H, $^3J = 8.8\text{ Hz}$, **8-H**), 7.67 (tt, 1H, $^3J = 7.5\text{ Hz}$, $^4J = 1.2\text{ Hz}$, **4''-CH**), 7.73 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 8.6\text{ Hz}$, $^4J_{\text{H-H}} = 2.2\text{ Hz}$, $^4J_{\text{P-H}} = 2.2\text{ Hz}$, **7-H**), 8.00 (m, 2H, $|N| = 8.8\text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**), 8.10 (dd, 1H, $^4J_{\text{P-H}} = 2.5\text{ Hz}$, $^4J_{\text{H-H}} = 2.5\text{ Hz}$, **5-H**), 8.22 (m, 1H, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, **2''**, **6''-H**) ppm.

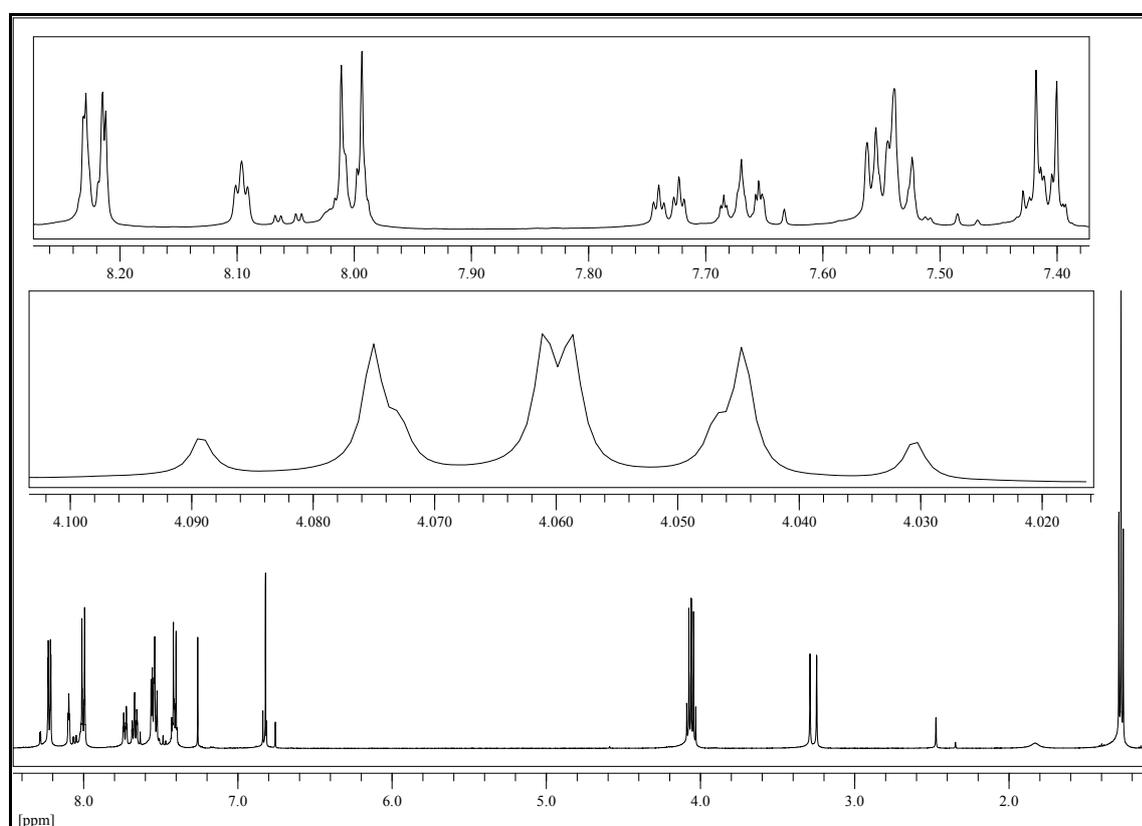


Abb. 125: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 4'-Benzoyloxy-6-[(diethoxyphosphoryl)methyl]flavon (**X45**), $T = 296\text{ K}$

* die beiden diastereotopen Protonen sind zufällig isochron

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 16.35$ (d, 2C, $^3J_{\text{P-C}} = 6.1\text{ Hz}$, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 33.21 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 138.7\text{ Hz}$, 6-C CH_2P), 62.27 (d, 2C, $^2J_{\text{P-C}} = 6.7\text{ Hz}$, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 107.56 (**3-CH**), 118.40 (d, $^4J = 2.7\text{ Hz}$, **8-CH**), 122.52 (2C, **3'**, **5'-CH**), 123.55 (d, $^4J_{\text{P-C}} = 2.6\text{ Hz}$, **4a-C**), 126.35 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 8.0\text{ Hz}$, **5-CH**), 127.71 (2C, **2'**, **6'-CH**), 128.68 (2C, **3''**, **5''-CH**), 128.99 (**1''-C**), 129.33 (**1'-C**), 129.44 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 9.3\text{ Hz}$, **6-C**), 130.25 (2C, **2''**, **6''-CH**), 133.94 (**4''-CH**), 135.38 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 4.9\text{ Hz}$, **7-CH**), 153.55 (**4'-C**), 155.25 (d, $^5J_{\text{P-C}} = 3.1\text{ Hz}$, **8a-C**), 162.62 (**2-C**), 164.70 (**COO**), 178.01 (**4-C**) ppm.

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₈₁ ($T = 296\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 26.49$ ppm.

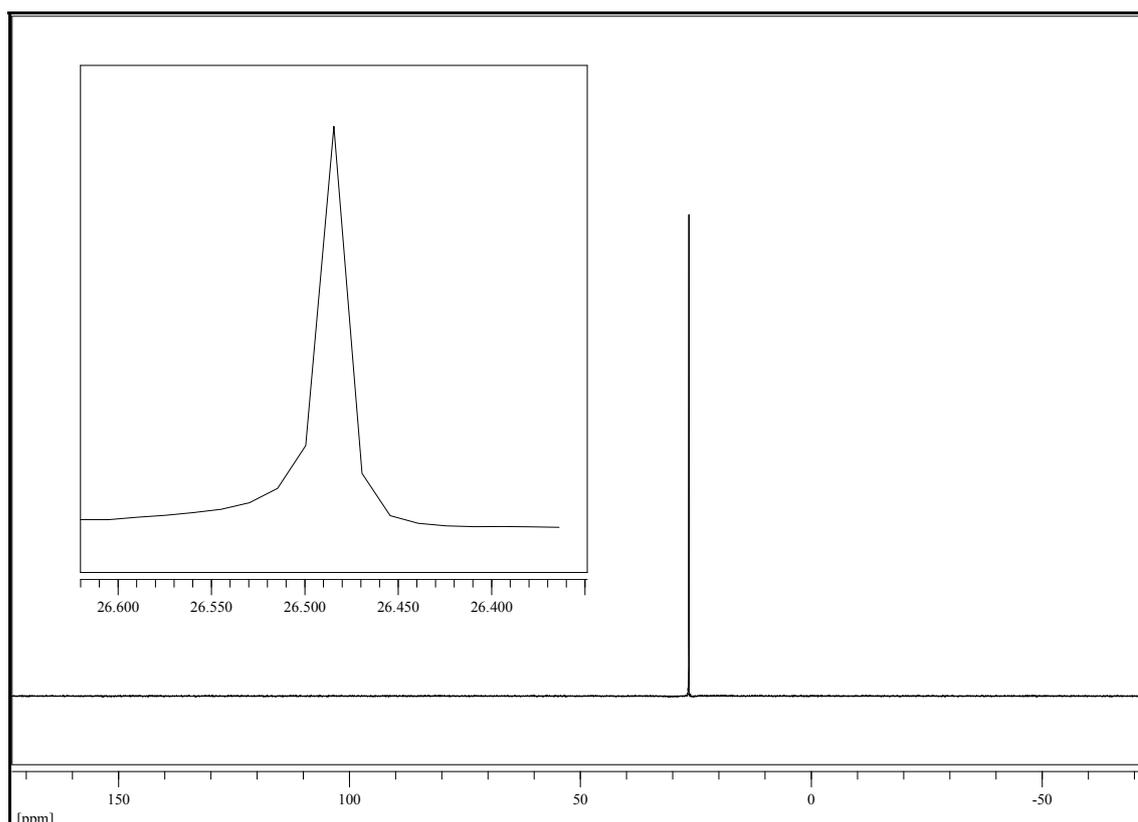


Abb. 126: $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3) von 4'-Benzoyloxy-6-[(diethoxyphosphoryl)methyl]flavon (**X45**), $T = 296\text{ K}$

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3063$ (w, Aryl-H-Val.), 2982 (w, Aryl-H-Val.), 2906 (w, CH₂-Val.), 1730 (s, aromat. Ester, C=O-Val.), 1645 (s, α,β -unges. Keton), 1618 (m, aromat. C=C-Val.), 1507 (m, aromat. C=C-Val.), 1451 (m, CH₂/CH₃-Def.), 1359 (m, sym. CH₃-Def.), 1268 (s, P=O-Val.), 1258 (s, C-O-C-Val.), 1026 (s, P-O-Et), 910 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 854 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 711 (m, monosubst. Aromat, fünf benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

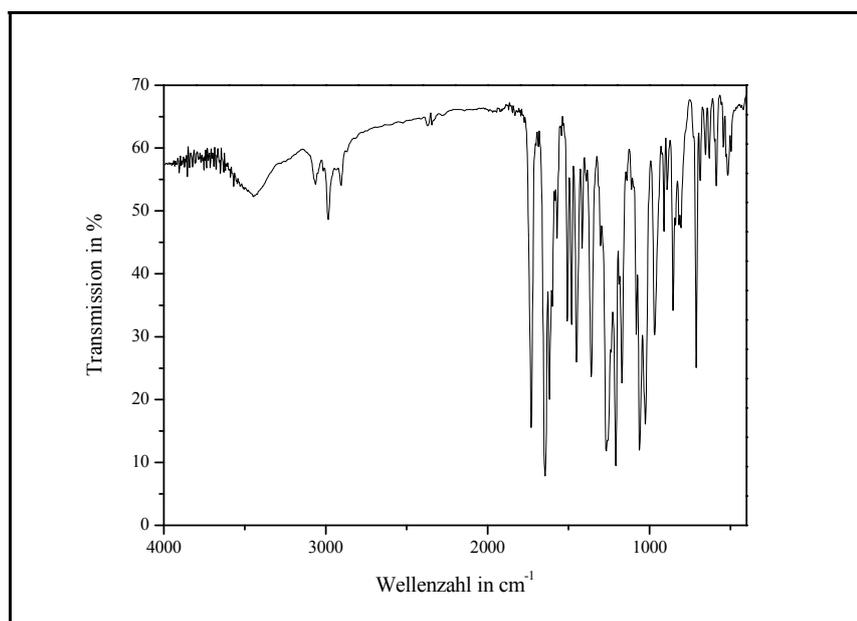


Abb. 127: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Benzoyloxy-6-[(diethoxyphosphoryl)methyl]flavon (X45)

Massenspektrum (EI, 200 °C):

m/z (%) = 493.2 (7.1), 492.2 (21) [M^+], 356.3 (5.8), 106.2 (8.4), 105.2 (100), 77.2 (13).

Massenspektrum (MALDI, DIT [$CHCl_3$]):

m/z (%) = 493.1 (100) [$M+1$], 494.1 (28).

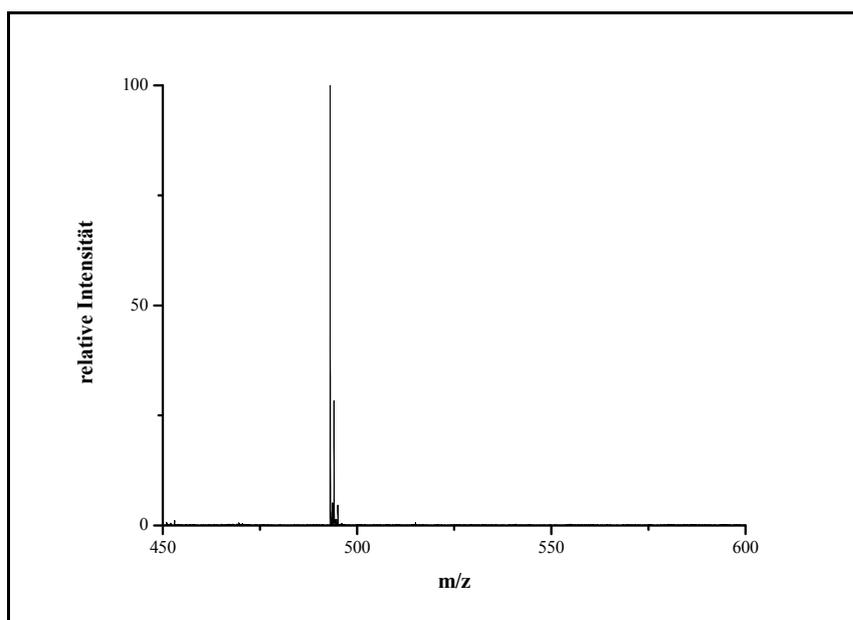
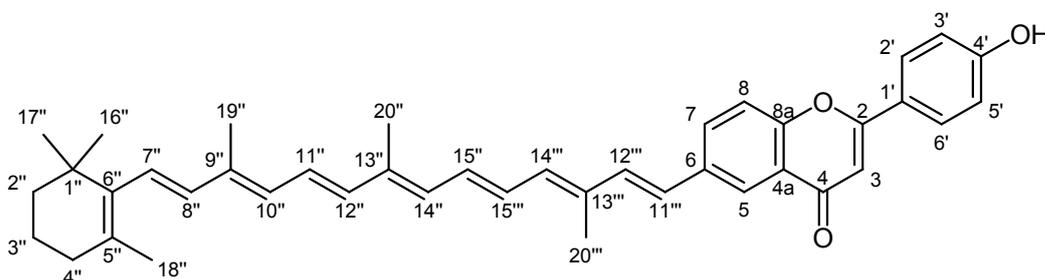


Abb. 128: MALDI-Spektrum (DIT, $CHCl_3$) von 4'-Benzoyloxy-6-[(diethoxyphosphoryl)methyl]flavon (X45)

4.1.2.16 V16: 6-(11'-Apo-β-carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**)

Unter Argon und Lichtausschluss werden 50 mg (0.14 mmol) des C₂₅-Aldehyds **BASF2** und 246 mg (0.50 mmol) des Flavonphosphonats **X45** bei 0 °C in 20 ml absolutem Pyridin gelöst. Über einen Zeitraum von einer Stunde werden 5.0 ml (5.0 mmol) einer frisch hergestellten Lithiummethanolat-Lösung (1M in Ethanol) hinzuge tropft und fünf Tage lang bei RT weitergerührt. Der Ansatz wird mit Dünnsäure hydrolysiert und mit Chloroform extrahiert. Anschließend wird mit Dünnsäure und Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird an Kieselgel 60 mit einem DCM/Et₂O-Gemisch [1:1 (DC: R_f = 0.64)] als Laufmittel chromatographiert. Es wird ein roter amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 30 mg (0.051 mmol), M(C₄₁H₄₄O₃) = 584.8 g/mol

36 % der Theorie

Smp.: 216 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 84.2 % C, 7.6 % H; Gefunden: 83.9 % C, 7.8 % H

Massenfeinbestimmung (ESIpos, DCM+MeOH):

Berechnet (C₄₁H₄₄O₃+Na): 607.3183; Gefunden: 607.3185

$^1\text{H-NMR}_{500}$ [$T = 299$ K, $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$ (3:1)]:

$\delta = 0.97$ (s, 6H, **16''**- & **17''**-**CH₃**), 1.39-1.43 (m, 2H, **2''**-**CH₂**), 1.52-1.59 (m, 2H, **3''**-**CH₂**), 1.66 (s, 3H, **18''**-**CH₃**), 1.92 (s, 3H, **19''**-**CH₃**), 1.94-1.99 (m, 2H, **4''**-**CH₂**), 1.94 (s, 3H, **20'''**-**CH₃**), 1.98 (s, 3H, **20''**-**CH₃**), 6.07 (d, 1), 6.10 (d, 1), 6.14 (d, 1), 6.21 (d, 1H, $^3J = 10.4$ Hz, **14'''**-**CH**), 6.31 (d, 1H, $^3J = 14.9$ Hz, **12''**-**CH**), 6.34 (d, 1H, $^3J = 10.4$ Hz, **14''**-**CH**), 6.59 (d, 1H, $^3J = 16.1$ Hz, **11'''**-**CH**), 6.60 (dd, 1H, $^3J = 13.9$ Hz, $^3J = 10.4$ Hz, **15''**-**CH**), 6.62 (dd, 1H, $^3J = 15.7$ Hz, $^3J = 11.4$ Hz, **11''**-**CH**), 6.65 (dd, 1H, $^3J = 13.9$ Hz, $^3J = 10.4$ Hz, **15'''**-**CH**), 6.67 (s, 1H, **3-CH**), 6.90 (m, 2H, $|N| = 8.8$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**- & **5'-CH**), 6.93 (d, 1H, $^3J = 16.0$ Hz, **12'''**-**CH**), 7.46 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, **8-CH**), 7.72 (dd, 1H, $^3J = 13.9$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, **7-CH**), 7.77 (m, 2H, $|N| = 8.8$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**- & **6'-CH**), 8.13 (d, 1H, $^4J = 2.1$ Hz, **5-CH**) ppm.

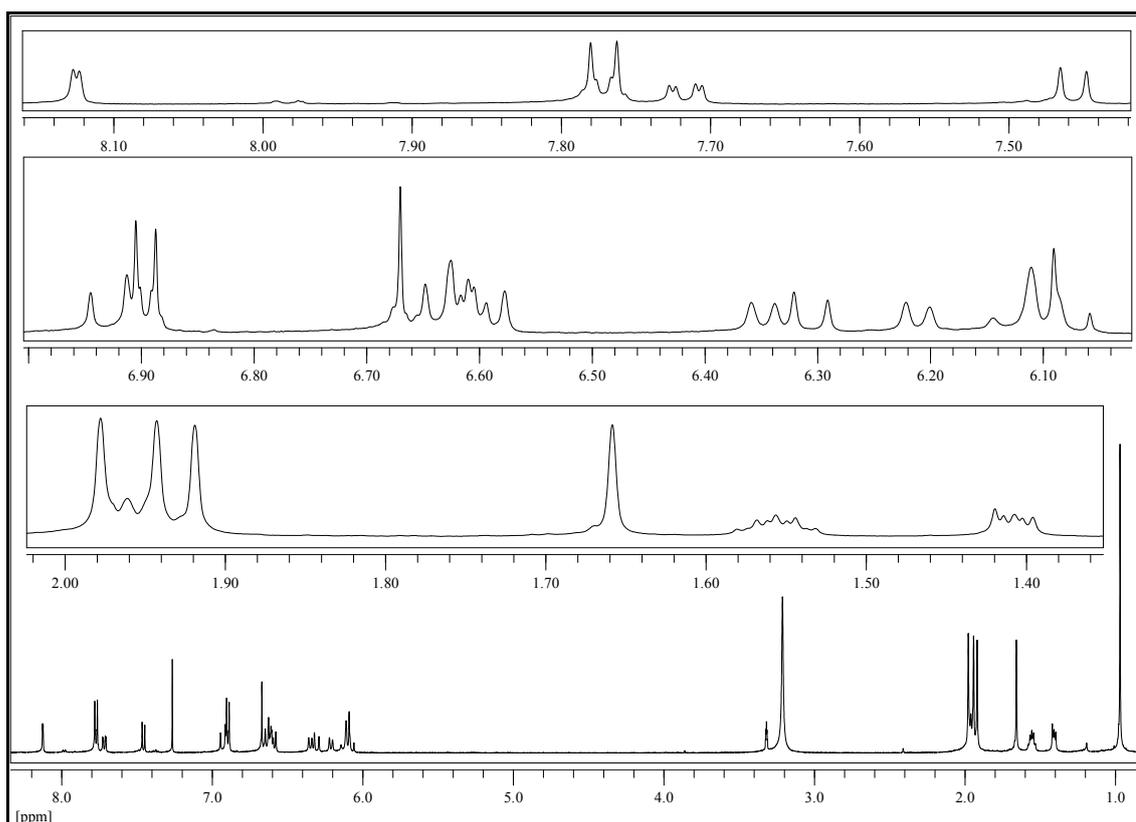


Abb. 129: $^1\text{H-NMR}_{500}$ [$\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$ (3:1)] von 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**),

$T = 299$ K

$^{13}\text{C-NMR}_{125}$ [$T = 299\text{ K}$, $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$ (3:1)]:

$\delta = 12.57$ (2C, $19''$ -, $20''$ - CH_3), 12.66 ($20'''$ - CH_3), 19.11 ($3''$ - CH_2), 21.58 ($18''$ - CH_3), 28.79 (2C, $16''$ -, $17''$ - CH_3), 32.96 ($4''$ - CH_2), 34.12 ($1''$ -C), 39.51 ($2''$ - CH_2), 104.99 (3-CH), 115.90 (2C, $3'$ -, $5'$ -CH), 118.26 (8-CH), 122.21 (5-CH), 122.38 ($1'$ -C), 123.58 (4a-C), 125.26 ($11''$ -CH), 125.48 ($11'''$ -CH), 126.69 ($7''$ -CH), 128.18 (2C, $2'$ -, $6'$ -CH), 129.30 ($5''$ -C), 129.44 ($15'''$ -CH), 130.61 ($10''$ -CH), 130.86 ($15''$ -CH), 131.46 (7-CH), 132.01 ($14'''$ -CH), 133.94 ($14''$ -CH), 134.864 ($12'''$ - CH_2), 135.19 (6-C), 135.23 ($13'''$ -C), 136.14 ($13''$ -C), 136.98 ($12''$ -CH), 137.03 ($9''$ -C), 137.59 ($8''$ -C), 137.77 ($6''$ -C), 155.20 (8a-C), 160.65 ($4'$ -C), 164.28 (2-C), 178.99 (4-C) ppm.

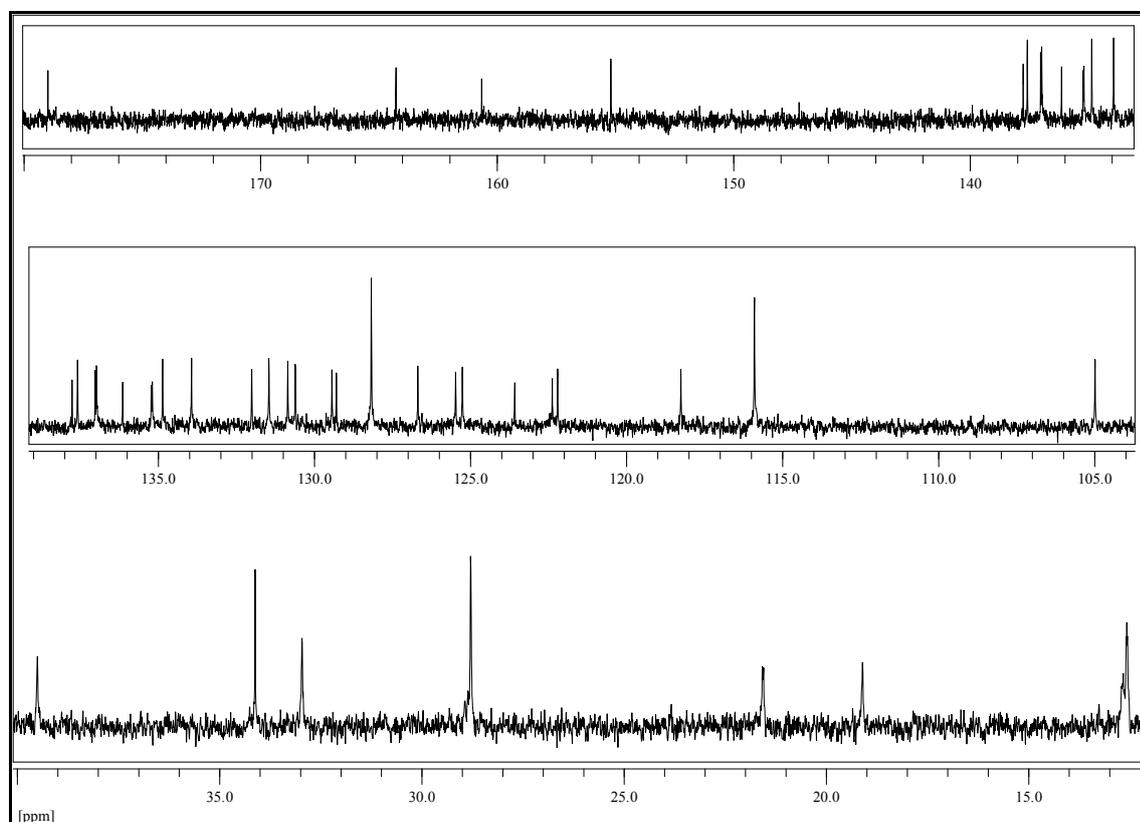


Abb. 130: $^{13}\text{C-NMR}_{125}$ [$\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$ (3:1)] von 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46),
 $T = 299\text{ K}$

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3231 (m, OH-Val.), 3025 (w, Aryl-H-Val.), 2955, 2917, 2863 (w, m, w, CH₂/CH₃-Val.), 1634 (s, α,β -unges. Keton, C=O), 1605, 1562, 1511 (s, s, s, Aromat. C=C-Val.), 1448 (s, CH₂/CH₃-Def.), 1364 (s, sym. CH₃-Def.), 965 (s, C=C-H-Def., oop, all-trans), 838 (w, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

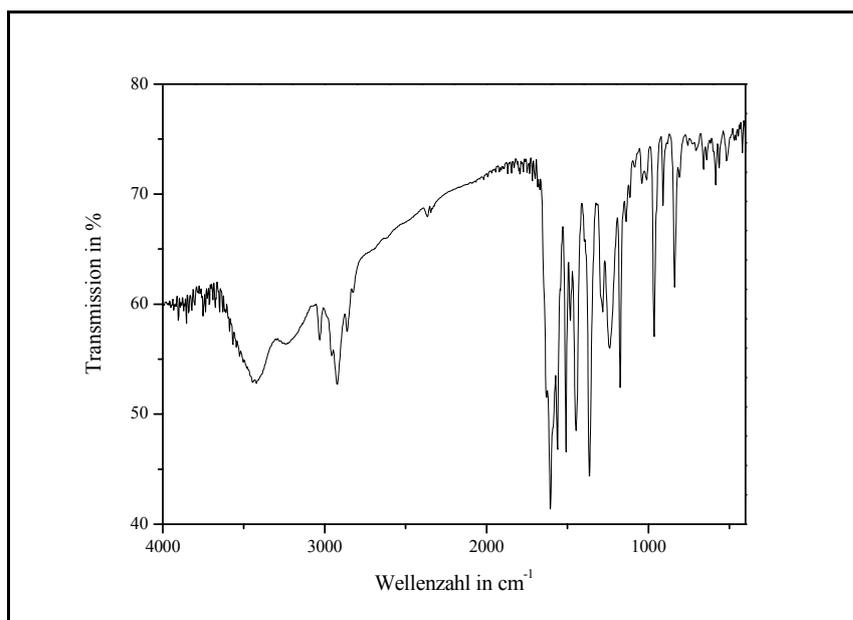


Abb. 131: IR-Spektrum (KBr) von 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46)

UV-VIS (Dichlormethan):

$\lambda_{\text{max.}} (\log \varepsilon) = 283 (4.44), 314 (4.49), 421 (\text{sh}), 443 (5.04), 467 (4.98) \text{ nm.}$

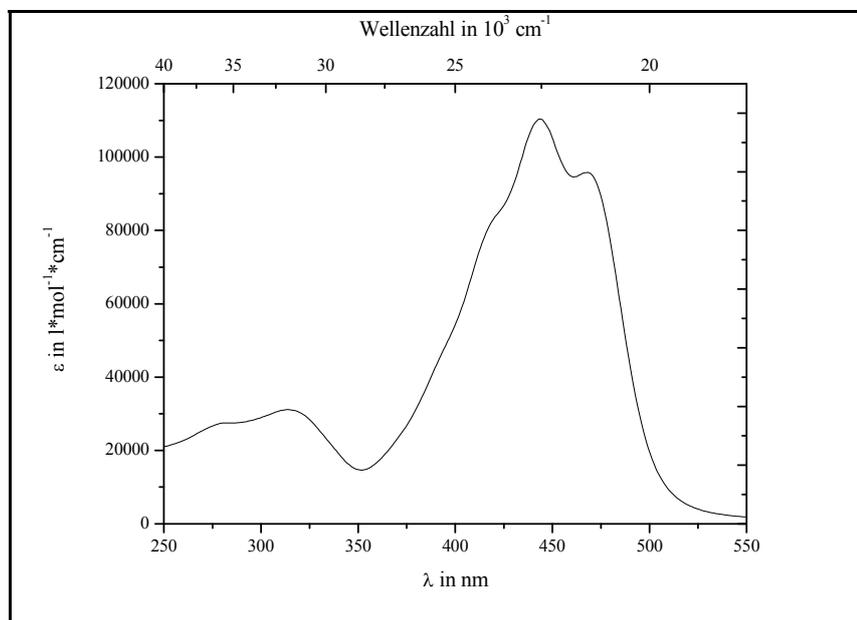


Abb. 132: UV-VIS-Spektrum (DCM) von 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46)

Massenspektrum [MALDI, DIT (MeOH/CHCl₃)]:

$m/z (\%) = 586.2 (35), 585.2 (100), 584.23 (71) [M^+].$

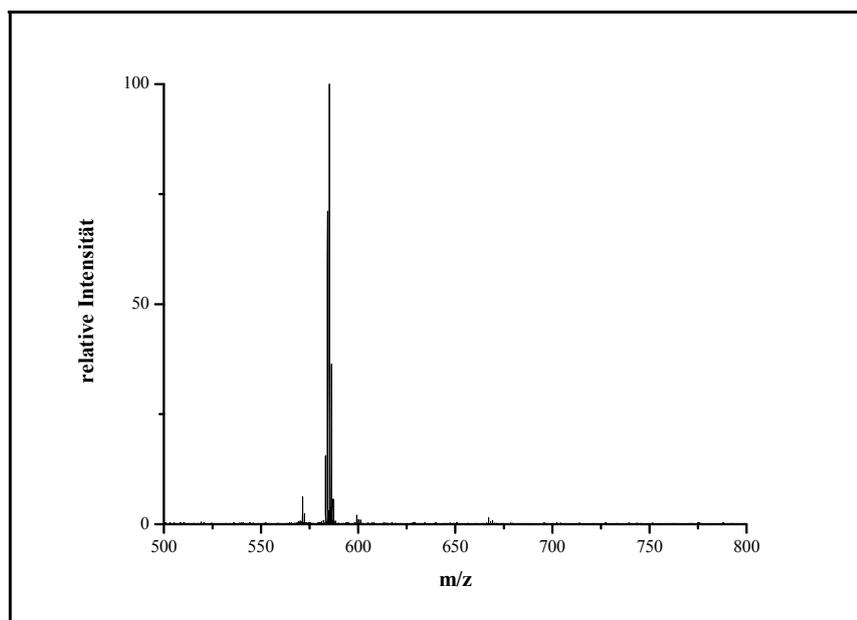
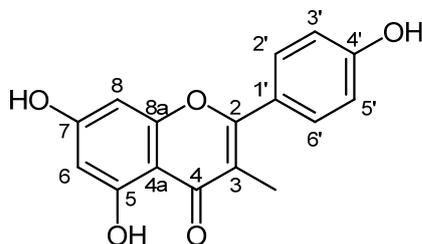


Abb. 133: MALDI [DIT (MeOH/CHCl₃)] von 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (X46)

4.1.2.17 V17: 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (**X69**)

5.00 g (27.4 mmol) 2',4',6'-Trihydroxypropiophenon (TCI, >98 %) und 23.0 g (132 mmol) p-Anisoylchlorid (Aldrich, 99 %) werden in einem Zweiphasensystem aus 225 ml Benzol und 225 ml gesättigter Kaliumcarbonatlösung bei 60 °C eine Stunde lang heftig gerührt. Nach Zugabe von 16.8 g (49.4 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (Acros, 98 %) wird dreieinhalb Stunden lang bei 60 °C weitergerührt. Nach dem Abtrennen der Benzolphase und Extraktion der orangefarbenen Zwischenphasenflüssigkeit mit 110 ml Chloroform, werden die organischen Phasen getrennt dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen und eingengt. Das rohe Diketon wird vier Stunden lang in 250 ml einer 5%igen Kaliumcarbonatlösung unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird filtriert und das Filtrat mit Kohlendioxid gesättigt, wodurch weiteres Produkt ausfällt. Die vereinigten Fällungen werden in 100 ml Eisessig fünf Minuten lang unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und auf 300 ml Eiswasser gegeben wodurch das 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-3-methylflavon (**X68**) ausfällt. Nach dem Trocknen wird die Etherspaltung in einigen Ansätzen aufgrund der begrenzten Reaktionsgefäßgröße durchgeführt. Hierzu wird das Flavon (**X68**) mit einem 10-fach-molaren Überschuss an Pyridinhydrochlorid (Aldrich, 98 %) vermengt und in einem Mikrowellenreaktor erst 10 Minuten lang bei 160 °C geschmolzen und anschließend 15 Minuten lang bei 240 °C gerührt. Anschließend wird das erstarrte Gemisch im Reaktionsgefäß geschmolzen und unter heftigem Rühren in 100 ml Eiswasser pro Gramm **X68** gegeben und eine Stunde lang stehen gelassen. Nach dem Absaugen und Waschen mit viel Wasser erhält man DC- [$R_f = 0.39$, Hexan/Ethylacetat (1:1)] und NMR-reines 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (**X69**).

Ausbeute: 6.23 g (21.9 mmol), $M(C_{16}H_{12}O_5) = 284.3$ g/mol

80 % der Theorie

Smp.: 305 °C

Lit.^[48]: 307-309 °C

$^1\text{H-NMR}_{200}$ ($T = 297\text{ K}$, DMSO-d_6):

$\delta = 2.01$ (s, 3H, **3-CH₃**), 6.18 (d, 1H, $^4J = 1.6\text{ Hz}$, **6-CH**), 6.34 (d, 1H, $^4J = 1.7\text{ Hz}$, **8-CH**), 6.93 (m, 2H, $|N| = 8.3\text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'-, 5'-CH**), 7.56 (m, 2H, $|N| = 8.2\text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'-, 6'-CH**), 10.16 (s, 1H, **4'-OH**), 10.78 (s, 1H, **7-OH**), 13.06 (s, 1H, **5-OH**...O=C) ppm.

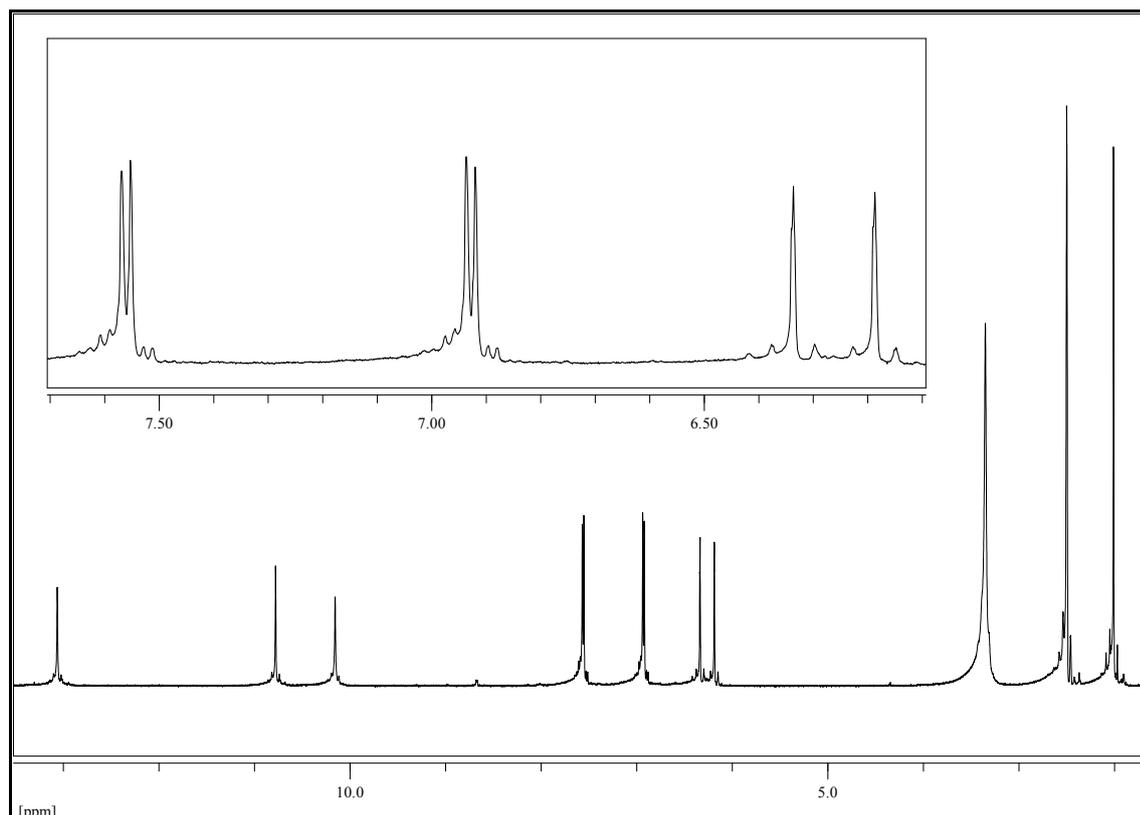


Abb. 134: $^1\text{H-NMR}_{200}$ (DMSO-d_6) von 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (**X69**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 297\text{ K}$, DMSO-d_6):

$\delta = 10.63$ (**3-CH₃**), 93.26 (**8-CH**), 98.47 (**6-C**), 102.68 (**4a-CH**), 113.41 (**3-C**), 115.23 (2C, **3'-, 5'-CH**), 122.81 (**1'-C**), 130.67 (2C, **2'-, 6'-CH**), 157.17 (**4'-C**), 159.53 (**8a-C**), 161.24 (**2-C**), 161.28 (**5-C**), 164.02 (**7-C**), 181.71 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\max.} (\log \epsilon) = 261 (4.39), 322 (4.18) \text{ nm.}$

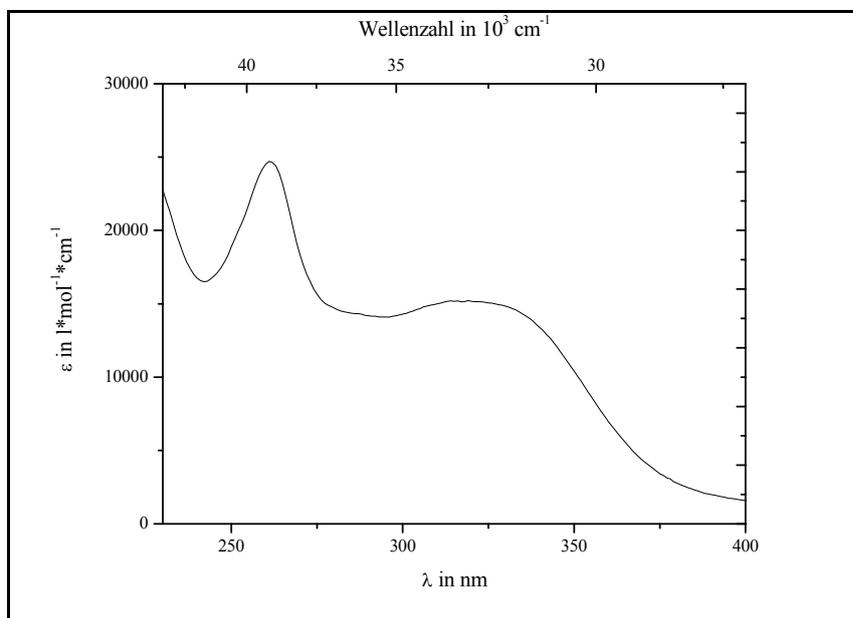


Abb. 135: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (X69)

IR (Golden Gate)

$\tilde{\nu}$ = 3453 (w, OH-Val.), 3114 (m, breit, OH-Val.), 2950 (w, CH₃-Val.), 2608 (w, OH-Val.), 1653 (m, α,β -unges. Keton), 1607 (s, arom. C=C-Val.), 1501 (s, arom. C=C-Val.), 1433 (m, CH₃-Def.), 1380 (m, OH-Def.), 1355 (m, sym. CH₃-Def.), 1290 (m, Aryl-OH), 845 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

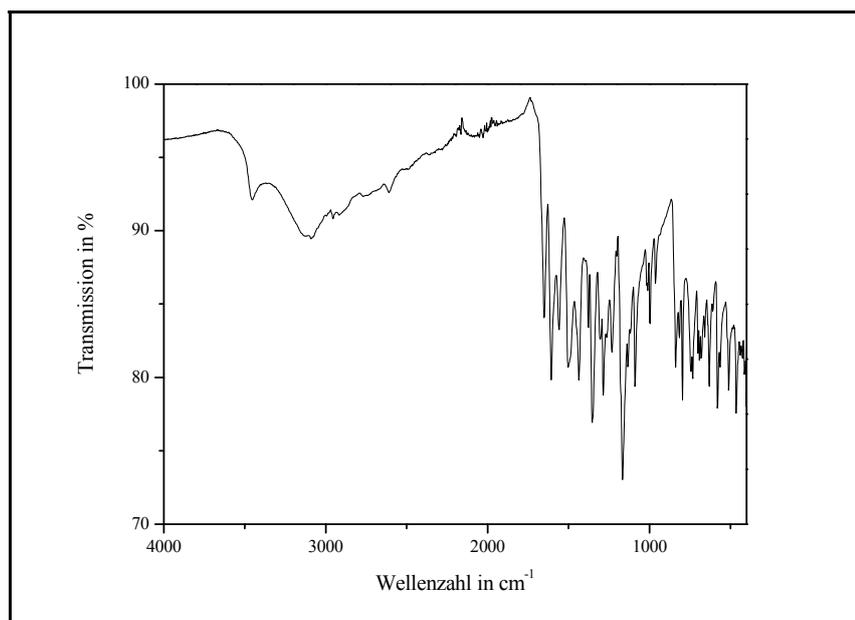
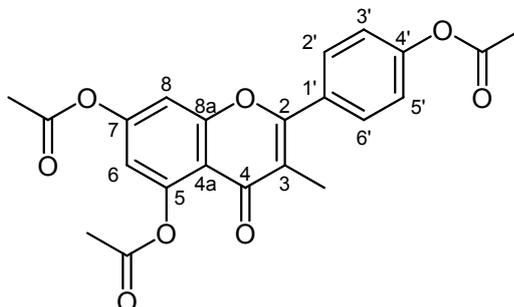


Abb. 136: IR-Spektrum (Golden Gate) von 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (X69)

Massenspektrum (EI, 250 °C):

m/z (%) = 284.2 (63), 283.2 (100) [**M**⁺], 153.2 (25) [**RDA**_{Dien}], 131.2 (53) [**RDA**_{En}], 77.1 (41), 69.1 (45).

4.1.2.18 V18: 5,7,4'-Triacetoxy-3-methylflavon (**X70**)

Unter Feuchtigkeitsausschluss werden 2.10 g (7.29 mmol) **X69** in 28 ml frisch über Natriumacetat destilliertem Essigsäureanhydrid gelöst. Nach Zugabe von 7 ml absolutem Pyridin wird der Ansatz fünfeinhalb Stunden lang auf 100 °C erwärmt und anschließend noch eine weitere Stunde unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 350 ml Ethylacetat und 500 ml Wasser extrahiert. Anschließend wird die organische Phase dreimal mit 400 ml einer 3%igen Natriumhydroxydlösung, je einmal mit 350 ml verdünnter Salzsäure, 500 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 300 ml gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösemittels im Vakuum wird das dreifach geschützte Flavon als beigefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.20 g (5.36 mmol), $M(C_{22}H_{18}O_8) = 410.4 \text{ g/mol}$
73 % der Theorie

Smp.: 151 °C Lit.^[48]: 146-150 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 64.4 % C, 4.4 % H; Gefunden: 64.2 % C, 4.5 % H

$^1\text{H-NMR}_{200}$ ($T = 297\text{ K}$, DMSO-d_6):

$\delta = 2.01$ (s, 3H, **3-CH₃**), 2.34 (s, 6H, **2 · Ac-CH₃**), 2.38 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 7.10 (d, 1H, $^4J = 2.2\text{ Hz}$, **6-CH**), 7.38 (m, 2H, $|N| = 8.5\text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'-, 5'-CH**), 7.48 (d, 1H, $^4J = 2.2\text{ Hz}$, **8-CH**), 7.82 (m, 2H, $|N| = 8.5\text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'-, 6'-CH**) ppm.

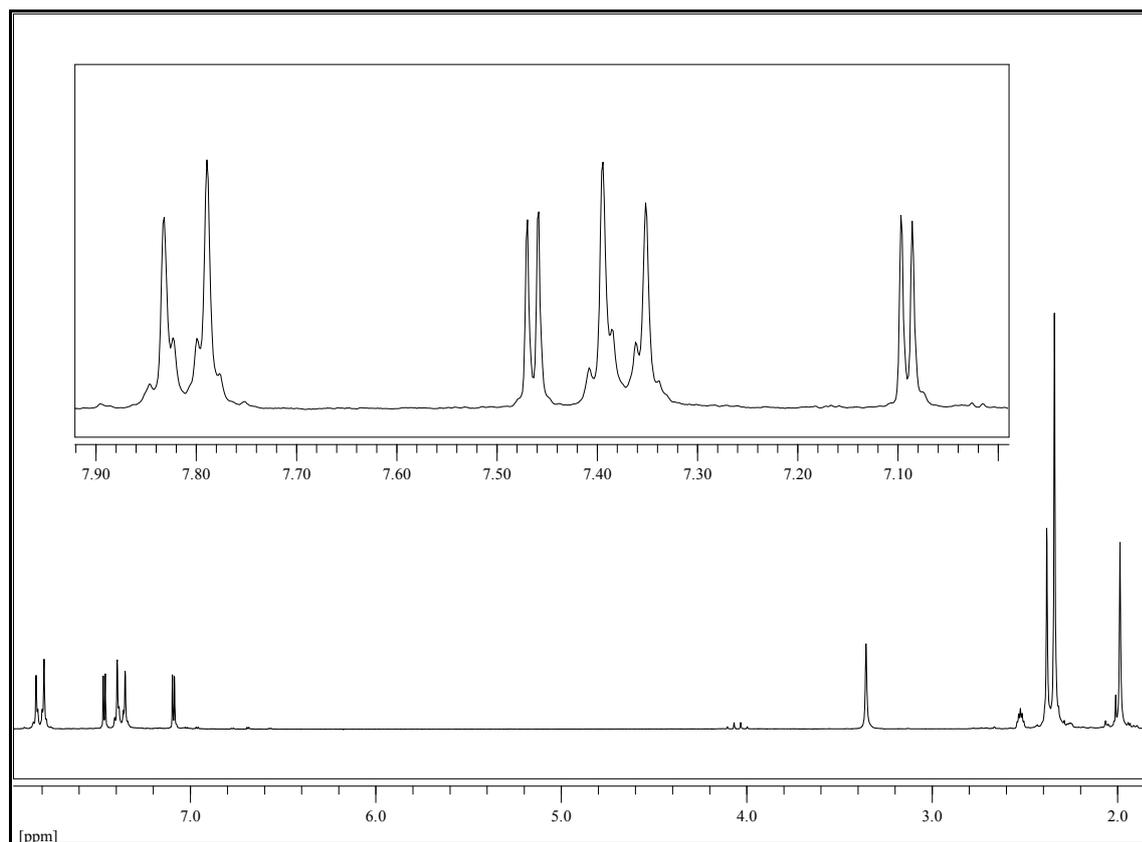


Abb. 137: $^1\text{H-NMR}_{200}$ (DMSO) von 5,7,4'-Triacetoxy-3-methylflavon (**X70**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 297\text{ K}$, DMSO-d_6):

$\delta = 11.17$ (**3-CH₃**), 20.80 (3C, **3 · Acetyl-CH₃**), 109.33 (**8-CH**), 112.84 (**4a-CH**), 113.88 (**6-C**), 117.49 (**3-C**), 122.08 (2C, **3'-, 5'-CH**), 129.71 (**1'-C**), 130.36 (2C, **2'-, 6'-CH**), 149.35 (**4'-C**), 151.89 (**5-C**), 153.67 (**8a-C**), 156.84 (**7-C**), 159.02 (**2-C**), 168.32 (**Ac-C=O**), 168.79 (**Ac-C=O**), 168.95 (**Ac-C=O**), 175.57 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\text{max.}} (\log \epsilon) = 287 (4.30), 305 (4.28) \text{ nm.}$

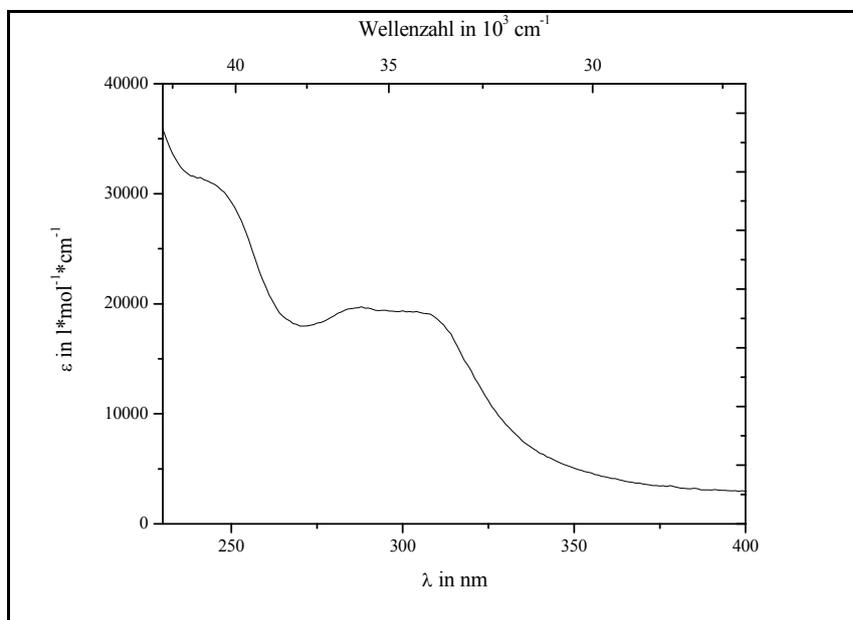


Abb. 138: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 5,7,4'-Triacetoxy-3-methylflavon (X70)

IR (Golden Gate)

$\tilde{\nu}$ = 2930 (w, CH₃-Val.), 1763 (m, phenol. Alkylester, C=O Val.), 1622 (m, α,β -unges. Keton), 1607 (w, aromat. C=C-Val.), 1511 (w, aromat. C=C-Val.), 1433 (m, CH₃-Def.), 1368 (m, sym. CH₃-Def.), 1193 (s, Ester, C-O -Val.), 1143 (s, Ester, C-O -Val.), 895 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 851 (w, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

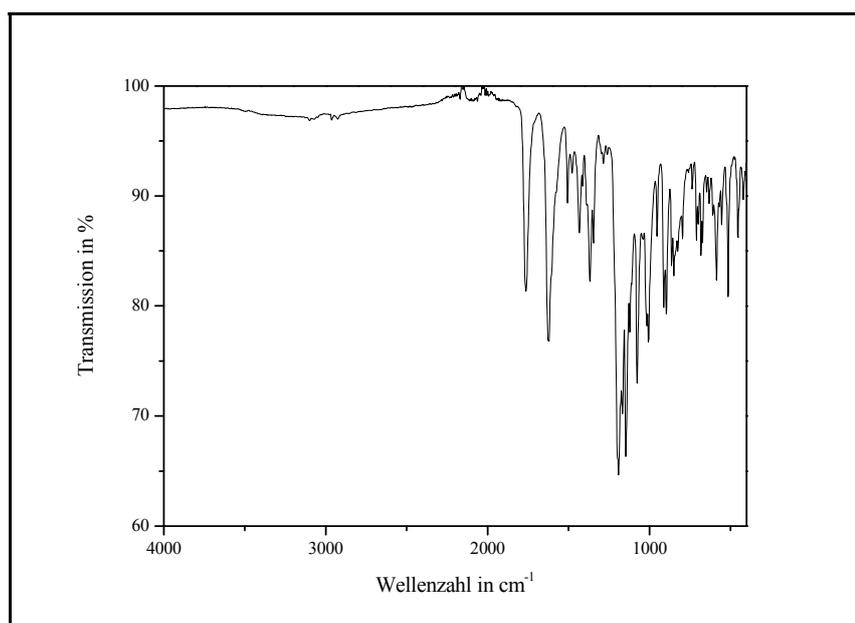
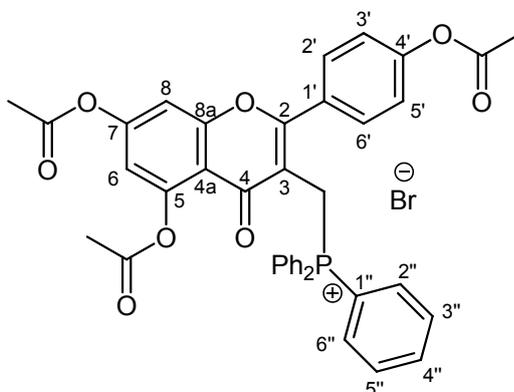


Abb. 139: IR-Spektrum (Golden Gate) von 5,7,4'-Triacetoxy-3-methylflavon (X70)

Massenspektrum (EI, 170 °C):

m/z (%) = 410.2 (0.8) [M⁺], 368.3 (8.3), 326.2 (6.1), 284.2 (11), 283.2 (13), 206.2 (8.1), 43 (100) [Ac].

4.1.2.19 V19: ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphoniumbromid (X72)



1.80 g (4.39 mmol) des geschützten Flavons **X70**, 996 mg (5.59 mmol) NBS (Merck, z.S.) und 170 mg (1.11 mmol) AIBN (Acros, 98 %) werden in 50 ml über Molekularsieb getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Der Ansatz wird für 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird eine Spatelspitze AIBN hinzugegeben und für weitere sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das ausgefallene Succinimid filtriert, das Filtrat im Vakuum eingeeengt und in 200 ml Ethylacetat aufgenommen. Es wird zweimal mit 300 ml warmem Wasser (ca. 35 °C) und anschließend mit 200 ml einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen. Nach Abzug des Lösemittels werden 2.50 g des Brommethylderivats **X71** als hellbrauner Feststoff erhalten.

$M(C_{22}H_{17}^{81/79}BrO_8) = 489.3 \text{ g/mol}$; Massenspektrum (EI, 180 °C):

m/z (%) = 490.3 (0.2) [$M^+(^{81}Br)$], 488.3 (0.2) [$M^+(^{79}Br)$], 448.2 (5.1) [-Ac], 446.2 (4.0) [-Ac], 409.4 (2.5) [-Br], 367.3 (9.0) [-Ac, -Br], 325.3 (32) [-2Ac, -Br], 283.3 (20) [-3Ac, -Br], 153.2 (5.3) [RDA_{Dien} -2Ac], 131.2 (20) [RDA_{En} -Ac, -Br], 43.2 (100) [Ac]

Es werden 2.35 g des rohen **X71** mit 3.31 g (12.6 mmol) Triphenylphosphin (Acros, 99 %) in 450 ml Toluol für acht Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen fällt das Phosphoniumsalz **X72** als farbloser amorpher, gummiartiger Feststoff. Zur weiteren Reinigung wird das Salz in der gerade zum Lösen notwendigen Menge Dichlormethan oder Methanol aufgenommen und in einen großen Überschuss Diethylether eingetropft, wodurch das Phosphoniumsalz **X72** analysenrein ausfällt.

Ausbeute: 2.40 g (3.19 mmol), $M(\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{BrO}_8\text{P}) = 751.6 \text{ g/mol}$

77 % über beide Stufen

Smp.: 153 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 63.9 % C, 4.3% H; Gefunden: 63.7 % C, 4.3 % H

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297 \text{ K}$, CD_3OD):

$\delta = 2.13$ (s, 3H, Ac-**CH**₃), 2.32 (s, 3H, Ac-**CH**₃), 2.38 (s, 3H, Ac-**CH**₃), 4.63 (m, ~1H, 3-CXYPPh₃Br [**X**, **Y** = ^1H oder ^2D]), 6.97 (d, 1H, $^4J = 2.0 \text{ Hz}$, **6-CH**), 7.28 (m, 2H, $|N| = 8.5 \text{ Hz}$, A-Teil eines [AB]₂-Systems, **3'-**, **5'-CH**), 7.31 (d, 1H, $^4J = 2 \text{ Hz}$, **8-CH**), 7.44 (m, 2H, $|N| = 8.4 \text{ Hz}$, B-Teil eines [AB]₂-Systems, **2'-**, **6'-CH**), 7.49 (m, 6H, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-P}}$ n.a., **2''-**, **6''-CH**), 7.62 (td, 3H, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, **3''-**, **5''-CH**), 7.81 (tt, 3H, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, **4''-CH**) ppm.

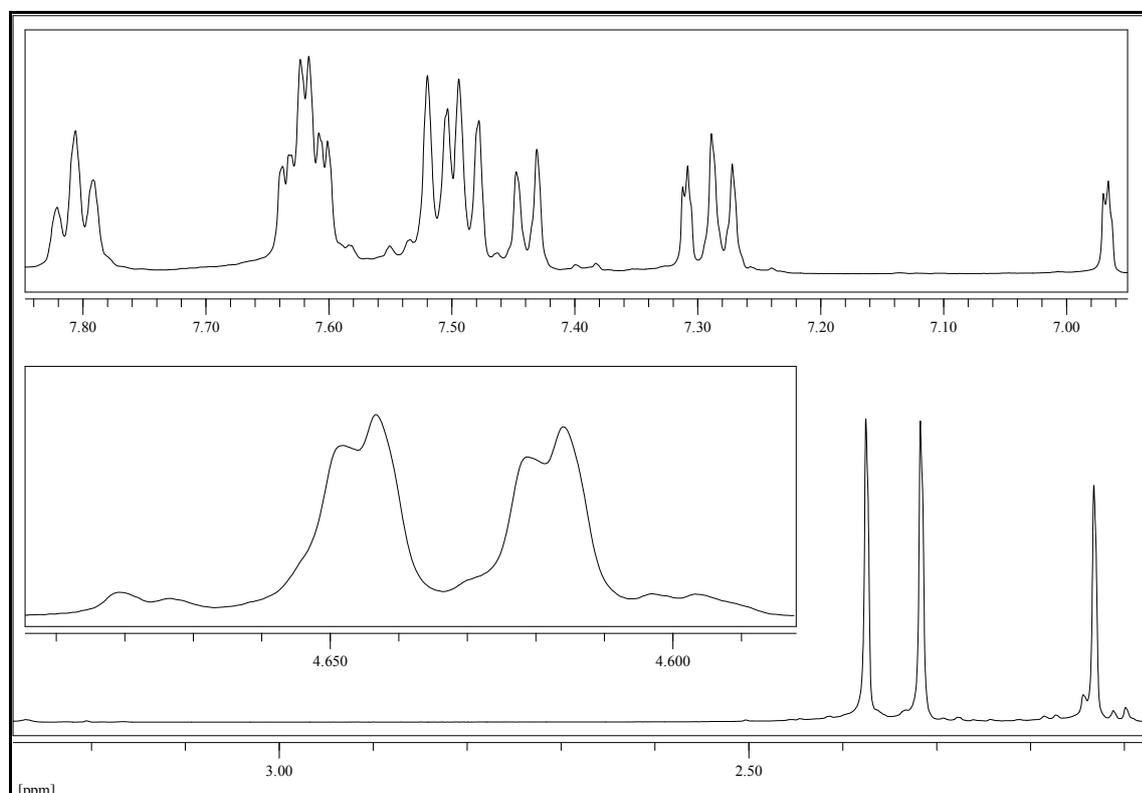


Abb. 140: $^1\text{H-NMR}_{500}$ von ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphonium-bromid (**X72**)

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ ($T = 297\text{ K}$, CD_3OD):

$\delta = 20.95$ (2C, $\mathbf{2} \cdot \text{Acetyl-CH}_3$), 21.01 (Acetyl- CH_3), $22.89\text{-}23.86$ (m, $\mathbf{3-CXYPPh}_3\text{Br}$ [$\mathbf{X}, \mathbf{Y} = ^1\text{H}$ oder ^2D]), 110.43 ($\mathbf{8-CH}$), 114.06 ($\mathbf{4a-C}$), 115.91 ($\mathbf{6-CH}$), 117.28 (m, 1C, $^2J_{\text{P-C}} = 9.6\text{ Hz}$, $^2J_{\text{D-C}}$ n.a., $\mathbf{3-C}$), 119.27 (dt, 3C, $^1J_{\text{P-C}} = 86,1\text{ Hz}$, $^3J_{\text{D-C}} = 3.0\text{ Hz}$, $\mathbf{1''-C}$), 123.31 (2C, $\mathbf{3''-}, \mathbf{5''-CH}$), 129.87 (d, $^4J_{\text{C-P}} = 1.6\text{ Hz}$, $\mathbf{1'-C}$), 131.28 (d, 6C, $^3J_{\text{C-P}} = 12.8\text{ Hz}$, $\mathbf{3''-}, \mathbf{5''-CH}$), 131.38 (2C, $\mathbf{2''-}, \mathbf{6'-CH}$), 135.23 (d, 6C, $^2J_{\text{C-P}} = 9.9\text{ Hz}$, $\mathbf{2''-}, \mathbf{6''-CH}$), 136.30 (d, 3C, $^4J_{\text{C-P}} = 2.9\text{ Hz}$, $\mathbf{4''-CH}$), 151.32 ($\mathbf{4'-C}$), 154.74 ($\mathbf{5-C}$), 156.60 ($\mathbf{8a-C}$), 158.57 ($\mathbf{7-C}$), 165.27 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.2\text{ Hz}$, $\mathbf{2-C}$), 169.69 ($\mathbf{Ac-C=O}$), 170.67 ($\mathbf{Ac-C=O}$), 170.74 ($\mathbf{Ac-C=O}$), 176.22 ($\mathbf{4-C}$) ppm.

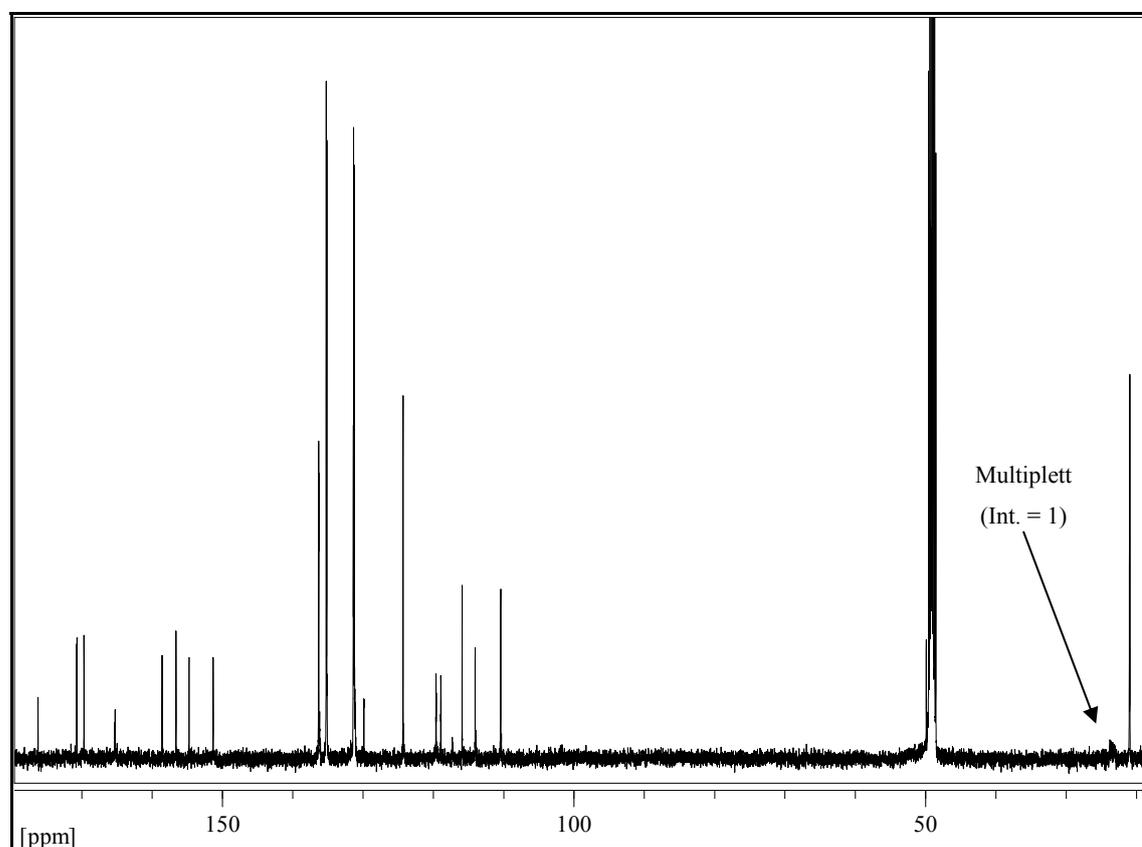


Abb. 141: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ von ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphonium-bromid ($\mathbf{X72}$), $T = 297\text{ K}$

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₂₀₂ ($T = 297\text{ K}$, CD_3OD):

$\delta = 22.06$ ($\text{CD}_2\text{PPh}_3\text{Br}$), 22.14 (CHDPPH_3Br), 22.21 ($\text{CH}_2\text{PPh}_3\text{Br}$) ppm.

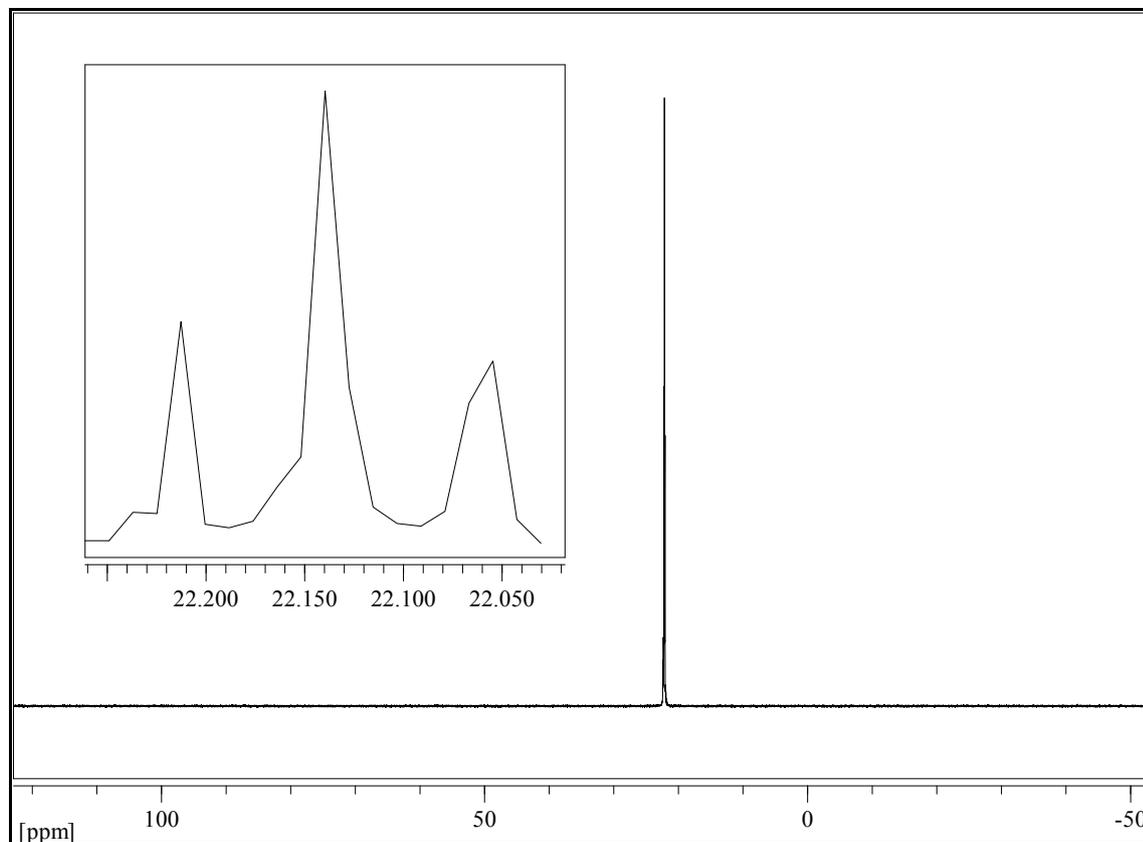


Abb. 142: $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₂₀₂ von ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphonium-bromid (X72), $T = 297\text{ K}$

IR (Golden Gate)

$\tilde{\nu}$ = 3052 (w, Aryl-H-Val.), 3003 (w, Aryl-H-Val.), 2925 (w, CH₂-Val.), 1767 (m, phenol. Alkylester, C=O Val.), 1622 (s, α,β -unges. Keton), 1604 (w, arom. C=C-Val.), 1509 (w, arom. C=C-Val.), 1440 (m, Phenyl-P), 1430 (m, CH₂/CH₃-Def.), 1360 (m, sym. CH₃-Def.), 1184, 1140 (s, s, Ester, C-O -Val.), 1106 (s, arom. C-P), 895 (m, isoliertes Ar-H, Def., oop), 840 (w, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 740 (m, monosubst. Aromat, fünf benachbarte Ar-H, Def., oop); 689 (s, monosubst. Aromat, fünf benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

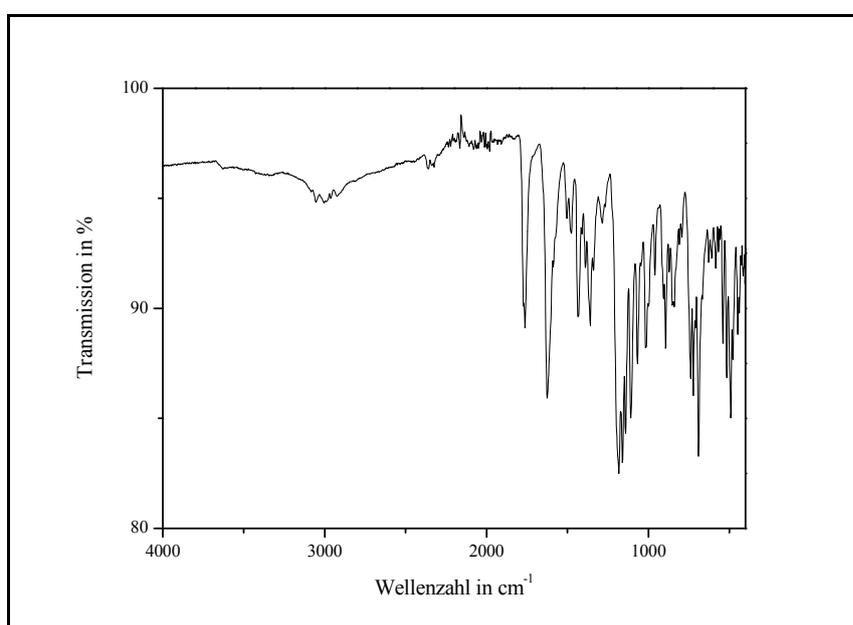


Abb. 143: IR-Spektrum (Golden Gate) von ((5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl)methyl)triphenylphosphoniumbromid (X72)

Massenspektrum (ESI-MS):

m/z (%) = 672.4 (42), 671.5 (100), [M^+], 629.4 (9) [-Ac], 367.2 (20) [-Ac, -PPh₃], 325.2 (30) [-2 · Ac, -PPh₃], 284.3 (15), 283.3 (92) [-3 · Ac, -PPh₃]

Massenspektrum: MALDI, DIT (CHCl₃):

m/z (%) = 616.2 (96) [**M**⁺], 617.2 (96) [**+H**], 618.2 (45) [**+2H**], 633.2(100) [**+OH**],
634.2(40) [**+OH**₂], 675.1 (16) [**+OH +Ac**], 696.1 (17) [**+OH +2Ac**].

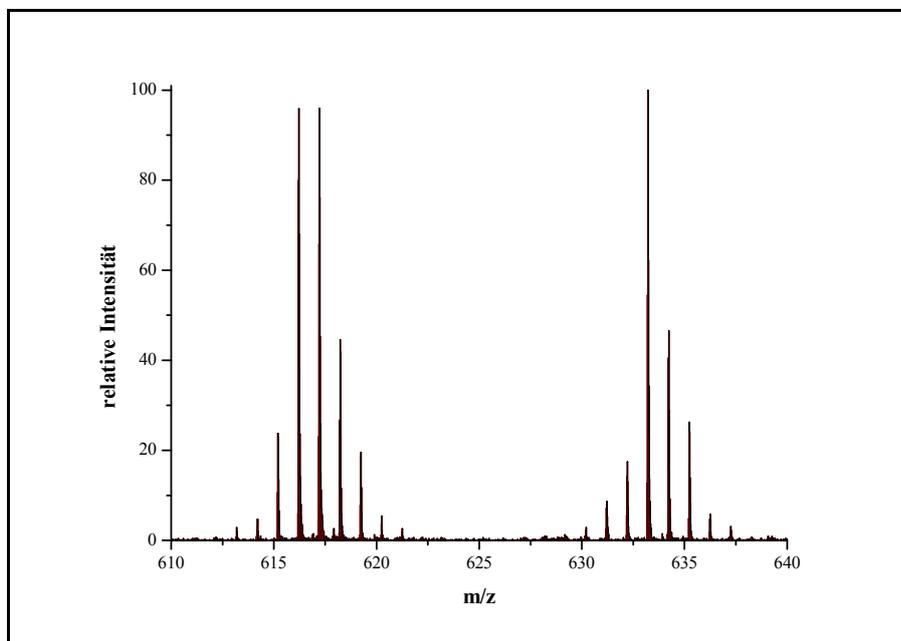
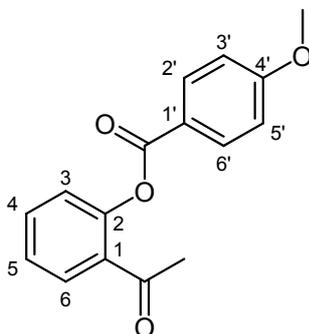


Abb. 144: MALDI-Massenspektrum DIT (CHCl₃) von 3-(11'-Apo- β -carotiny)-5,7,4'-trihydroxyflavon (X73)

4.1.2.21 V21: (2-Acetylphenyl)-4-methoxybenzoat (**X99**)

Unter Feuchtigkeitsausschluss werden 12.1 g (88.8 mmol) 2'-Hydroxyacetophenon (Merck, z.S.) und 20.0 g (133 mmol) *p*-Anisoylchlorid (Aldrich, 98 %) in 20 ml absolutem Pyridin bis zum Ende der Wärmeentwicklung (ca. 20 min) gerührt. Unter gutem Rühren wird die Mischung auf 600 ml verdünnte Salzsäure (3 %), welche 200 g Eis enthält, gegossen. Der ausgefallene Feststoff wird nacheinander mit etwas kaltem Methanol und Wasser gewaschen, bevor er im Exsiccator mit Orangegel getrocknet wird. Durch Umkristallisation aus Methanol erhält man einen voluminösen, hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 23.0 g (85.1 mmol), $M(C_{16}H_{14}O_4) = 270.3 \text{ g/mol}$

96 % der Theorie

Smp.: 112 °C

Lit.^[49]: 106-108 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 71.1 % C, 5.2 % H; Gefunden: 70.9 % C, 5.2 % H

$^1\text{H-NMR}_{200}$ ($T = 297 \text{ K}$, DMSO- d_6):

$\delta = 2.48$ (s, 3H, **Ac-CH₃**), 3.87 (s, 3H, **OCH₃**), 7.12 (m, 2 H, $|N| = 8.4 \text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.34 (d, 1H, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, **3-H**), 7.44 (t, 1H, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, **5-H**), 7.66 (t, 1H, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, **4-H**), 7.93 (d, 1H, $^3J = 7.3 \text{ Hz}$, **6-H**), 8.16 (m, 2 H, $|N| = 8.4 \text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**) ppm.

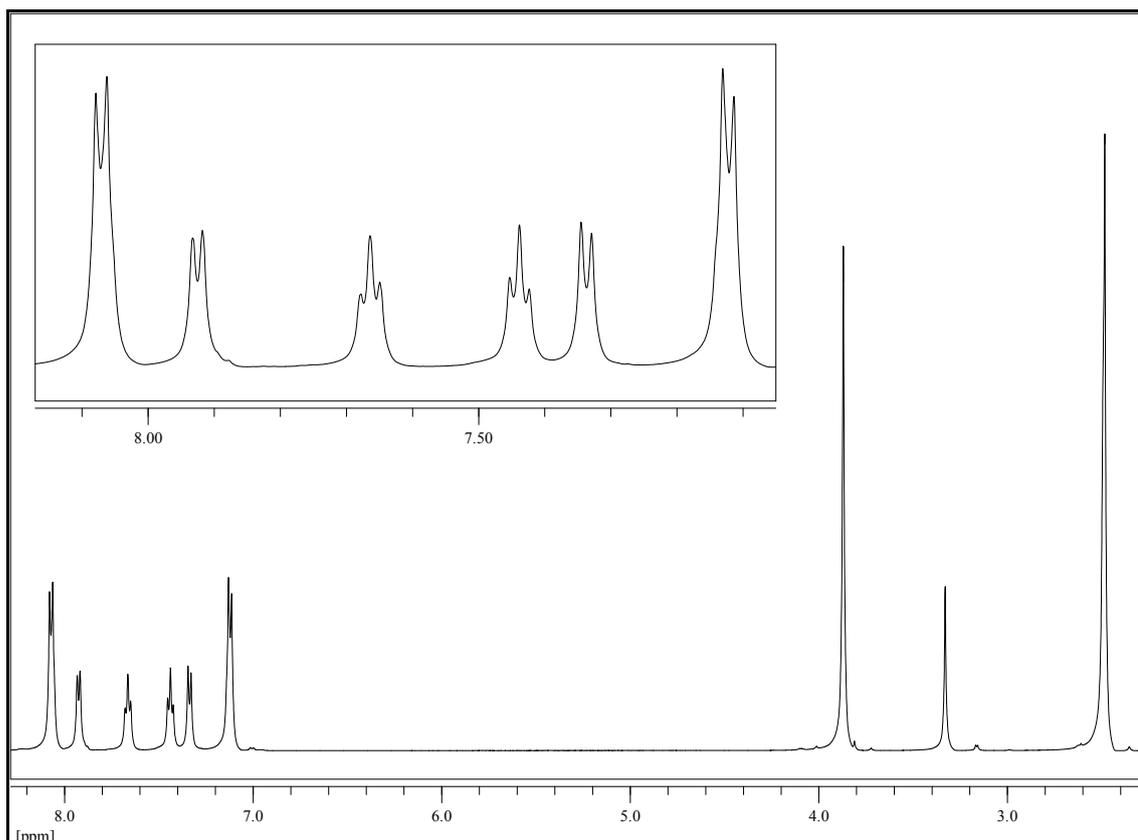


Abb. 145: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) von (2-Acetylphenyl)-4-methoxybenzoat (**X99**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR $_{125}$ ($T = 297\text{ K}$, DMSO- d_6):

$\delta = 29.48$ (**Ac-CH₃**), 55.58 (**OCH₃**), 114.20 (2C, **3'**, **5'-CH**), 120.87 (**1'-C**), 124.033 (**3-CH**), 126.16 (**5-CH**), 130.15 (**6-CH**), 130.97 (**1-C**), 132.07 (2C, **2'**, **6'-CH**), 133.46 (**4-C**), 148.60 (**2-C**), 163.71 (**COO**), 164.08 (**4'-C**), 197.38 (**Ac-C=O**) ppm.

IR (Golden Gate)

$\tilde{\nu}$ = 3004 (w, Aryl-H-Val.), 2969, 2940 (w, w, CH₃-Val.), 2840 (w, -OCH₃-Val.), 1720 (s, arom. Ester, C=O-Val.), 1681 (s, Arylketon, C=O-Val.), 1609, 1511 (s, m, arom. C=C-Val.), 1268 (s, Ester, C-O -Val.), 1255 (s, Aryl-alkylether, C-O-C-Val.), 1197 (s), 1065 (s, Ester, C-O -Val.), 836 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 755 (m, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

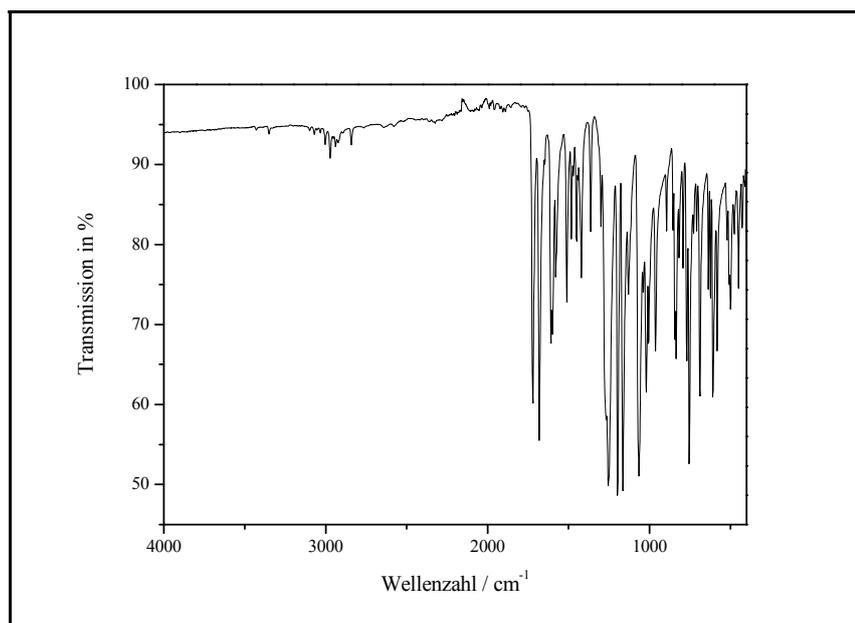
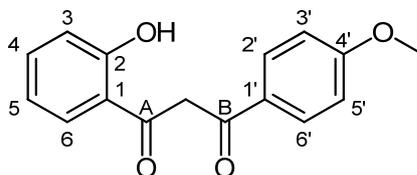


Abb. 146: IR-Spektrum (Golden Gate) von (2-Acetylphenyl)-4-methoxybenzoat (X99)

Massenspektrum (EI, 50 °C):

m/z (%) = 270.3 (4.5) [M^+], 135.2 (100), 92.2 (5.9), 77.2 (7.9).

4.1.2.22 V22: 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (**X100**)

20.4 g (75.5 mmol) **X99** werden in 125 ml absolutem Pyridin gelöst und auf 50 °C erwärmt. Zu der Lösung werden 7.00 g (123 mmol) heiß pulverisiertes Kaliumhydroxid gegeben und eine Stunde lang bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit 350 ml 10%iger Essigsäure versetzt. Der abfiltrierte Feststoff wird mit viel Wasser gewaschen bevor er aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält feine gelbe Nadeln.

Ausbeute: 17.4 g (64.2 mmol), $M(C_{16}H_{14}O_4) = 270.3$ g/mol
85 % der Theorie

Smp.: 103 °C Lit.^[49]: 109-110 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 71.1 % C, 5.2 % H; Gefunden: 71.1 % C, 5.2 % H

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 297$ K, CDCl_3):

$\delta = 3.86$ (s, 0.6H, OCH_3 , **Keto**), 3.86 (s, 3H, OCH_3 , **Enol**), 4.56 (s, 0.4H, CH_2 , **Keto**), 6.74 (s, 1H, CH , **Enol**), 6.89 (t, 1.2H, $^3J = 7.4$ Hz, **5-H**, **Keto & Enol**), 6.94 (m, 0.4 H, $|N| = 8.8$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H**, **Keto**), 6.96 (m, 2 H, $|N| = 8.8$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3', 5'-H**, **Enol**), 6.94-6.99 (m, 1.2 H, verdeckt, **3-H**, **Keto & Enol**), 7.43 (ddd, 1, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, **4-H**, **Enol**), 7.47 (ddd, 0.2H, $^3J = 8.5$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, **4-H**, **Keto**), 7.74 (dd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, **6-H**, **Enol**), 7.78 (dd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, **6-H**, **Keto**), 7.90 (m, 2H, $|N| = 8.9$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H**, **Enol**), 7.97 (m, 0.4H, $|N| = 8.8$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2', 6'-H**, **Keto**), 11.96 (s, 0.2H, **2-OH**, **Keto**), 12.12 (s, 1H, **2-OH**, **Enol**), 15.75 (s, 1H, **Enol-OH**) ppm.

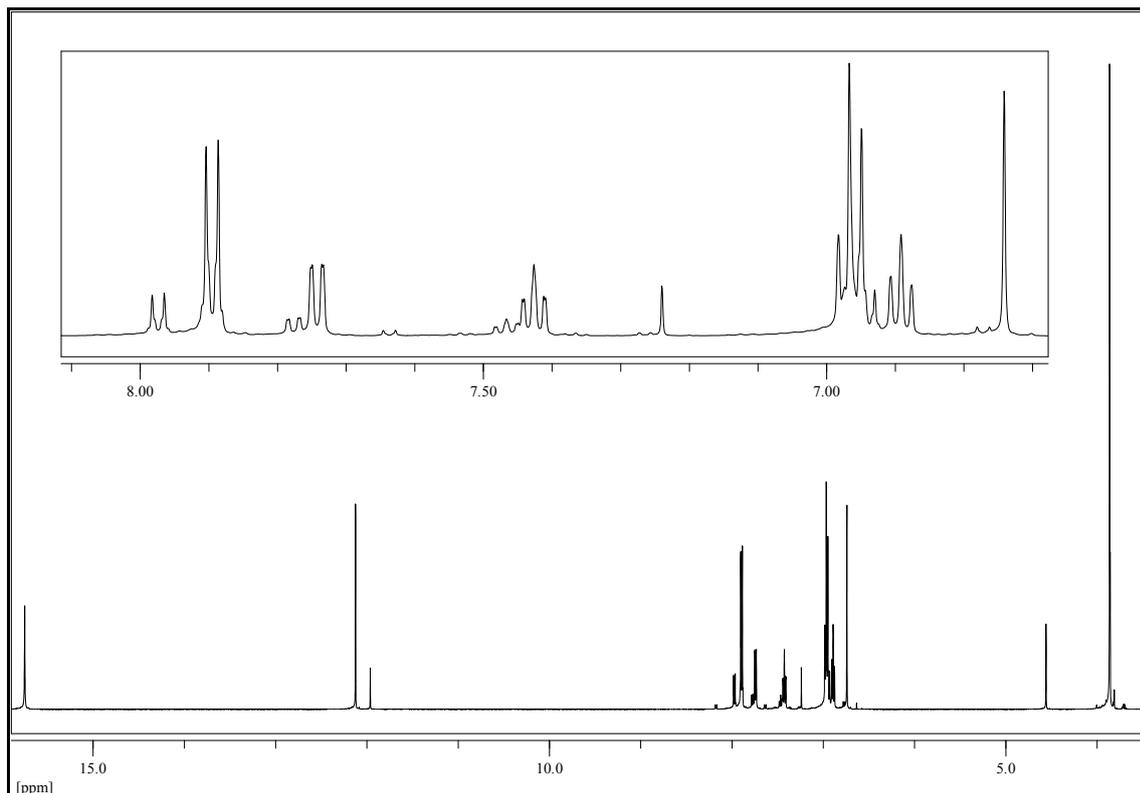


Abb. 147: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (**X100**), $T = 297\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR $_{125}$ ($T = 297\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 49.95$ (0.2C, **CH₂**, **Keto**), 55.48 (1C, **OCH₃**, **Enol**), 55.53 (0.2C, **OCH₃**, **Keto**), 90.99 (s, 1C, **CH**, **Enol**), 114.02 (0.4C, **3'**, **5'-CH**, **Keto**), 114.12 (2C, **3'**, **5'-CH**, **Enol**), 118.60 (0.2C, **3-CH**, **Keto**), 118.70 (1C, **3-CH**, **Enol**), 118.97 (1C, **5-CH**, **Enol**), 119.02 (1C, **1-C**, **Enol**), 119.24 (0.2C, **5-CH**, **Keto**), 119.46 (0.2C, **1-C**, **Keto**), 125.76 (1.2C, **1'-C**, **Keto & Enol**), 128.32 (1C, **6-CH**, **Enol**), 128.81 (2C, **2'**, **6'-H**, **Enol**), 131.02 (0.2C, **6-CH**, **Keto**), 131.22 (0.4C, **2'**, **6'-H**, **Keto**), 135.46 (1C, **4-CH**, **Enol**), 136.97 (0.2C, **4-CH**, **Keto**), 162.26 (1C, **4'-C**, **Enol**), 162.77 (0.2C, **4'-C**, **Keto**), 163.21 (1C, **2-C**, **Enol**), 164.16 (0.2C, **2-C**, **Keto**), 177.71 (1C, **=C_B-OH**, **Enol**), 191.73 (0.2C, **C_B=O**, **Keto**), 194.81 (1C, **C_A=O**, **Enol**), 200.43 (0.2C, **C_A=O**, **Keto**) ppm.

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3004$ (w, Aryl-H-Val.), 2950 (w, CH₃-Val.), 2836 (w, -OCH₃-Val.), 1605 (s, arom. C=C-Val.), 1571 (s, C=O \cdots H), 1508 (m, arom. C=C-Val.), 1242 (m, Aryl-alkylether, C-O-C-Val.), 804 (w, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 742 (m, 1,2- disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹

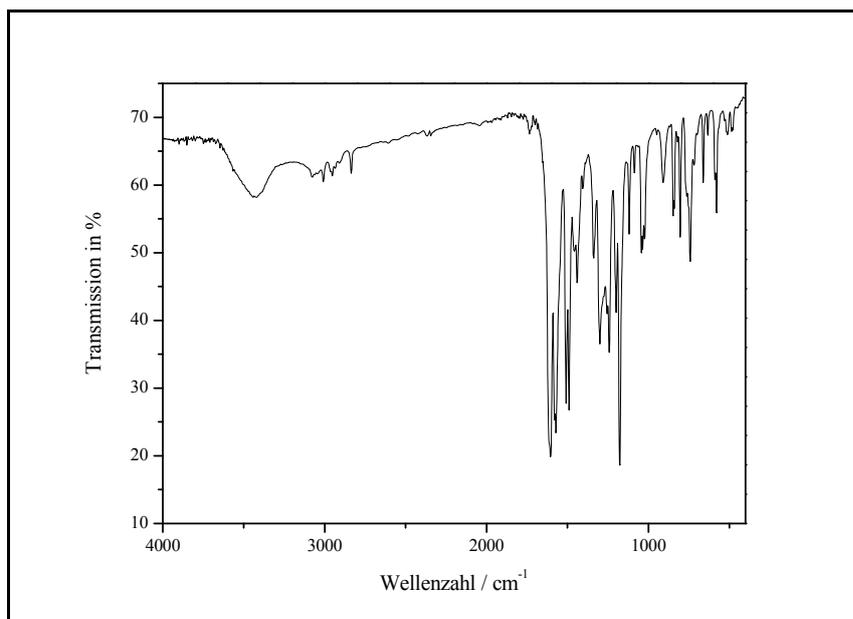
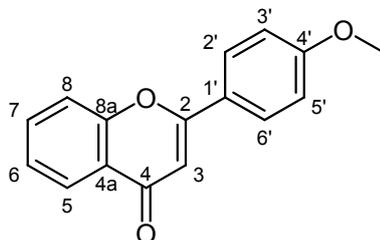


Abb. 148: IR-Spektrum (KBr) von 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (**XI100**)

Massenspektrum (EI, 60 °C):

m/z (%) = 271.3 (7.4) , 270.3 (44) [**M**⁺], 135.2 (100), 121.2 (11), 107.2 (5.3), 92.2 (4.7), 77.2 (8.3).

4.1.2.23 V23: 4'-Methoxyflavon (**X101**)

15.0 g (55.5 mmol) des Dions **X100** werden in 150 ml Eisessig gelöst und mit 3.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und eine Stunde lang bei 110 °C gerührt. Die Reaktion wird unter heftigem Rühren auf ca. 500 g Eis gegeben. Das ausgefallene Flavon wird abfiltriert und mit viel Wasser (ca. 1000 ml) säurefrei gewaschen bevor es aus ca. 2000 ml Leichtbenzin umkristallisiert wird. Man erhält einen farblosen, voluminösen Feststoff.

Ausbeute: 14.0 g (55.5 mmol), $M(C_{16}H_{12}O_3) = 252.1 \text{ g/mol}$

100 % der Theorie

Smp.: 158 °C

Lit.^[50]: 158.5-159 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 76.2 % C, 4.8 % H; Gefunden: 76.2 % C, 4.7 % H

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296 \text{ K}$, DMSO- d_6):

$\delta = 3.86$ (s, 3H, **OCH₃**), 6.96 (s, 1H, **3-H**), 7.12 (m, 2H, $|N| = 9.0 \text{ Hz}$, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.49 (dt, 1H, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, **6-H**), 7.77 (dd, 1H, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, $^4J = 0.7 \text{ Hz}$, **8-H**), 7.82 (dt, 1H, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, **7-H**), 8.04 (dd, 1H, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, **5-H**), 8.07 (m, 2H, $|N| = 9.0 \text{ Hz}$, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**) ppm.

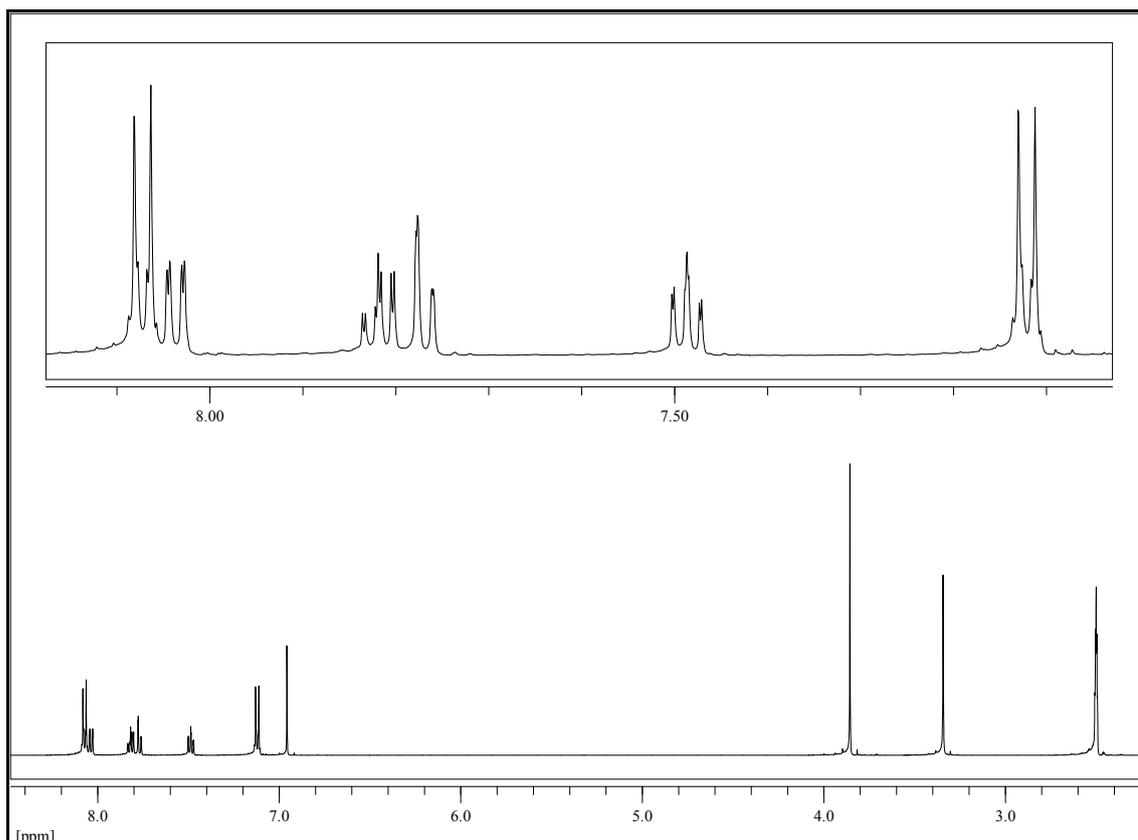


Abb. 149: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO-d_6) von 4'-Methoxyflavon (X101), $T = 296\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ - NMR_{125} ($T = 296\text{ K}$, DMSO-d_6):

$\delta = 55.47$ (OCH_3), 105.378 (**3-CH**), 114.50 (2C, **3'**, **5'-CH**), 118.37 (**8-CH**), 123.16 (**1'-C**), 123.23 (**4a-C**), 124.67 (**5-CH**), 125.32 (**6-C**), 128.15 (2C, **2'**, **6'-CH**), 134.11 (**7-CH**), 155.54 (**8a-C**), 162.08 (**4'-C**), 162.58 (**2-C**), 176.87 (**4-C**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\max.} (\log \varepsilon) = 252 (4.20), 317 (4.53) \text{ nm.}$

Lit.^[37]: $\lambda_{\max.} (\log \varepsilon, \text{Methanol}) = 318 (4.48) \text{ nm.}$

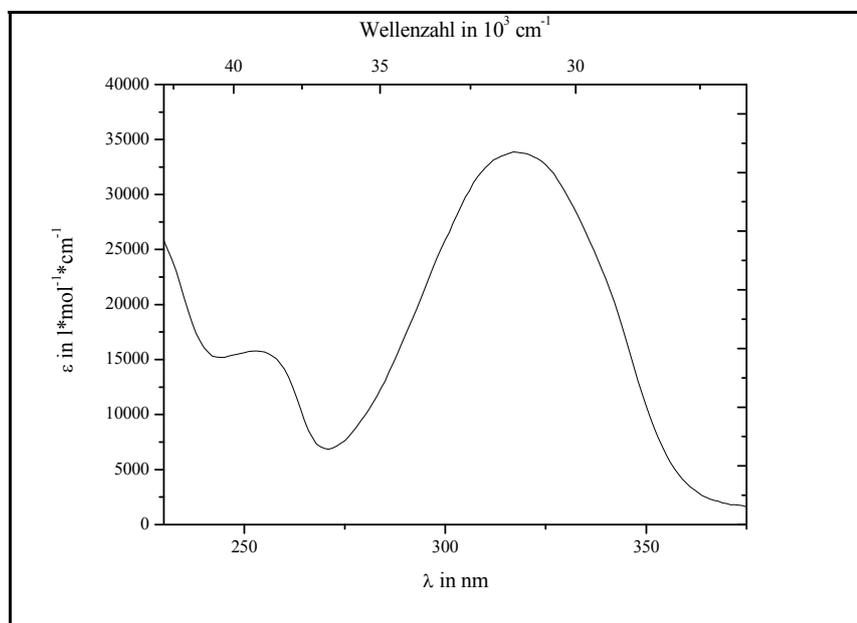


Abb. 150: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 4'-Methoxyflavon (**X101**)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3052 (w, Aryl-H-Val.), 2993 (w, Aryl-H-Val.), 2944 (w, CH₃-Val.), 2840 (w, -OCH₃-Val.), 1650 (s, α,β -unges. Keton), 1607 (m, arom. C=C-Val.), 1515 (m, arom. C=C-Val.), 1466 (m, CH₃-Def.), 1380 (s, sym. CH₃-Def.), 1267 (s, C-O-C-Val.), 828 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 769 (m, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

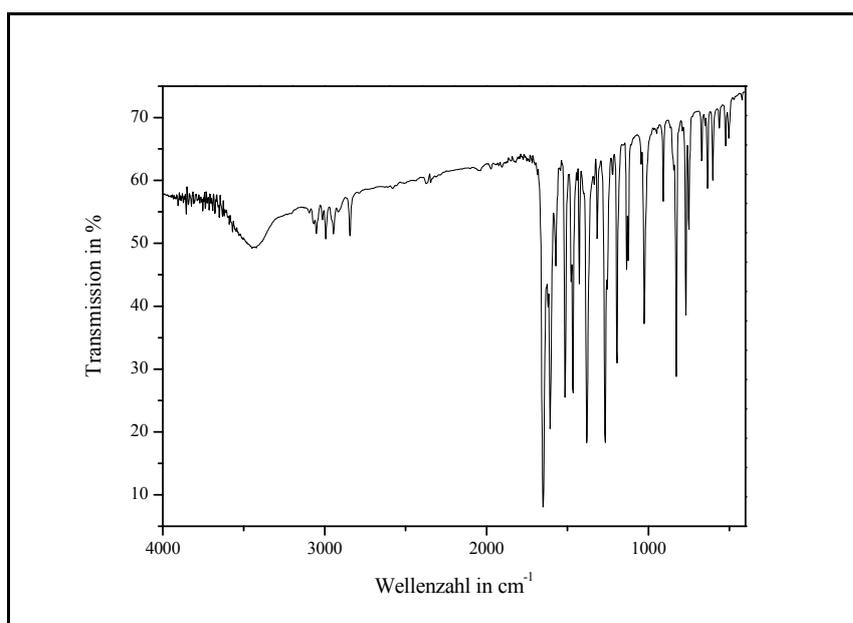
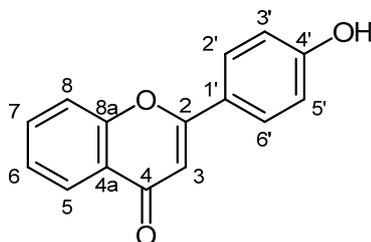


Abb. 151: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Methoxyflavon (X101)

Massenspektrum (EI, 120 °C):

m/z (%) = 253.2 (18), 252.2 (100) [M^+], 251.2 (16), 224.2 (18), 221.2 (7.6), 209.2 (17), 181.2 (13), 152.3 (8.5), 133.2 (6.9), 132.2 (66) [**RDA**_{Dienophil}], 120.2 (4.7) [**RDA**_{Dien}], 117.2 (19), 92.2 (19), 89.2 (24), 64.2 (7.0), 63.2 (9.8).

4.1.2.24 V24: 4'-Hydroxyflavon (**X102**)

Unter trockenem Argon werden 505 mg (2.00 mmol) des geschützten Flavons **X101** mit einem 10-fach-molaren Überschuss (2.31 g, 20.0 mmol) an Pyridinhydrochlorid (Aldrich, 98 %) vermengt und in der Mikrowelle erst 10 Minuten lang bei 160 °C geschmolzen und anschließend fünf Minuten lang bei 240 °C gerührt. Anschließend wird das Gemisch mit dem Heißluftföhn im Reaktionsgefäß geschmolzen und unter heftigem Rühren in ca. 50 ml Eiswasser gegeben und für eine Stunde stehen gelassen. Nach dem Absaugen und Waschen mit viel Wasser erhält man einen hellgrünen Feststoff.

Ausbeute: 440 mg (1.85 mmol), $M(C_{15}H_{10}O_3) = 238.2$ g/mol
92 % der Theorie

Smp.: 273 °C Lit.^[50,51]: 269.5-271 °C

Elementaranalyse

Berechnet: 75.6 % C, 4.2 % H; Gefunden: 75.4 % C, 4.2 % H

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 296$ K, DMSO- d_6):

$\delta = 6.87$ (s, 1H, **3-H**), 6.94 (m, 2H, $|N| = 8.7$ Hz, A-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **3'**, **5'-H**), 7.47 (dt, 1H, $^3J = 6.9$ Hz, 4J n.a., **6-H**), 7.77 (dd, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, 4J n.a., **8-H**), 7.80 (dt, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, **7-H**), 7.96 (m, 2H, $|N| = 8.7$ Hz, B-Teil eines $[\text{AB}]_2$ -Systems, **2'**, **6'-H**), 8.02 (dd, 1H, $^3J = 6.5$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, **5-H**), 10.34 (s, 1H, **4-OH**) ppm.

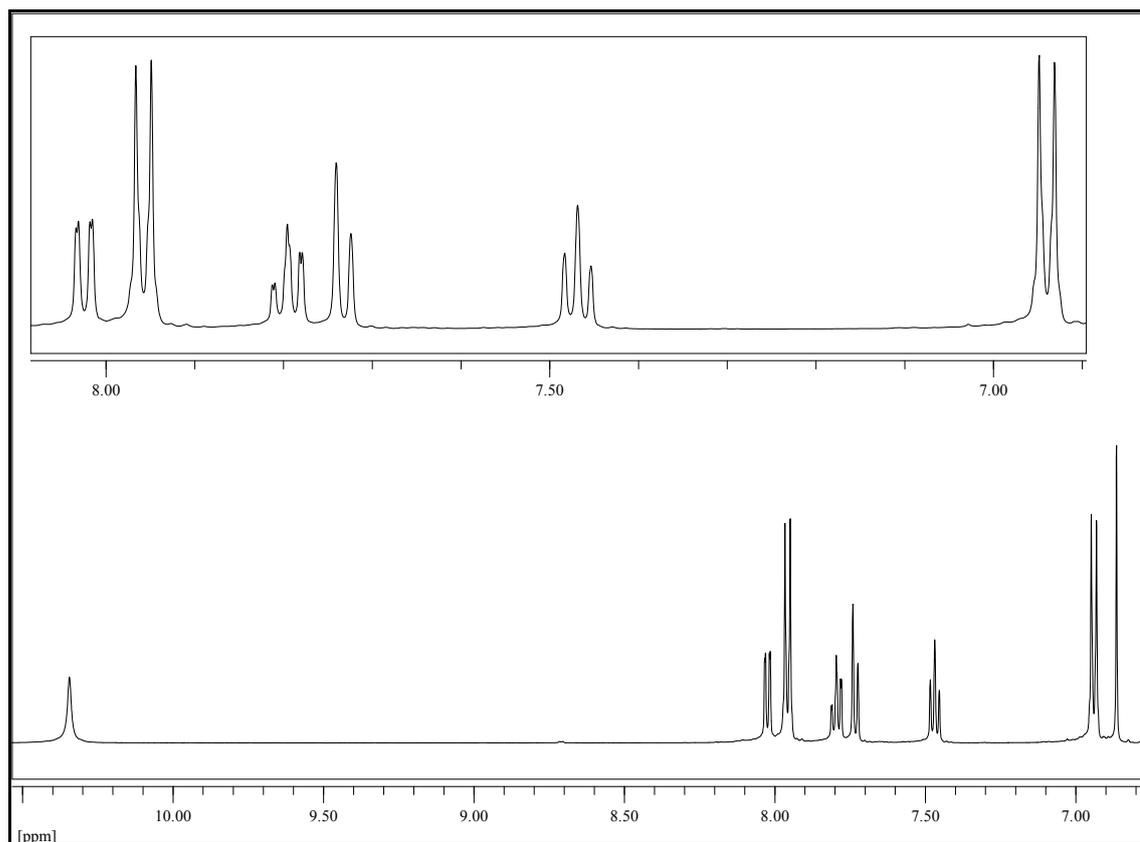


Abb. 152: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) von 4'-Hydroxyflavon (**X102**), $T = 296\text{ K}$

$^{135}\text{DEPT}$ ($T = 296\text{ K}$, DMSO- d_6 , 500 MHz):

$\delta = 104.49$ (**3-CH**), 115.65 (2C, **3'**, **5'-CH**), 118.05 (**8-CH**), 124.42 (**5-CH**), 125.00 (**6-CH**), 128.06 (2C, **2'**, **6'-CH**), 133.71 (**7-CH**) ppm.

UV-VIS (Methanol):

$\lambda_{\max.} (\log \varepsilon) = 254 (4.10), 325 (4.41) \text{ nm.}$

Lit.^[52]: $\lambda_{\max.} (\text{HPLC-DAD, Methanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch}) = 255, 326 \text{ nm.}$

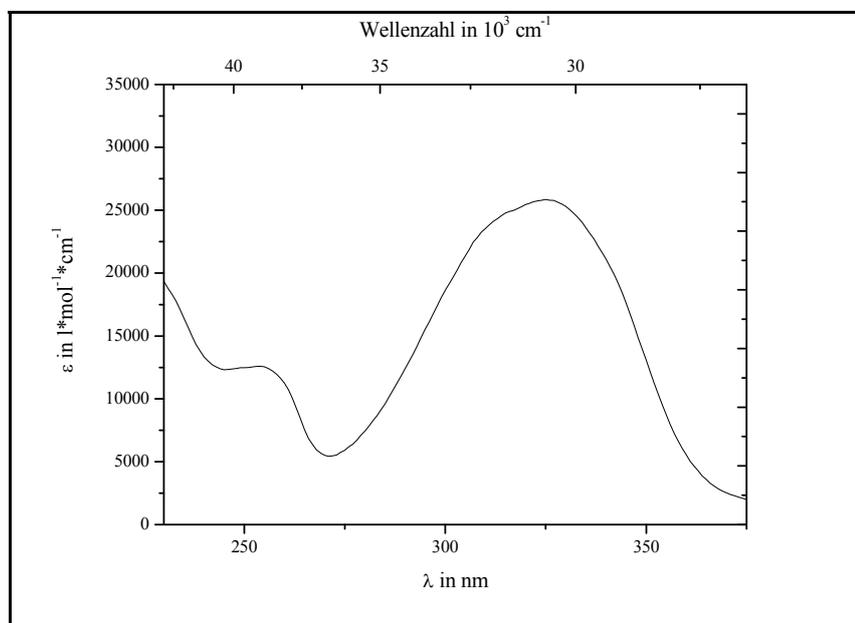


Abb. 153: UV-VIS-Spektrum (Methanol) von 4'-Hydroxyflavon (X102)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ = 3107 (w, breit, OH-Val.), 3058 (w, Aryl-H-Val.), 3020 (w, Aryl-H-Val.), 2950 (w, CH₃-Val.), 1631 (s, α,β -unges. Keton), 1600 (s, arom. C=C-Val.), 1510 (m, arom. C=C-Val.), 1388 (OH-Def.), 1297 (m, Aryl-OH), 1263 (m, C-O-C-Val.), 835 (m, 1,4-disubst. Aromat, zwei benachbarte Ar-H, Def., oop), 775 (m, 1,2-disubst. Aromat, vier benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

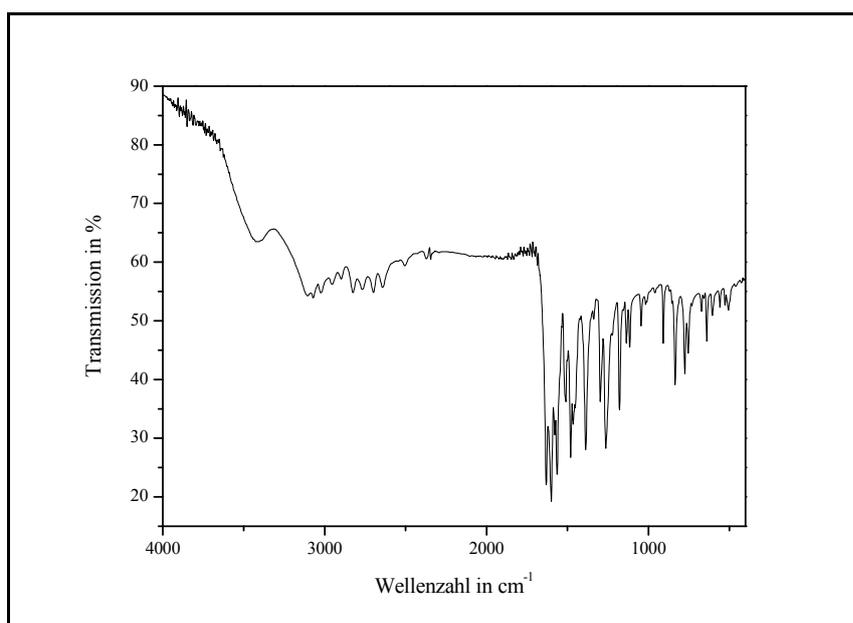
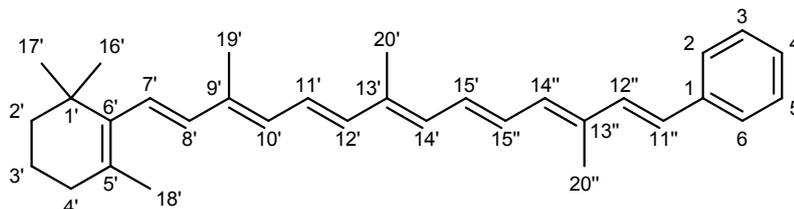


Abb. 154: IR-Spektrum (KBr) von 4'-Hydroxyflavon (X102)

Massenspektrum (EI, 120 °C):

m/z (%) = 239.2 (19), 238.2 (100) [M^+], 237.2 (27), 210.3 (9.1), 121.2 (4.7) [RDA_{Dien}], 118.3 (16) [$RDA_{Dienophil}$], 105.2 (13), 92.2 (5.6), 79.3 (5.1).

4.1.2.25 V25: (11'-Apo- β -carotiny)lbenzol (X104)

Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss werden 673 mg (1.92 mmol) C_{25} -Aldehyd **BASF2** und 584 mg (2.56 mmol) Diethyl-benzylphosphonat (Aldrich, 99 %) in 20 ml absolutem Pyridin gelöst. Bei RT werden langsam 3.20 ml (3.20 mmol) einer frisch hergestellten Lithiummethanolatlösung (1M in Ethanol) zugetropft und drei Stunden lang bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit Dünnsäure hydrolysiert, zweimal mit Chloroform extrahiert und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Durch zweifache säulen-chromatographische Aufreinigung an Kieselgel 60 mit Chloroform und Dichlormethan wird ein orangefarbener, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 489 mg (1.15 mmol), $M(C_{32}H_{40}) = 424.7$ g/mol

60 % der Theorie

Smp.: 189 °C (Zers.)

Massenfeinbestimmung (EI, 170 °C):

Berechnet ($C_{32}H_{40}$): 424.3130; Gefunden: 424.3136

$^1\text{H-NMR}_{500}$ ($T = 298\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 1.04$ (s, 6H, **16'**- & **17'**-**CH₃**), 1.45-1.49 (m, 2H, **2'**-**CH₂**), 1.59-1.65 (m, 2H, **3'**-**CH₂**), 1.73 (s, 3H, **18'**-**CH₃**), 1.98 (s, 3H, **19'**-**CH₃**), 2.00-2.04 (m, 2H, **4'**-**CH₂**), 1.990 (s, 3H, **20''**-**CH₃**), 2.03 (s, 3H, **20'**-**CH₃**), 6.14 (d, 1H, $^3J = 16.0\text{ Hz}$, **8'**-**CH**), 6.16 (d, 1H, $^3J = 11.0\text{ Hz}$, **10'**-**CH**), 6.19 (d, 1H, $^3J = 16.2\text{ Hz}$, **7'**-**CH**), 6.27 (d, 1H, $^3J = 10.0\text{ Hz}$, **14''**-**CH**), 6.36 (d, 1H, $^3J = 10.0\text{ Hz}$, **14'**-**CH**), 6.36 (d, 1H, $^3J = 14.7\text{ Hz}$, **12'**-**CH**), 6.59 (d, 1H, $^3J = 16.0\text{ Hz}$, **11''**-**CH**), 6.65 (dd, 1H, $^3J = 14.0\text{ Hz}$, $^3J = 10.0\text{ Hz}$, **15''**-**CH**), 6.67 (dd, 1H, $^3J = 14.8\text{ Hz}$, $^3J = 11.0\text{ Hz}$, **11'**-**CH**), 6.68 (dd, 1H, $^3J = 14.0\text{ Hz}$, $^3J = 10.0\text{ Hz}$, **15'**-**CH**), 6.89 (d, 1H, $^3J = 15.9\text{ Hz}$, **12''**-**CH**), 7.21 (tt, 1H, $^3J = 7.3\text{ Hz}$, $^4J = 1.3\text{ Hz}$, **4-CH**), 7.32 (td, 2H, $^3J = 7.6\text{ Hz}$, $^4J = 1.3\text{ Hz}$, **3- & 5-CH**), 7.57 (dt, 2H, $^3J = 7.4\text{ Hz}$, $^4J = 1.3\text{ Hz}$, **2- & 6-CH**) ppm.

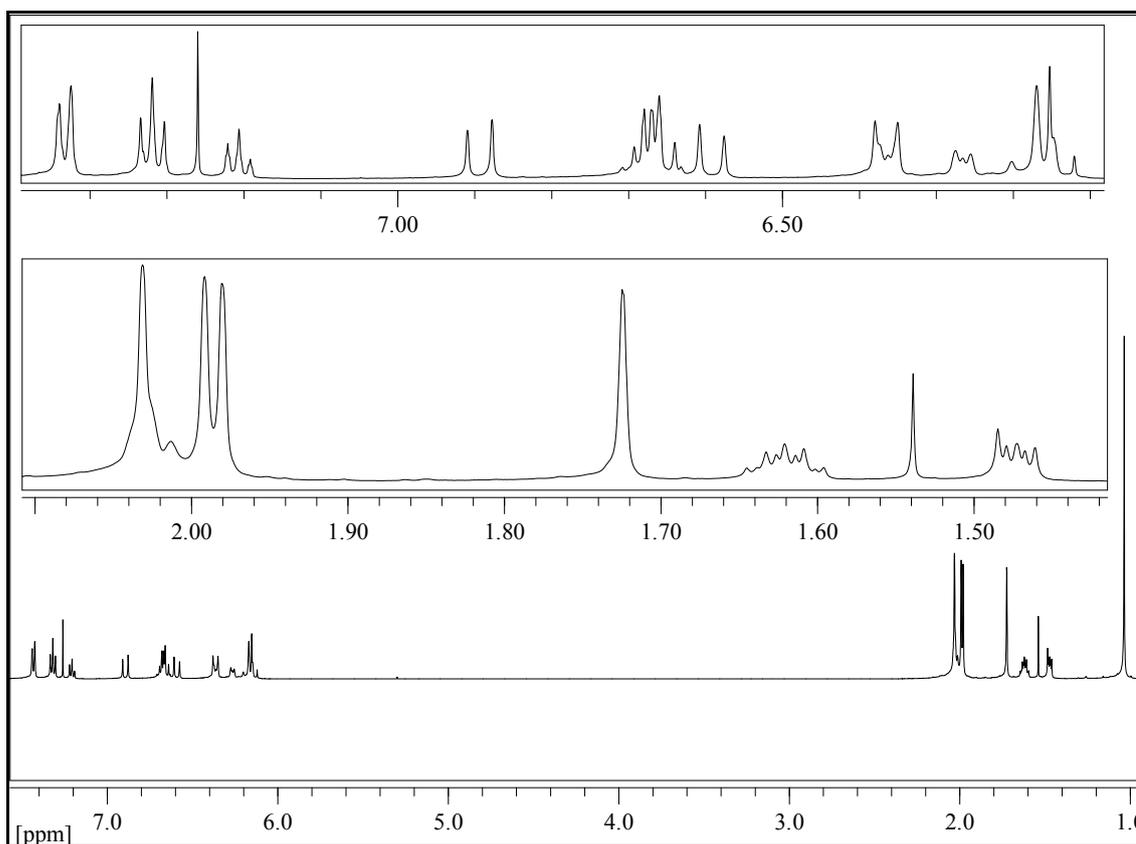


Abb. 155: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3) von (11'-Apo- β -carotiny)benzol (**X104**), $T = 298\text{ K}$

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ ($T = 298\text{ K}$, CDCl_3):

$\delta = 12.77, 12.81, 12.84$ (3C, $19'$ -, $20'$, $20''$ - CH_3), 19.27 ($3'$ - CH_2), 21.77 ($18'$ - CH_3), 28.98 (2C, $16'$ -, $17'$ - CH_3), 33.12 ($4'$ - CH_2), 34.28 ($1'$ -C), 39.65 ($2'$ - CH_2), 125.19 ($11'$ -CH), 126.32 (2C, 2 -& 6 -CH), 126.73 ($7'$ -CH), 127.18 ($11''$ -CH), 127.60 (4 -C), 128.63 (2C, 3 -& 5 -CH), 129.40 ($5'$ -C), 129.73 ($15''$ -CH), 130.37 ($15'$ -CH), 130.78 ($10'$ -CH), 132.22 ($14''$ -CH), 133.10 ($14'$ -CH), 133.54 ($12''$ -CH), 135.72 ($13''$ -C), 136.13 ($13'$ -C), 136.74 ($9'$ -C), 137.17 ($12'$ -CH), 137.75 ($8'$ -C), 137.78 (1 -C), 137.91 ($6'$ -C) ppm.

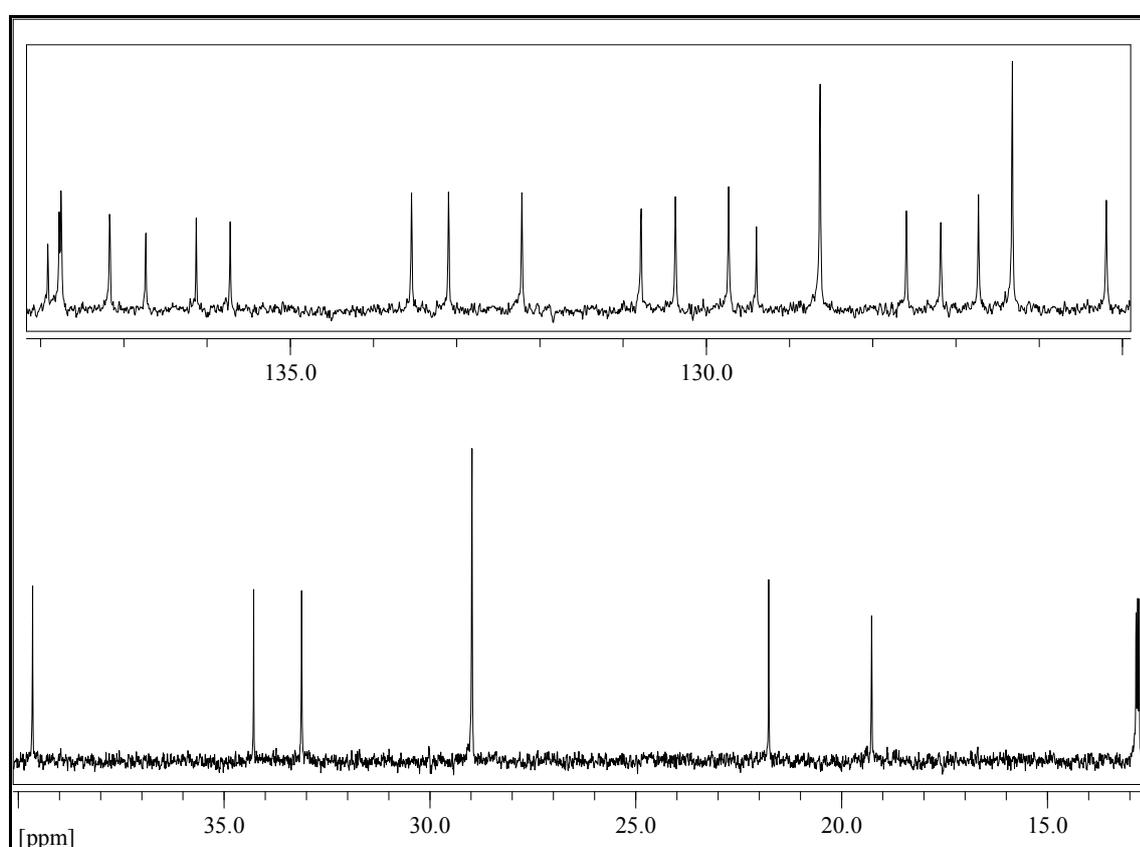


Abb. 156: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR₁₂₅ (CDCl_3) von ($11'$ -Apo- β -carotiny)benzol (**X104**), $T = 298\text{ K}$

IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3028$ (w, C=C-H, CH-Val.), 2966, 2926, 2856 (m, s, m, CH₂/CH₃-Val.), 1718 (m), 1671 (m, konjugierte C=C), 1447 (m, CH₂/CH₃-Def.), 1364 (w, sym. CH₃-Def.), 1260 (m, OH-Def.), 965 (s, C=C-H-Def., oop, all-trans), 748, 691 (m, m, monosubst. Aromat, fünf benachbarte Ar-H, Def., oop) cm⁻¹.

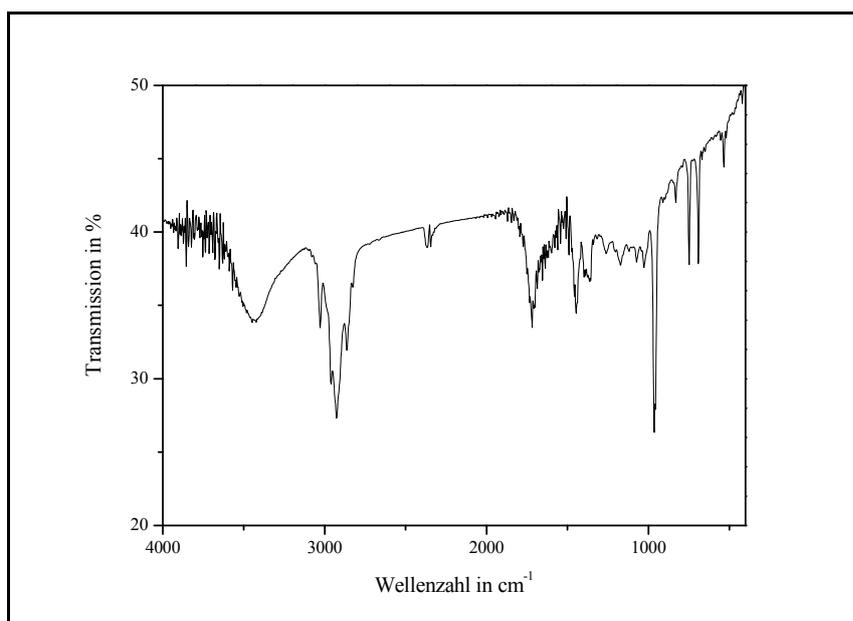


Abb. 157: IR-Spektrum (KBr) von (11'-Apo- β -carotiny)benzol (X104)

UV-VIS (Dichlormethan):

$\lambda_{\max.}$ ($\log \varepsilon$) = 261 (4.08), 321 (4.10), 411 (sh), 434 (4.98), 459 (4.93) nm.

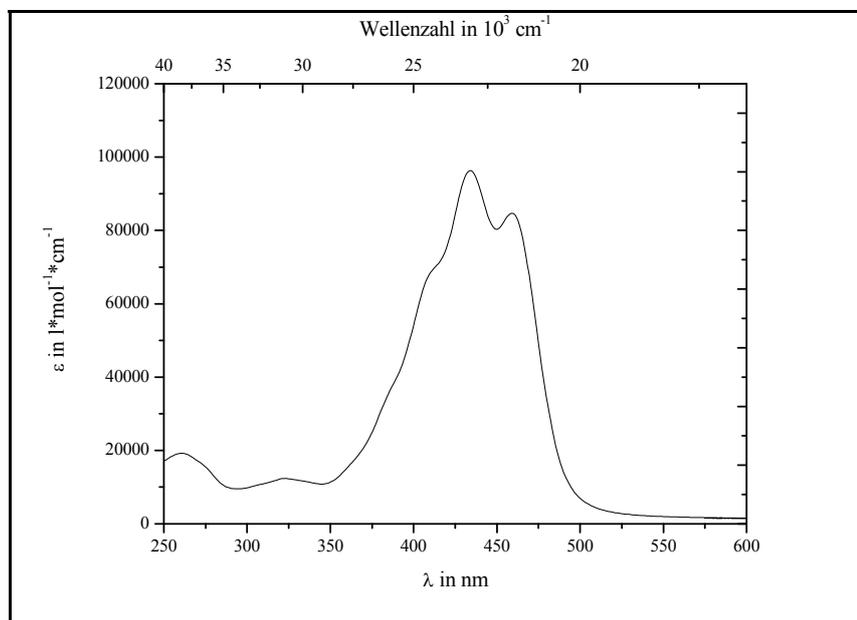


Abb. 158: UV-VIS (Dichlormethan) von (11'-Apo- β -carotiny)benzol (X104)

Massenspektrum (MALDI, DIT, CHCl_3):

m/z (%) = 425.3 (35), 424.2 (100) [M^+].

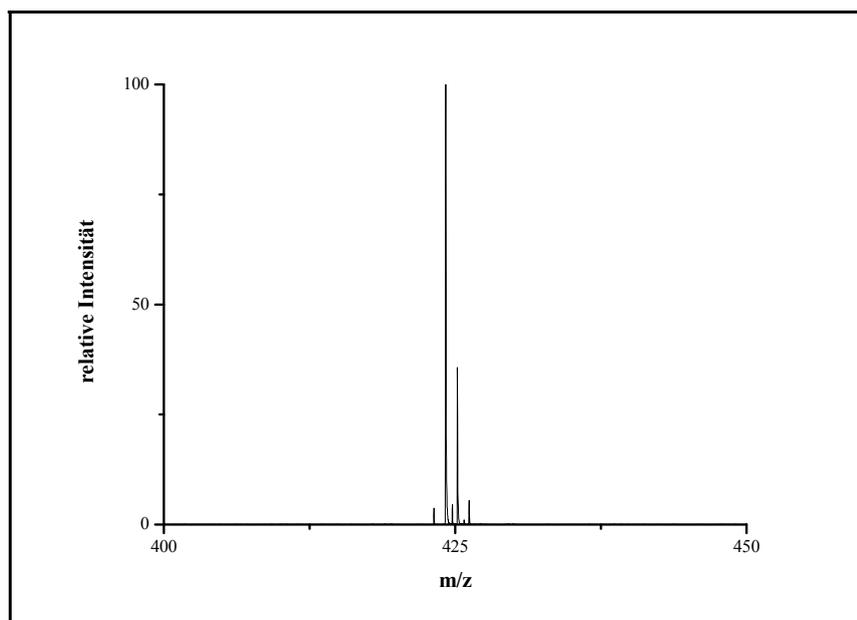


Abb. 159: MALDI-Massenspektrum (DIT, CHCl_3) von (11'-Apo- β -carotiny)benzol (X104)

4.2 Biochemische Experimente

4.2.1 Material und Methoden

4.2.1.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der Zellen

Humane dermale Fibroblasten (HdF) von ATCC (CCD-1064Sk, ATCC-Nr.: CRL-2076) werden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, D5921), versetzt mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (FBS Gold, PAA), 1% (v/v) L-Glutamin (PAA, 200 mM) und 1% (v/v) 100-fach Konzentrat Penicillin / Streptomycin (PAA, 10^4 U/ml Pen, 10 mg/ml Strep), unter sterilen Bedingungen kultiviert. Zellen in Kulturflaschen, -schalen oder 24 Well-Platten (Greiner Bio One) werden bei 37 °C unter einer 5%igen Kohlendioxid-Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle drei bis vier Tage wird das Medium von den am Flaschenboden adhären Zellen abgesaugt, die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und es wird neues Medium hinzugegeben. Beim Erreichen von annähernd vollständiger Konfluenz (ca. 80 - 90%, nach sieben Tagen) werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem 1:1-Gemisch aus PBS und Trypsin-EDTA (0.5 mg/ml Trypsin, 0.22 mg/ml, EDTA in PBS, PAA) für drei bis fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Anschließend wird sofort neues 10%-DMEM (10% FBS) hinzugegeben um die Zellen vor weiterer Proteaseaktivität des Trypsins zu schützen. Die so erhaltene Zellsuspension wird mit 10%-DMEM um den Faktor fünf verdünnt und auf neue Kulturflaschen verteilt. Für die Experimente werden die Zellen für die Untersuchung der Hämoxxygenase-Induktion auf 16 4-ml-Schalen (Verdünnung 1:5) oder für die Toxizitätsmessungen auf mehrere 24-Well-Platten (Verdünnung 1:7) verteilt.

Zum Einfrieren der Zellen wird die Zellsuspension nach der Trypsinierung und Zugabe von FBS-haltigem DMEM zehn Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in 10 ml Einfriermedium (20%-FBS-DMEM + 10% DMSO) resuspendiert und es werden je 2 ml ($\sim 10^6$ Zellen) in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Um die Zellen wieder aufzutauen, lässt man die Kryoröhrchen auf Eis antauen und überführt die Zellen zügig in eine neue Kulturflasche mit 10 %-FBS-DMEM. 24 h später wird das Medium gewechselt. Nach zwei weiteren Tagen haben die Zellen wieder eine fast vollständige Konfluenz erreicht und können wie vorher auf weitere Flaschen verteilt werden.

4.2.1.2 Inkubation mit Testsubstanzen

24 Stunden vor der Inkubation mit den Testsubstanzen werden die zu 80 - 90 % konfluenten Zellen nach dem Entfernen des 10%-DMEM und Waschen mit PBS mit 0 %-DMEM (ohne FBS) versetzt. Die Stammlösungen der Substanzen (10 mM in THF) werden durch Einwiegen hergestellt und die Konzentration mittels UV-VIS-Spektroskopie überprüft. Ein relativer Fehler der Konzentration von bis zu 2 % wird toleriert. Die kleineren Konzentrationen (5 mM und 1.5 mM) werden durch weitere Verdünnung der 10 mM Stammlösung hergestellt. Die in THF gelösten Substanzen bzw. reines THF als Kontrolle werden in 15 ml-Greineröhrchen mit 0%-DMEM um den Faktor 1000 verdünnt. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt, es wird nicht mit PBS gewaschen. Anschließend wird das mit den Substanzen versetzte Medium (bzw. 0.1 % THF in 0 %-DMEM als Kontrolle) mittels einer Glaspipette auf die Zellen gegeben und die Zellen werden 24 h lang bei 37 °C mit den Substanzen inkubiert.

4.2.1.3 Untersuchung zur Toxizität [Sulforhodamin B (SRB)-Assay]^[41,53]

Der SRB-Färbung ist eine schnelle, günstige und sensitive Methode, um eine mögliche zelltoxische Wirkung von Substanzen oder Umwelteinflüssen, wie z.B. UV-Strahlung, auf eine Zellkultur zu untersuchen. SRB bindet in Abhängigkeit vom pH-Wert an basische Aminosäureseitenketten von Proteinen. Die Menge an proteingebundenem Farbstoff lässt sich photometrisch erfassen und das Verhältnis zwischen Absorbanz und Lebendzellzahl ist bis zu großen Zellzahlen linear.

Der SRB-Assay wird in 24-Well-Platten durchgeführt. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wird das Medium von den inkubierten Zellen abgesaugt. Die Zellen werden mit 10 % (w/w) Trichloressigsäure (TCA) für eine Stunde bei 4 °C fixiert, fünfmal mit Wasser (Millipore) gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Zellen werden für 10 Minuten bei RT mit je 300 μl einer 0.4%igen (w/w) SRB-Lösung (SRB, Sigma, in 1 % (v/v) Essigsäure) gefärbt, anschließend fünfmal mit 1%iger Essigsäure gewaschen und bis zur Trockne an der Luft stehengelassen. Um die Absorption zu messen wird zuerst der Farbstoff durch Zugabe von je 150 μl 10 mM Tris-Puffer (in Milipore-Wasser) innerhalb von drei bis fünf Minuten aus den Zellen gelöst und anschließend werden je 100 μl der Lösung auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die photometrische Messung erfolgt bei 492 nm im PowerWave Microplate-Reader (BioTek) mittels der Software KC4. Möglichen Messfehlern durch Streuung an Schwebeteilchen wurde durch simultane Messung der Absorption bei 620 nm und anschließender Subtraktion vom Messwert bei 492 nm Rechnung getragen.

4.2.1.4 Bestrahlung mit UVA-Licht

Für die Bestrahlungsversuche wurden die vorbehandelten Zellen zweimal mit PBS und einmal mit Hanks Balanced Salt Solution (HANKS) gewaschen und anschließend mit HANKS überschichtet (1 ml pro Well bzw. 3 ml pro 6-cm-Schale). Die Zellen wurden anschließend entweder 20 J/cm^2 UVA-Strahlung (Lampenspektrum siehe **Abb. 160**) ausgesetzt oder in der Sterilbank für die Dauer der Bestrahlung im Dunkeln gehalten (0 J/cm^2).

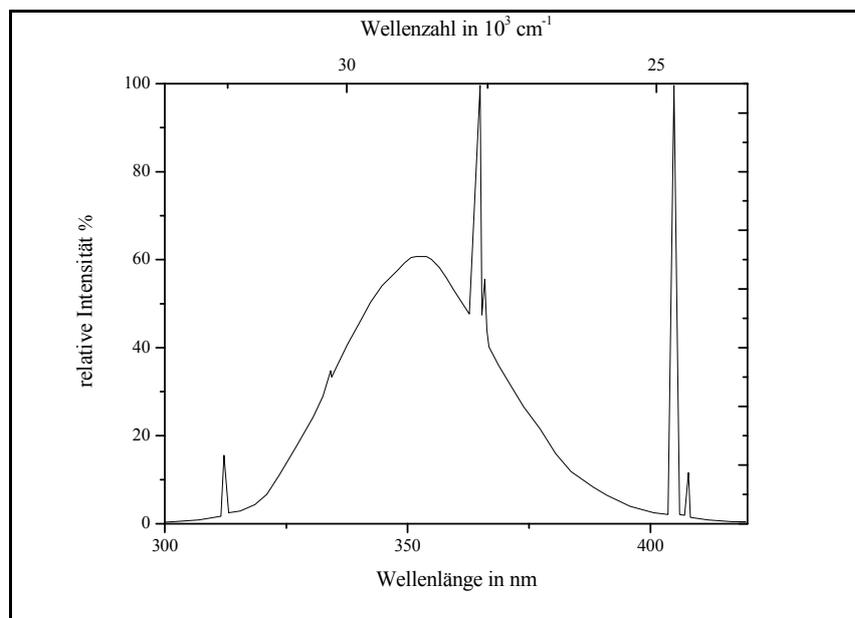


Abb. 160: Emissionsspektrum der Vilber-Lourmat Bio-Sun im UVA-Bereich

Die Bestrahlungsdauer von ca. 1.2 h ergibt sich aus der Strahlungsstromdichte der Lampe von etwa 4.6 mW/cm^2 . Zum Vergleich wurde von Monfrecola et al. für den 40. nördlichen Breitengrad (Neapel, Italien, 300 m über NHN) eine über vier Jahre gemittelte Strahlungsstromdichte von 2.48 mW/cm^2 UVA im Juni zur Mittagszeit gemessen^[54].

Im Anschluss an die Bestrahlung wird das Medium entfernt, 0 %-DMEM (ohne FBS) hinzugegeben und die Zellen für 24 Stunden im Inkubator aufbewahrt.

4.2.1.5 Untersuchung zur Toxizität nach UVA Bestrahlung (UVA-SRB)

Für die Untersuchung der Toxizität nach UVA-Bestrahlung werden die mit Substanz inkubierten Zellen (Kap. 4.2.1.2) mit 20 J/cm^2 UVA bzw. 0 J/cm^2 UVA (Kap. 4.2.1.4) behandelt und 24 h später der SRB-Färbemethode (Kap. 4.2.1.3) unterworfen.

4.2.1.6 Hämoxygenase-Induktion durch UVA-Strahlung (HMOX1-Assay)

4.2.1.6.1 Allgemeines

Die induzierbare der beiden Isoformen der Hämoxygenase, die Hämoxygenase-1 (HMOX1, EC 1.14.99.3), auch Heat Shock Protein 32 (Hsp32) genannt, ist ein 32 kDa großes Protein, welches die Metabolisierung von Häm, der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes Hämoglobin, zu Billiverdin, Kohlenstoffmonoxid und freiem Eisen katalysiert. Die Hochregulation der HMOX1 ist ein adaptiver Mechanismus zum Schutz vor oxidativem Stress^[55]. Eine gesteigerte Biosynthese wird durch Einwirkung von Stressfaktoren wie Peroxiden oder UVA-Einwirkung in menschlichen Hautfibroblasten induziert^[56]. Somit kann aus der Menge an vorhandener HMOX1 in den Zellen auf die oxidative Belastung der Zellen geschlossen werden.

4.2.1.6.2 Herstellen der Zellysate

Für die Untersuchung der gesteigerten Biosynthese nach UVA-Einwirkung, werden die vorinkubierten (Kap. 4.2.1.2) und bestrahlten Zellen (Kap. 4.2.1.4) 24 h nach der UV-Einwirkung lysiert. Hierzu werden die Zellen unter Eiskühlung mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit RL+ Puffer (*Tab. 13*) lysiert. Bis zu Proteinbestimmung und anschließenden SDS-PAGE werden die Lysate bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Tab. 13: Zusammensetzung des Puffers für die Zelllyse

Lysispuffer RL+ (pH 7,4)	
20 mM	TRIS
139 mM	NaCl
10 mM	NaF
9.9 mM	Pyrophosphat, Na-Salz·10 H ₂ O
1 %	TritonX-100
4 mM	EDTA pH 8
4 mM	EGTA pH 8
1.6 mM	Na-Vanadat
4.4 g/l	Glycerol-2-phosphat, Na-Salz·x H ₂ O
Eine Tablette Complete Proteaseinhibitor pro 50ml Puffer	

4.2.1.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Vor der SDS-PAGE werden die angetauten Lysate für einige Sekunden mit Ultraschall behandelt, und die Gesamtproteinmenge wird photometrisch nach der Methode von Bradford bestimmt^[57]. Hierfür werden 6 µl des jeweiligen Lysats zu 1 ml halbkonzentriertem Bradfordreagenz (1:1 mit Millipore-H₂O) pipettiert und frühestens nach fünf Minuten bei RT wurde die Absorption bei 590 nm gemessen. Durch eine vorher erstellte Regressionsgerade ($R^2 > 98\%$) mit Rinderserum-Albumin (BSA) in RL+ Puffer kann der Gesamtproteingehalt in den jeweiligen Proben bestimmt werden. Die Lysate werden unter Eiskühlung aufbewahrt.

4.2.1.6.4 SDS-PAGE^[58]

Die SDS-PAGE ist eine einfache und gut reproduzierbare Methode, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dazu wird Natriumdodecylsulfat (SDS), welches stöchiometrisch an die Proteine bindet (ca. 1.4 g SDS / g Protein), hinzugegeben um eine gleichmäßige negative Ladung auf die Proteine aufzubringen. Je nach Molekulargewicht wandern die SDS-Proteinkomplexe in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch einer Polyacrylamid-Matrix zur Anode. Da die Hämoxxygenase ein Molekulargewicht von etwa 32 kDa hat, eignen sich für die Auftrennung Gele mit 12 % Polyacrylamid (**Tab. 14**):

Tab. 14: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

	Trenngel pH= 8,8 12 % Polyacrylamidgel	Sammelgel pH 6,8 5 % Polyacrylamidgel
Millipore H ₂ O	43 %	70 %
TRIS	25 % (1,5 mol/l, pH 8,8)	13 % (1 mol/l, pH 6,8)
SDS	1 %	1 %
Rotiphorese-Mix 40% (37.5:1)	30 %	15 %
TEMED	0.1 %	0.1 %
APS 10% in H ₂ O (v/v)	1 %	1 %

Die Gele wurden in Kunststoffkassetten von Invitrogen gegossen und nach dem Aushärten (ca. 20 min) wurde bis zur Verwendung mindestens eine Stunde gewartet oder die Gele bei 4 °C in mit Millipore-Wasser befeuchteten Papiertüchern aufbewahrt. Von den in 4.2.1.6.3 behandelten Lysaten wird ein Probenvolumen, das 45 µg Gesamtprotein enthält, mit einem Sechstel des Volumens an Blaupuffer (**Tab. 15**) versetzt und fünf Minuten lang bei 95 °C erhitzt (Denaturierung der Proteine) und anschließend wieder auf Eis gestellt.

Tab. 15: Zusammensetzung des Blaupuffers für die SDS-PAGE

Blaupuffer (5x, pH 6,8)	
10 %	SDS
0.25 M	TRIS
30 %	Saccharose
0.1 % (w/v)	Bromphenolblau
1 Spatelspitze	Frisch zugesetztes DTT

Zusätzlich zu den Proben wurde auf das Gel 5 µl eines Proteinmarkers (Prestained Protein Molecular Weight Marker, BIOMOL, **Abb. 161**) als Größenreferenz und als Positivkontrolle 25 ng HMOX1 (Recombinant Human HMOX1, Stressgen) mit 2,5 µl Blaupuffer aufgetragen.

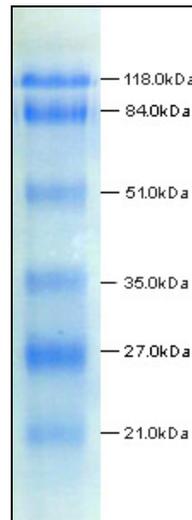


Abb. 161: Banden des Prestained Protein Molecular Weight Markers von BIOMOL

Die Auftrennung erfolgte bis zur sichtbaren Trennung der Markerbanden bei 20 mA / Gel und anschließend bei 40 mA / Gel.

4.2.1.6.5 Western-Blot^[59]

Beim Western-Blot werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel im elektrischen Feld auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Dafür werden in Sandwichbauweise auf die Anode des Blotters nacheinander je zwei in Anodenpuffer 1 und darüber zwei in Anodenpuffer 2 getränkte Blottingpapiere (Roth) gelegt. Anschließend wird die mit Millipore H₂O aktivierte Nitrocellulosemembran (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences), das aus der Kassette getrennte Gel und zwei in Kathodenpuffer getränkte Blottingpapiere aufgelegt. Der Transfer erfolgt bei 60 mA / Gel in 80 Minuten (Verwendete Puffersysteme: **Tab. 16**).

Tab. 16: Verwendete Puffersysteme, Einstellung der pH-Werte mit HCl bzw. NaOH

	Anode 1	Anode 2	Kathode	TBST
mM TRIS	300	25	25	50
% (v/v) Methanol p.a.	10	10	10	-
mM Glycin	-	-	40	-
mM NaCl	-	-	-	150
% Tween	-	-	-	0.1
pH	10.4	10.4	9.4	7.5

4.2.1.6.6 Immunologischer Nachweis der Hämoxxygenase

Freie Bindestellen der proteintragenden Membran werden mit 5 % Milchpulver (MP, blotting grade, Roth) in TBST (**Tab. 16**) für mindestens eine Stunde lang abgesättigt. Anschließend wird das MP verworfen und der Antikörper gegen die Hämoxxygenase (Anti-HMOX1, Epitomics, Rabbit Monoclonal Antibody, Verdünnung 1:1000) in 1 % MP in TBST hinzugegeben. Nach zwei Stunden bei RT wird die Membran für 30 min mit TBST gewaschen (Wechsel des TBST alle fünf Minuten) und anschließend für 1.5 Stunden mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Immuno-Pure Peroxidase gekoppelter Anti-Rabbit IgG, Pierce Biotechnology, Verdünnung 1:3000) in 1 % MP in TBST inkubiert. Vor der Behandlung mit der Lumineszenzlösung wird die Membran erneut für 30 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Membran wird für die Lumineszenzreaktion für eine Minute mit der frisch angesetzten Lumineszenzlösung (Femto-Kit (HMOX1) bzw. Pico-Kit (GAPDH), SuperSignal West, Pierce Biotechnology) inkubiert. Anschließend wird die Membran in einer lichtundurchlässigen Kassette auf einen Film (Biomax, Kodak) gelegt und für 10 bis 15 Minuten belichtet. Danach wird der Film entwickelt und fixiert. Je nach Intensität der Schwärzung der Banden wird ein weiterer Film belichtet (5 bis 30 Minuten).

4.2.1.6.7 Immunologischer Nachweis der Ladekontrolle

Um die Proteinladekontrolle, die Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH), nachzuweisen, werden zuerst die Antikörper gegen die HMOX1 von der Membran entfernt. Dazu wird die Membran bei 37 °C 45 min lang in 3 ml / Membran Stripping-Puffer (Pierce Biotechnology) geschüttelt und danach 15 min mit TBST gewaschen.

Analog dem Nachweis der HMOX1 (4.2.1.6.6) werden die freien Bindestellen der Membran eine Stunde lang mit 5 % MP abgesättigt. Anschließend wird die Membran mit dem Antikörper gegen die GAPDH (anti-GAPDH, Polyclonal Antibody, Mouse, Chemikon, Verdünnung 1:3000) in 5 % MP in TBST eine Stunde lang bei RT inkubiert. Es wird 15 Minuten lang mit TBST gewaschen und dann erneut eine Stunde lang mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Immuno-Pure Peroxidase gekoppelter Anti-Mouse IgG, Pierce Biotechnology, Verdünnung 1:3000) in 1 % MP in TBST inkubiert. Nach 10-minütigem Waschen mit TBST wird analog Kap. 4.2.1.6.6 die Membran mit der Lumineszenzlösung behandelt und die Filme belichtet und entwickelt.

4.2.1.6.8 Softwaregestützte Auswertung

Die belichteten Filme werden digitalisiert (Canon CanoScan 3000), mit dem Gnu Image Manipulation Program (GIMP 2.6) zugeschnitten und in das Graphics Interchange Format (gif.) umgewandelt. Die densitometrische Auswertung (Messung der optischen Dichte der geschwärzten Banden) erfolgte mit der Software ImageJ (1.41).

4.2.1.7 Statistik

Die Bestimmung der Mittelwerte, relativen Standardabweichungen (SD) und Signifikanzniveaus p (t-Test) werden mit der Software Microsoft Excel durchgeführt.

Für die Bestimmung der Signifikanzniveaus p wird ein heteroskedastischer (ungleiche Varianz der Stichproben) zweiseitiger t-Test verwendet. Für Signifikanzen p kleiner 0.05 (5 % Irrtumswahrscheinlichkeit) wird die Nullhypothese abgelehnt und damit die Mittelwerte als statistisch signifikant unterschiedlich angesehen.

Als Kontrollwerte in den jeweiligen Assays werden folgende Werte verwendet:

SRB-Assay (Kap. 4.2.1.3): Die Messwerte werden auf die Lösemittelkontrolle bezogen.

UVA-SRB (Kap. 4.2.1.5): Bezug der Messwerte auf beide Lösemittelkontrollen (0 J / cm^2 und 20 J / cm^2).

HMOX1-Assay (Kap. 4.2.1.6): Normierung der HMOX1-Proteinmenge auf die Menge der Ladekontrolle (GAPDH), Bezug der Messwerte auf die bestrahlte Lösemittelkontrolle.

4.2.2 Versuchsbeschreibungen

4.2.2.1 Toxizitätsmessungen (SRB-Assay, Kap. 4.2.1.3)

Die Messungen zur Toxizität wurden für jede Substanz und in jeder Konzentration 12-mal durchgeführt. Die relativen Zellviabilitäten (RCV, relative Lebendzellzahl) nach 24-stündiger Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde in drei verschiedenen Konzentrationen 12-mal gemessen und auf die Lösemittelkontrolle (100 %) bezogen (*Abb. 162* bis *Abb. 167*). Messungen ohne Lösemittel ergaben keinen signifikanten Unterschied zur Lösemittelkontrolle (Daten nicht abgebildet).

4.2.2.1.1 $V_{\text{Tox}1}$: Zeaxanthin

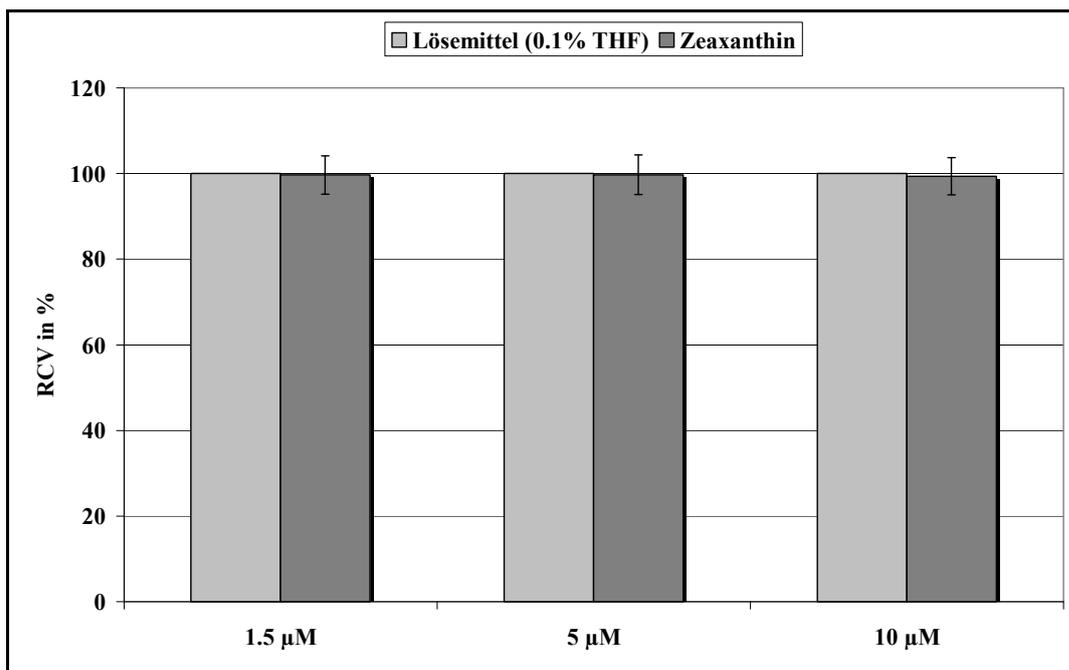


Abb. 162: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach der Behandlung mit Zeaxanthin

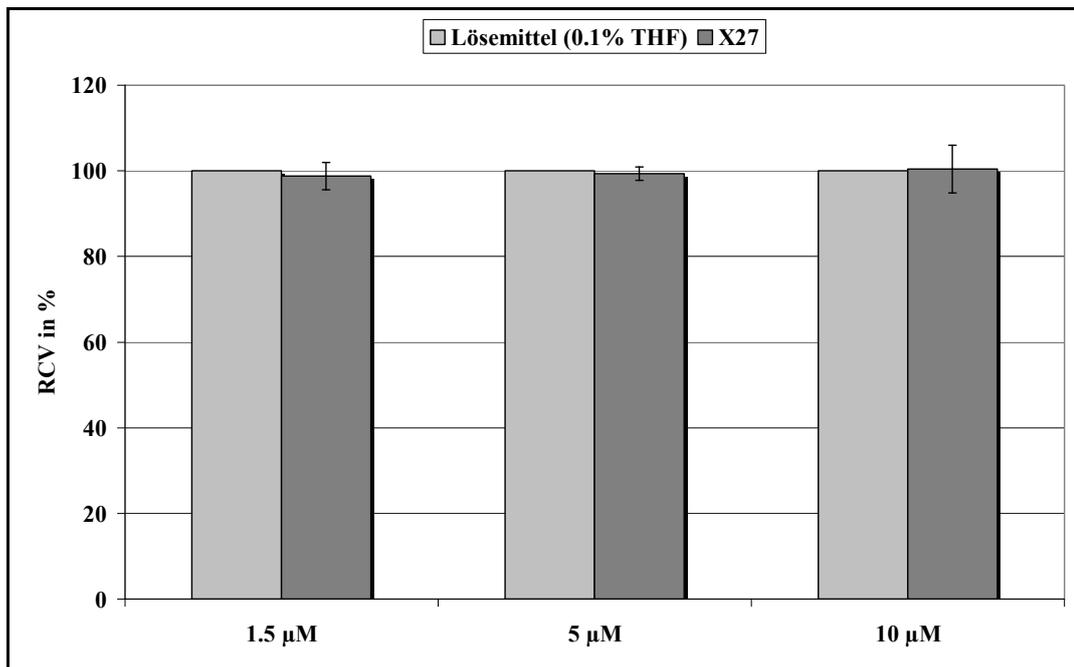
4.2.2.1.2 $V_{\text{Tox}2}$: 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (X27)

Abb. 163: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach der Behandlung mit 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (X27)

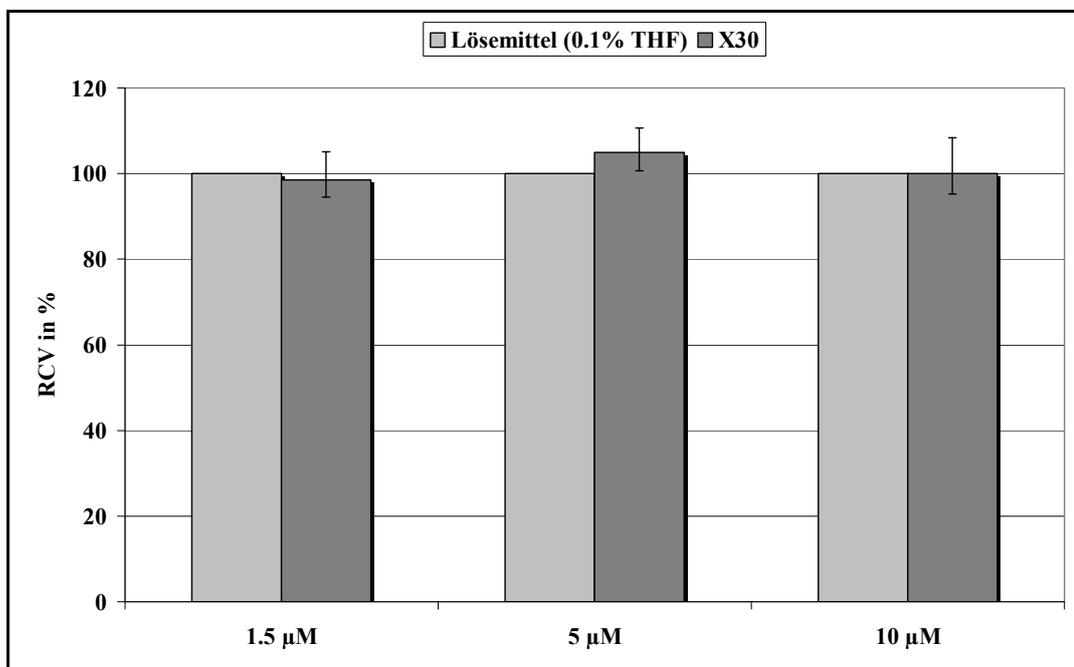
4.2.2.1.3 $V_{\text{Tox}3}$: 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthiny)flavon (X30)

Abb. 164: Relative Zellviabilität 24 h nach der Behandlung mit 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthiny)flavon (X30)

4.2.2.1.4 $V_{\text{Tox}4}$: 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**)

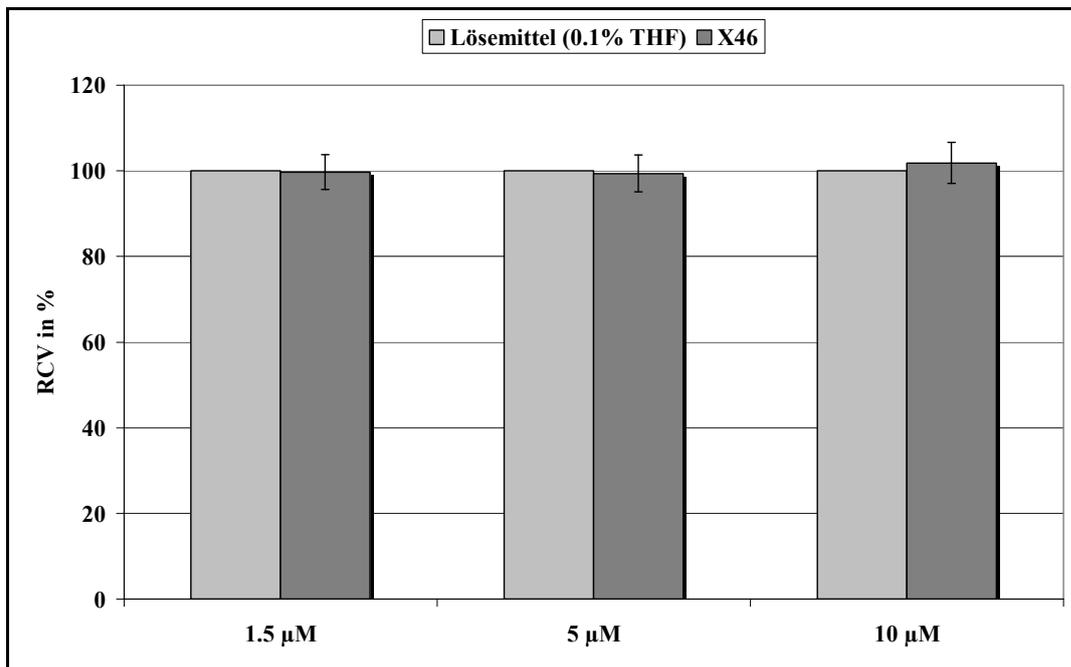


Abb. 165: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach der Behandlung mit 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**)

4.2.2.1.5 $V_{\text{Tox}5}$: 4'-Hydroxyflavon (**X102**)

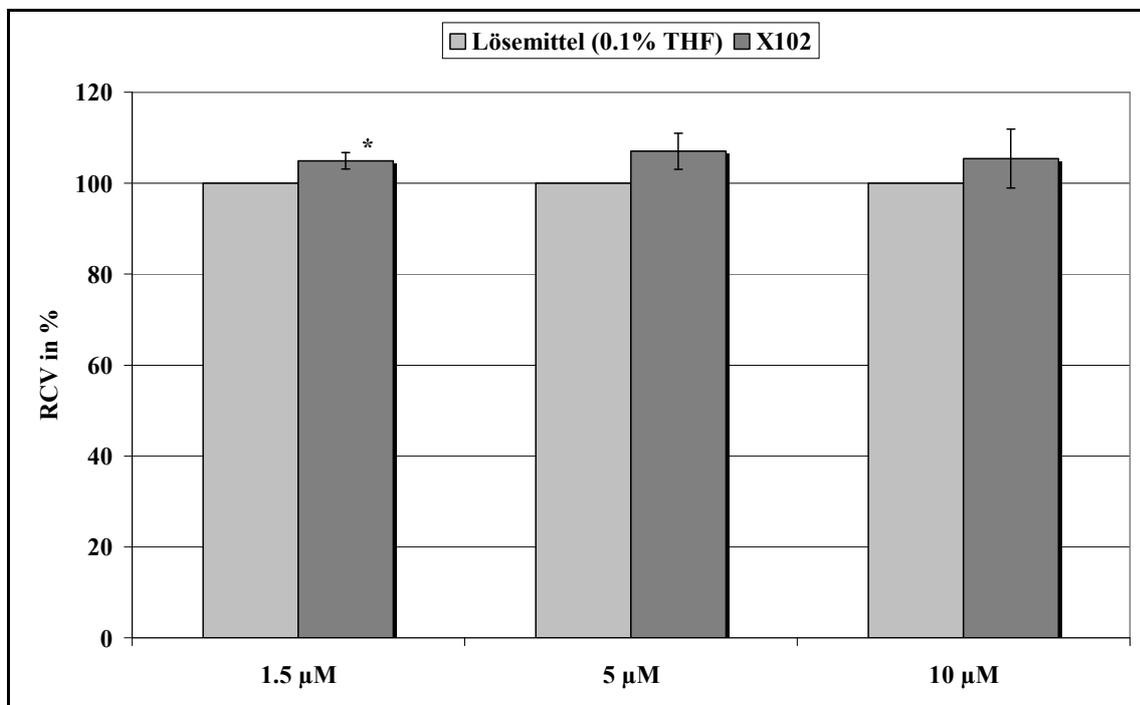


Abb. 166: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach der Behandlung mit 4'-Hydroxyflavon (**X102**)

Bei der Behandlung mit dem 4'-Hydroxyflavon (**X102**) konnte in der Konzentration von 1.5 μM eine geringe, aber statistisch signifikante (*) Erhöhung der Lebendzellzahl festgestellt werden.

4.2.2.1.6 $V_{\text{Tox}6}$: (11'-Apo- β -carotinyll)-benzol (**X104**)

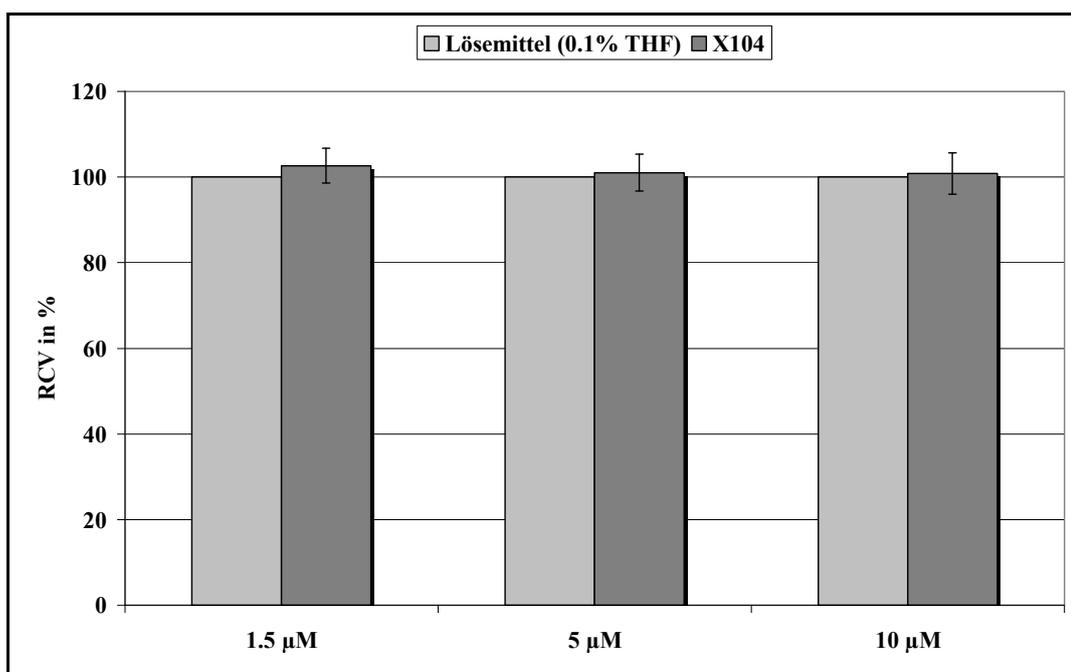


Abb. 167: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach der Behandlung mit (11'-Apo- β -carotinyll)-benzol (**X104**)

Es konnte bei keiner Substanz eine statistisch signifikante Verringerung der Zellzahl im Vergleich zu der jeweiligen Lösemittelkontrolle festgestellt werden. Keine der eingesetzten Verbindungen war in einer der verwendeten Konzentrationen zelltoxisch.

4.2.2.2 Toxizitätsmessungen nach UVA Bestrahlung (UVA-SRB, Kap. 4.2.1.5)

Die Messungen zur Toxizität nach UVA-Bestrahlung wurden für jede Substanz und in jeder Konzentration 12-mal durchgeführt. Messungen ohne Lösemittel ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Lösemittelkontrolle (Daten nicht abgebildet). Signifikante Unterschiede der Messwerte zur unbestrahlten Kontrollmessung sind mit einem Asterisk (*) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede der Messwerte bei 20 J/cm^2 gegenüber der bestrahlten Lösemittelkontrolle sind mit zwei Asterisken (**) hervorgehoben.

4.2.2.2.1 V_{UVTox1} : Zeaxanthin

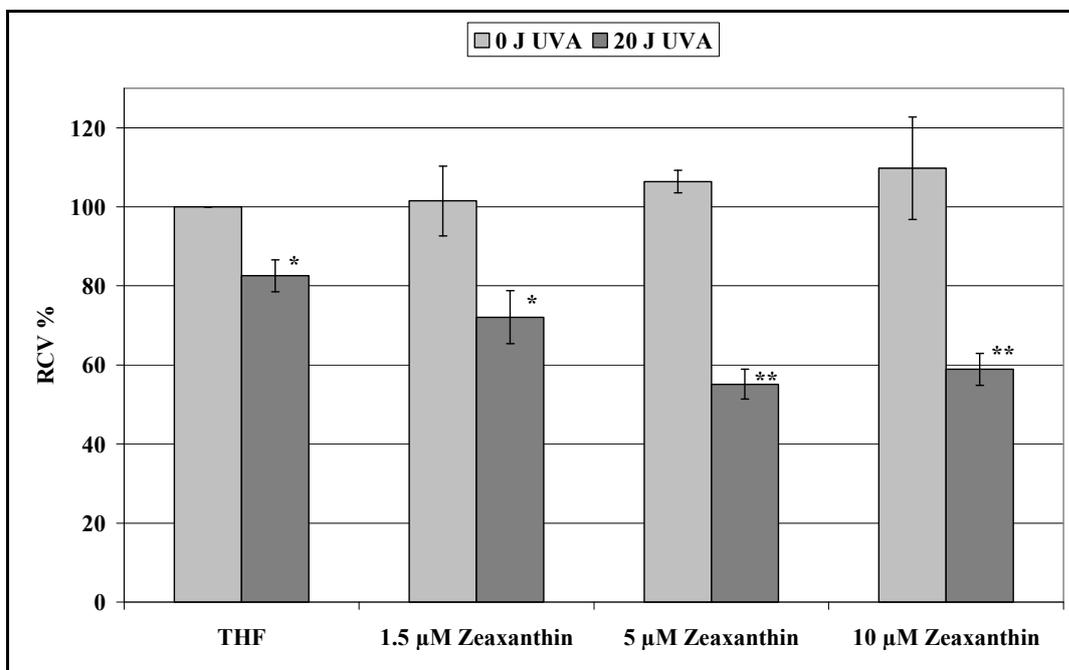


Abb. 168: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach 20 J/cm^2 UVA (24 h mit Zeaxanthin präinkubiert)

Bei der Bestrahlung der Lösemittelkontrolle und der Messung mit $1.5 \mu\text{M}$ Zeaxanthin (im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen) haben signifikant weniger Zellen überlebt. Bei der Verwendung von Zeaxanthin war in den beiden höheren Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ unter UVA-Einwirkung die Lebendzellzahl signifikant geringer als in der bestrahlten Lösemittelkontrolle.

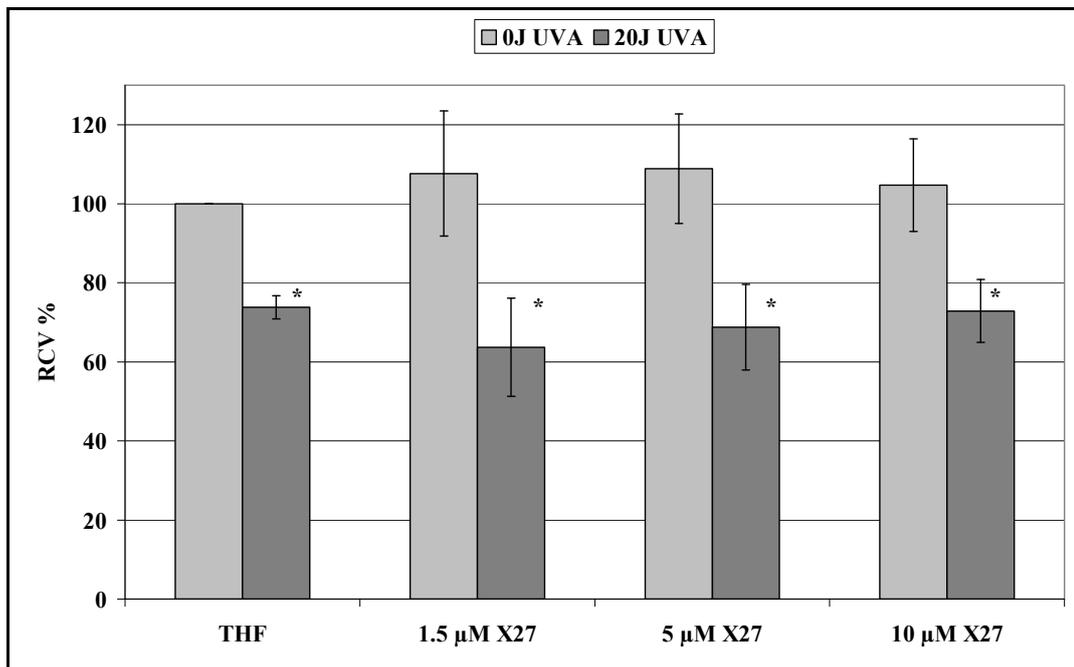
4.2.2.2.2 $V_{\text{UVTox}2}$: 4'-(11'-Apo- β -carotiny)flavon (**X27**)

Abb. 169: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach 20 J/cm² UVA (24 h mit X27 präinkubiert)

In allen Fällen war die Zellzahl der bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Messungen signifikant verringert. In den bestrahlten Proben gab es keine signifikanten Unterschiede zur bestrahlten Kontrolle.

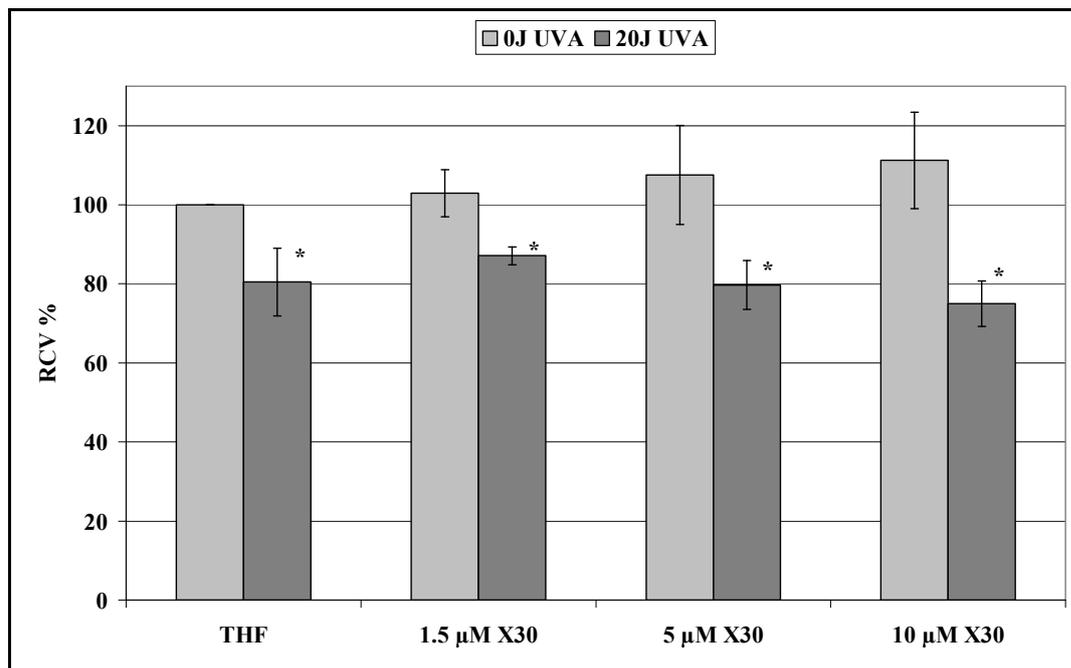
4.2.2.2.3 V_{UVTox3} : 4'-(12-Apo-(R)-zeaxanthinyl)flavon (**X30**)

Abb. 170: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach 20 J/cm² UVA (24 h mit X30 präinkubiert)

Wie bei Verbindung **X27** war bei Verbindung **X30** in allen Konzentrationen die Zellzahl der bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Messungen signifikant verringert. In den bestrahlten Proben gab es keine signifikanten Unterschiede zur bestrahlten Kontrolle.

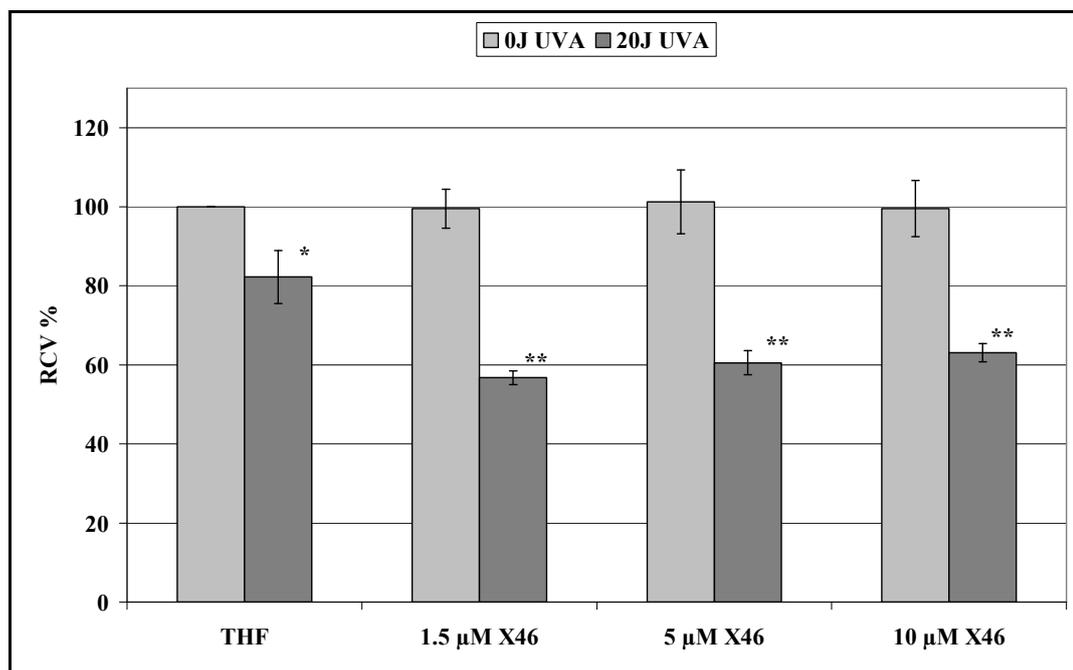
4.2.2.2.4 V_{UVTox4} : 6-(11'-Apo- β -carotinyloxy)-4'-hydroxyflavon (**X46**)

Abb. 171: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach 20 J/cm^2 UVA (24 h mit **X46** präinkubiert)

In allen drei verwendeten Konzentrationen von Verbindung **X46** konnten unter UVA-Einwirkung im Vergleich zur bestrahlten Lösemittelkontrolle eine signifikant verminderte Lebendzellzahl festgestellt werden.

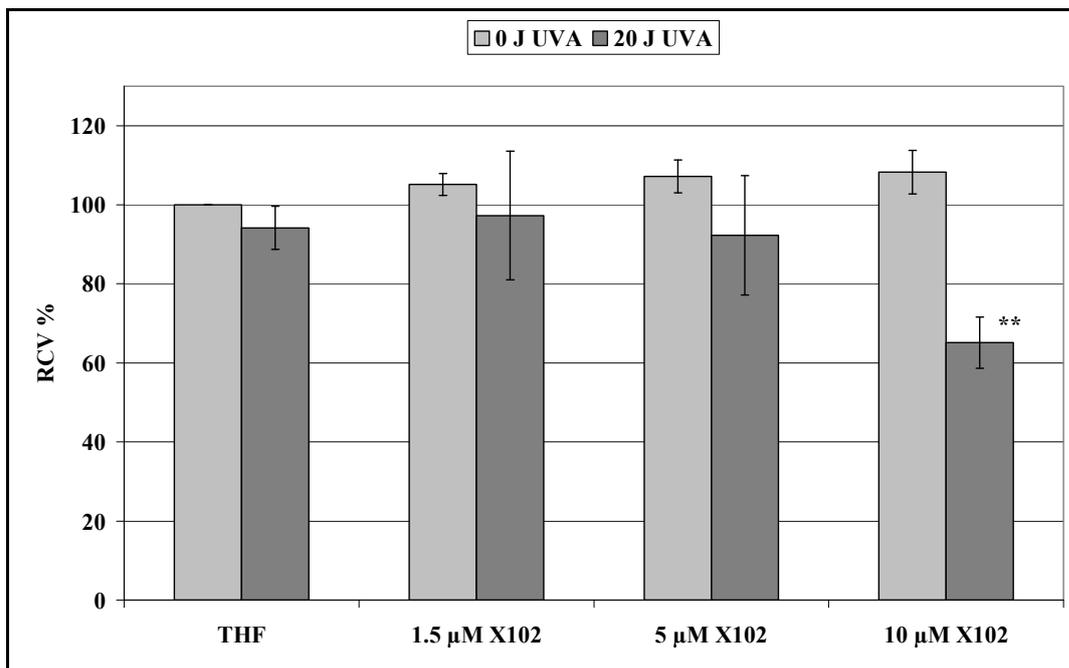
4.2.2.2.5 V_{UVTox5} : 4'-Hydroxyflavon (**X102**)

Abb. 172: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach 20 J/cm² UVA (24 h mit **X102** präinkubiert)

Nur in der Konzentration von 10 μM **X102** unter UVA-Einwirkung konnten signifikante Unterschiede zur Lösemittelkontrolle festgestellt werden. Die Zellzahl war im Vergleich zu beiden Lösemittelkontrollen (0 und 20 J/cm²) verringert.

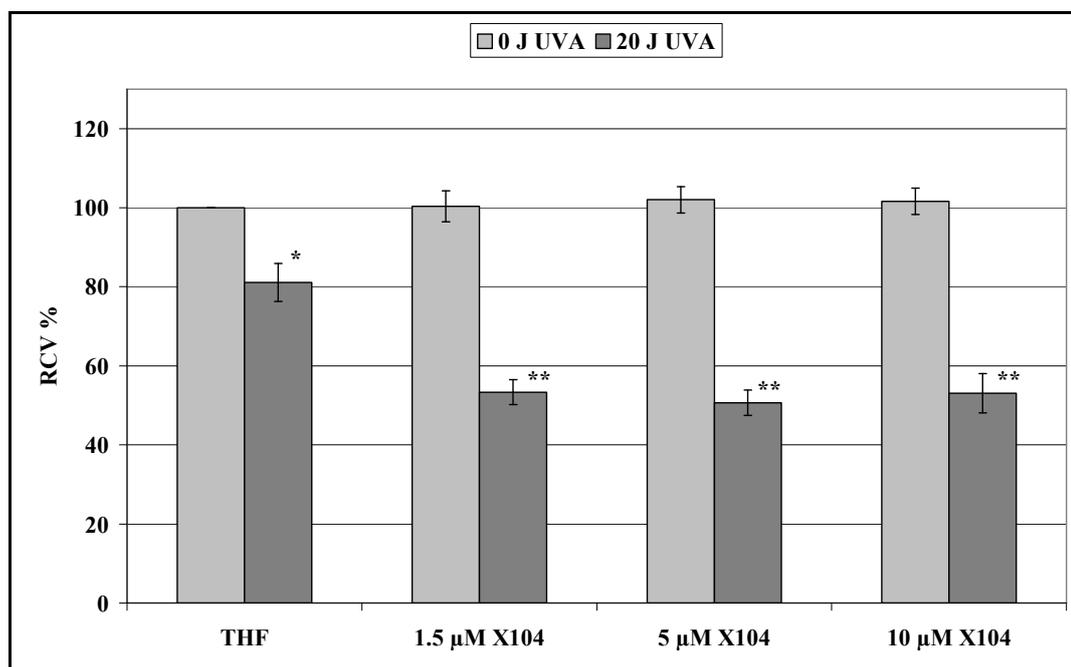
4.2.2.2.6 V_{UVTox6} : (11'-Apo- β -carotinyI)-benzol (**X104**)

Abb. 173: Relative Zellviabilität (RCV) 24 h nach 20 J/cm² UVA (24 h mit **X104** präinkubiert)

Wie bei Verbindung **X46** wurde in allen drei verwendeten Konzentrationen von Verbindung **X104** unter UVA-Einwirkung im Vergleich zur bestrahlten Lösemittelkontrolle eine signifikant verminderte Lebendzellzahl gemessen.

Keine der eingesetzten Verbindungen konnte der Phototoxizität der UVA-Strahlung entgegenwirken. Bei der Verwendung von Zeaxanthin, **X46** und **X104** sind die Lebendzellzahlen im Vergleich zu den Lösemittelkontrollen verringert. Auch bei der Verwendung von **X102** in der höchsten Konzentration war eine erhöhte Phototoxizität zu beobachten. Durch die Inkubation mit **X27** und **X30** gab es keine statistisch signifikante Änderung der Lebendzellzahl unter UVA-Einwirkung.

4.2.2.3 Hämoxygenase-Induktion durch UVA (HMOX1-Assay, Kap. 4.2.1.6)

Die Zellen wurden wie beschrieben inkubiert (Kap. 4.2.1.2) und bestrahlt (4.2.1.4), und dem HMOX1-Assay (4.2.1.6) unterzogen. Der HMOX1-Assay wurde dreimal pro untersuchter Verbindung und Konzentration durchgeführt.

Exemplarisch werden jeweils für einen Versuch die Western-Blots abgebildet und die zusammengefassten Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung dargestellt.

4.2.2.3.1 V_{HMOX1} : 6-(11'-Apo- β -carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**)

Für die Verbindung **X46** in drei verschiedenen Konzentrationen und Zellen der Passage 14 wird folgendes Ergebnis erhalten (*Abb. 174*):

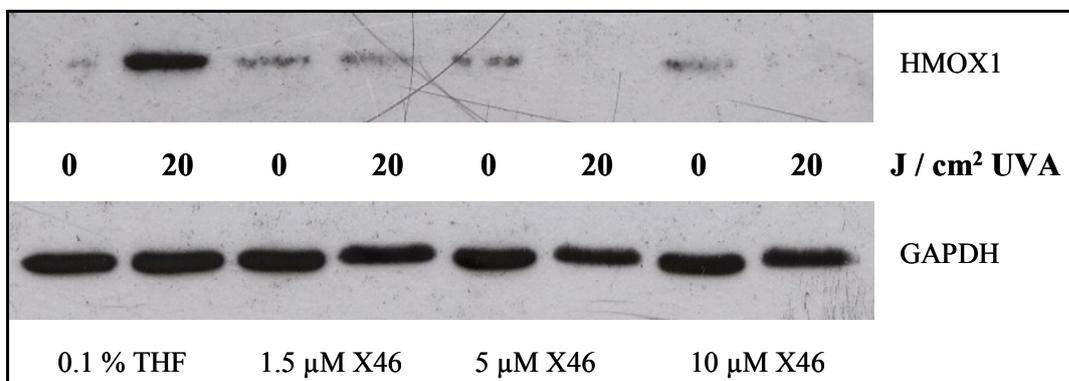


Abb. 174: HMOX1 und GAPDH nach 0 J/cm² bzw. 20 J/cm² UVA und Präinkubation mit X46 (Western-Blot)

Bei der Lösemittelkontrolle ist durch eine Bestrahlung mit 20 J/cm² eine deutliche Steigerung der Proteinmenge an Hämoxygenase zu erkennen. Für alle Konzentrationen von Verbindung **X46** unter UVA-Einwirkung ergibt sich eine deutlich geringere Menge an HMOX1. Die Menge an Proteinladekontrolle (GAPDH) ist für diese Messungen etwas geringer als bei der bestrahlten Kontrolle. Die optische Dichte der Banden wird bestimmt und die Werte für die HMOX1 auf die zugehörigen Werte der GAPDH normiert. Die Mittelwerte der Messungen werden relativ zu der bestrahlten Lösemittelkontrolle angegeben (*Abb. 175*):

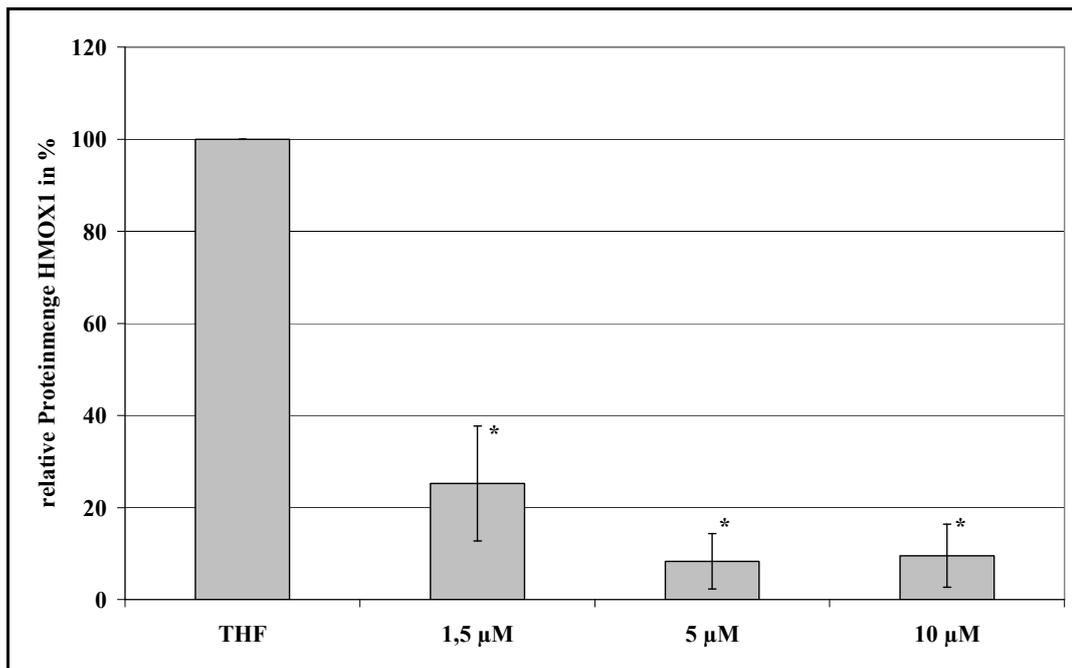


Abb. 175: HMOX1-Induktion durch 20 J/cm^2 UVA nach 24 h und Präinkubation mit **X46** ($n=3$)

Die Proteinmenge an Hämoxygenase wurde bereits ab einer Konzentration von $1.5 \mu\text{M}$ **X46** signifikant auf einen Wert von $(25 \pm 12) \%$ der Kontrolle gesenkt. Die Messwerte in den höheren Konzentrationen ergeben sich zu $(8 \pm 6) \%$ für $5 \mu\text{M}$ und $(9 \pm 7) \%$ für eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ **X46**. In den höheren Konzentrationen wurde die Menge an HMOX1 bei einigen der Messungen optisch unter der Nachweisgrenze. Bei der densitometrischen Auswertung mit ImageJ ergeben sich für die Bandenflächen höhere Intensitäten der optischen Dichte als für den Hintergrund. Aus diesem Grund wurden diese Messwerte mit aufgenommen.

4.2.2.3.2 V_{HMOX2} : 4'-Hydroxyflavon (**X102**)

Für die Verbindung **X102** in drei verschiedenen Konzentrationen und Zellen der Passage 20 wird folgendes Ergebnis erhalten (*Abb. 176*):

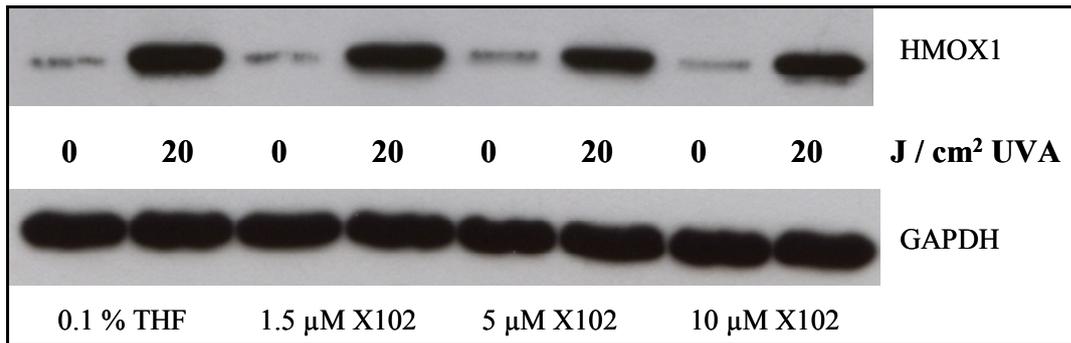


Abb. 176: HMOX1 und GAPDH nach 0 J/cm² bzw. 20 J/cm² UVA und Präinkubation mit X102 (Western-Blot)

Wie zuvor ist bei der Lösemittelkontrolle ist durch die Bestrahlung mit 20 J/cm² eine deutliche Steigerung der Proteinmenge an Hämoxigenase zu erkennen. Für alle Konzentrationen von Verbindung X102 unter UVA-Einwirkung ergibt sich eine ähnlich große Menge an HMOX1. Die optische Dichte der Banden wird bestimmt und die Werte für die HMOX1 auf die zugehörigen Werte der GAPDH normiert. Die Mittelwerte der Messungen werden relativ zu der bestrahlten Lösemittelkontrolle angegeben (Abb. 177):

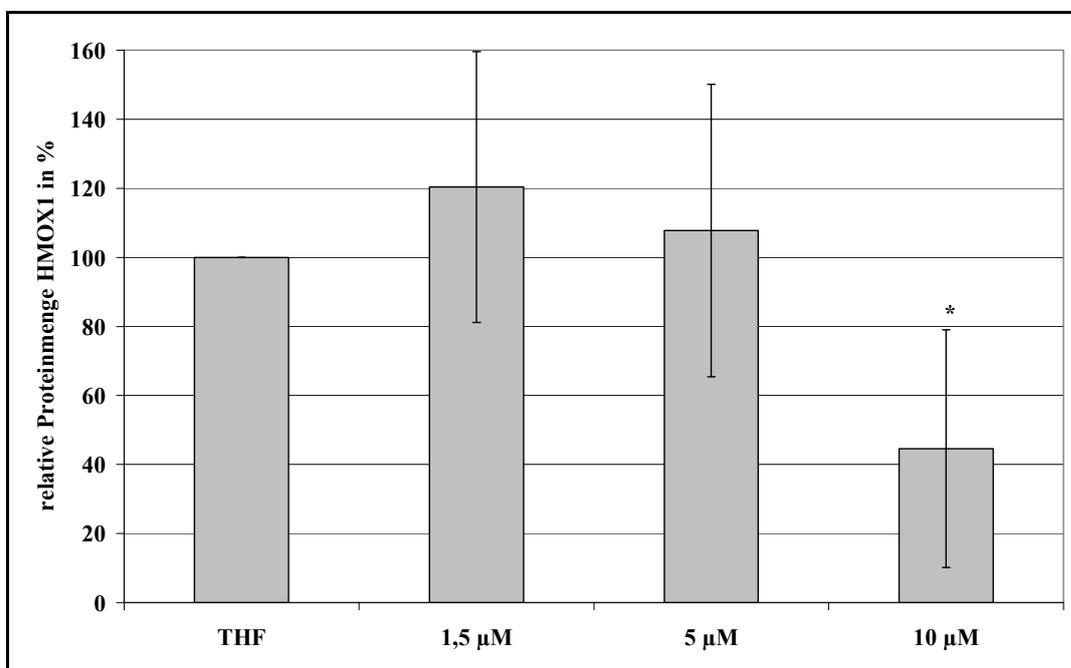


Abb. 177: HMOX1-Induktion durch 20 J/cm² UVA nach 24 h und Präinkubation mit X102 (n=3)

Bei den Konzentrationen von 1.5 μM und 5 μM **X102** konnten keine signifikanten Unterschiede zur bestrahlten Lösemittelkontrolle festgestellt werden. Es ergaben sich folgende Werte: $(120 \pm 39) \%$ für 1.5 μM und $(108 \pm 42) \%$ für eine Konzentration von 5 μM **X102**. Erst bei einer Konzentration von 10 μM **X102** war die Menge an HMOX1 im Vergleich zur bestrahlten Lösemittelkontrolle signifikant verringert. Die Menge an HMOX1 wurde auf $(45 \pm 34) \%$ der Kontrolle gesenkt.

4.2.2.3.3 V_{HMOX3} : (11'-Apo- β -carotinyI)-benzol (**X104**)

Für die Verbindung **X104** in drei verschiedenen Konzentrationen und Zellen der Passage 20 wird folgendes Ergebnis erhalten (*Abb. 178*):

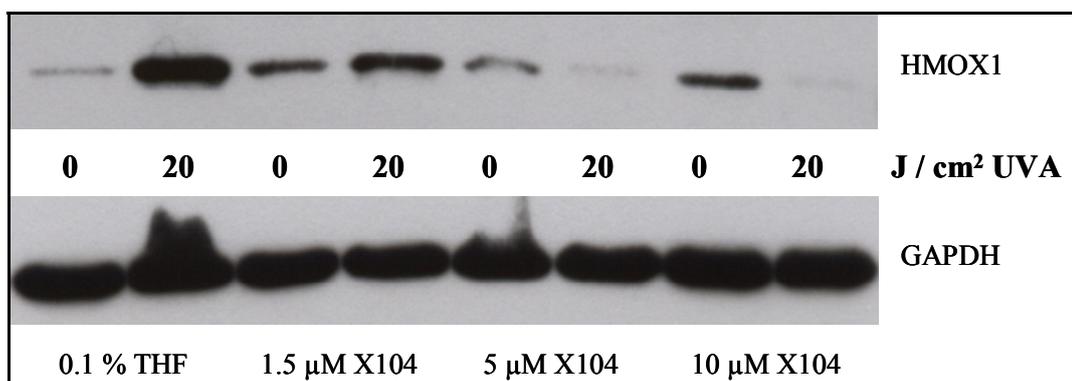


Abb. 178: HMOX1 und GAPDH nach 0 J/cm² bzw. 20 J/cm² UVA und Präinkubation mit X104 (Western-Blot)

Wie vorher ist bei der Lösemittelkontrolle ist durch eine Bestrahlung mit 20 J / cm² eine deutliche Steigerung der Proteinmenge an Hämoxxygenase zu erkennen Für alle Konzentrationen von Verbindung **X104** unter UVA-Einwirkung ergibt sich eine deutlich geringere Menge an HMOX1. Die optische Dichte der Banden wird bestimmt und die Werte für die HMOX1 auf die zugehörigen Werte der GAPDH normiert. Die Mittelwerte der Messungen werden relativ zu der bestrahlten Lösemittelkontrolle angegeben (*Abb. 179*):

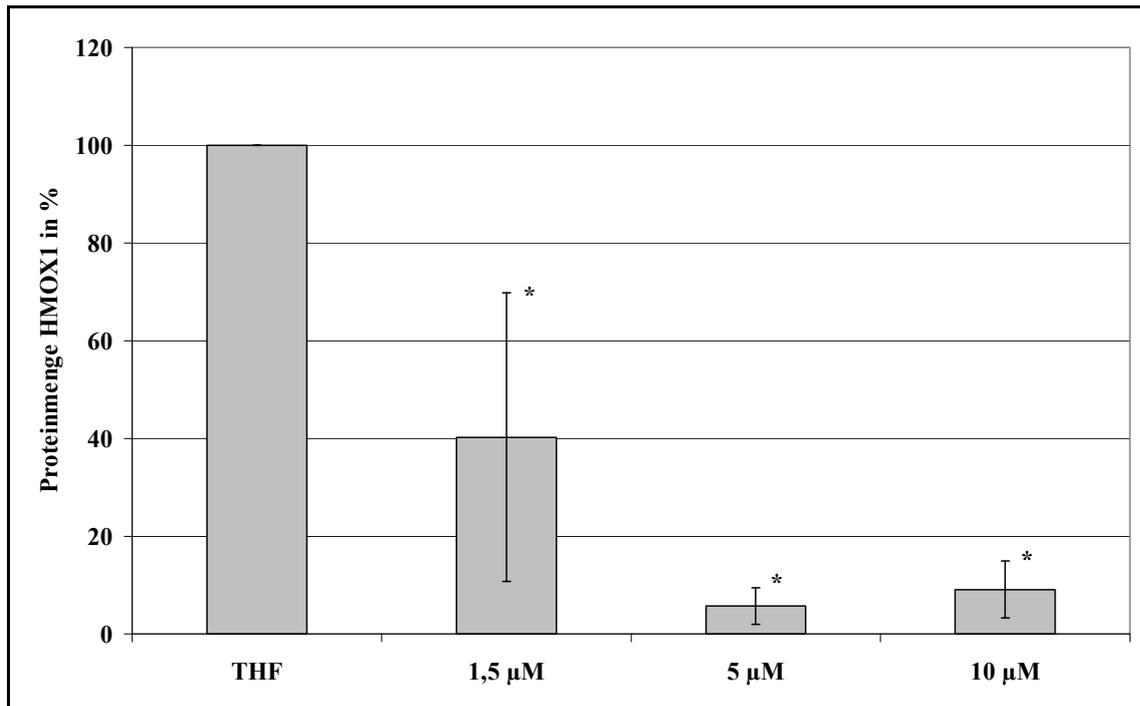


Abb. 179: HMOX1-Induktion durch $20 J/cm^2$ UVA nach 24 h und Präinkubation mit X104 ($n=3$)

Die Proteinmenge an Hämoxygenase wurde ähnlich wie bei Verbindung X46 bereits ab einer Konzentration von 1.5 µM X104 signifikant auf einen Wert von (40 ± 29) % der Kontrolle gesenkt. In den höheren Konzentrationen ergeben sich die Messwerte zu (6 ± 4) % für 5 µM und (9 ± 6) % für eine Konzentration von 10 µM X46 gegenüber der bestrahlten Lösemittelkontrolle.

Durch alle drei verwendeten Verbindungen konnte die Menge an HMOX1 vermindert werden. Dafür waren unterschiedlich hohe Konzentrationen nötig. Das Carotenylflavonoid X46 und dessen polyenische Substruktur X104 haben bereits in einer Konzentration von 1.5 µM die Menge der HMOX1 auf 25 – 40 % der bestrahlten Lösemittelkontrolle senken können. Bei der Verwendung der Flavon-Substruktur X102 war eine Konzentration von 10 µM nötig um die Menge der HMOX1 auf 45 % der Lösemittelkontrolle zu senken.

5 Literatur

- [1] W. Stahl, H. Sies, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2002**, *15*, 291.
- [2] R. P. Sinha, D. P. Hader, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225.
- [3] R. M. Tyrrell, *Antioxid. Redox Signal.* **2004**, *6*, 835.
- [4] I. Sjerobabski Masnec, S. Poduje, *Coll. Antropol.* **2008**, *32 Suppl 2*, 177.
- [5] U. Schönfelder, *Dissertation, Martin-Luther-Universität (Halle-Wittenberg)*, **1999**.
- [6] E. Kvam, R. M. Tyrrell, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 2379.
- [7] A. J. Ridley, J. R. Whiteside, T. J. McMillan, S. L. Allinson, *Int. J. Radiat. Biol.* **2009**, *85*, 177.
- [8] E. Galecka, R. Jacewicz, M. Mrowicka, A. Florkowski, P. Galecki, *Pol. Merkur. Lekarski* **2008**, *25*, 266.
- [9] W. P. Roos, B. Kaina, *Trends Mol. Med* **2006**, *12*, 440.
- [10] G. P. Moss, *Pure Appl. Chem.* **1975**, *41*, 405.
- [11] H.-D. Martin, S. Kock, R. Scherrers, K. Lutter, T. Wagener, C. Hundsdörfer, S. Frixel, K. Schaper, H. Ernst, W. Schrader, H. Görner, W. Stahl, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 406.
- [12] H.-D. Martin, S. Kock, R. Scherrers, K. Lutter, T. Wagener, C. Hundsdörfer, S. Frixel, K. Schaper, H. Ernst, W. Schrader, H. Goerner, W. Stahl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 400.
- [13] C. M. Marian, S. C. Kock, C. Hundsdörfer, H. D. Martin, W. Stahl, E. Ostroumov, M. G. Mueller, A. R. Holzwarth, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 270.
- [14] G. P. Moss, P. A. S. Smith, D. Tavernier, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1307.
- [15] N. Cotelle, *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 569.
- [16] W. Stahl, U. Heinrich, O. Aust, H. Tronnier, H. Sies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 238.
- [17] U. Heinrich, K. Neukam, H. Tronnier, H. Sies, W. Stahl, *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1565.
- [18] W. Stahl, H. Sies, *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 26.

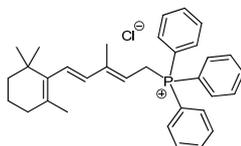
- [19] O. Aust, W. Stahl, H. Sies, H. Tronnier, U. Heinrich, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2005**, *75*, 54.
- [20] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44.
- [21] L. R. C. Barclay, M. C. Basque, V. C. Stephenson, M. R. Vinqvist, *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 248.
- [22] Z. Mehrdad, *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt am Main)*, **2002**.
- [23] H.-R. Li, L.-Z. Wu, C.-H. Tung, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2446.
- [24] A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, **1995**.
- [25] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, *Carotenoids 4: Special Molecules, Special Properties*, **2008**.
- [26] C. Busset, P. Mazellier, M. Sarakha, J. De Laat, *J. Photoch. Photobio. A* **2007**, *185*, 127.
- [27] S. Beutner, S. Frixel, H. Ernst, T. Hoffmann, I. Hernandez-Blanco, C. Hundsdoerfer, N. Kiesendahl, S. Kock, H.-D. Martin, B. Mayer, P. Noack, A. Perez-Galvez, G. Kock, R. Scherrers, W. Schrader, S. Sell, W. Stahl, *ARKIVOC* **2007**, *2007*, 279.
- [28] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, *Carotenoids 2: Synthesis*, **1996**.
- [29] W. Baker, *J. Chem. Soc.* **1933**, 1381.
- [30] H. S. Mahal, K. Venkataraman, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1767.
- [31] J. A. Haugan, S. Liaaen-Jensen, *Acta. Chem. Scand.* **1994**, *48*, 899.
- [32] T. S. Wheeler, *Organic Synth.* **1952**, *32*, 72.
- [33] T. S. Wheeler, *Organic Synth.* **1963**, *4*, 478.
- [34] G. Baziard-Mouysset, G. W. Tchani, J. L. Stigliani, M. Payard, R. Bonnafous, J. Tisne-Versailles, *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, *28*, 539.
- [35] G. Wurm, M. Nordmann, *Arch. Pharm.* **1988**, *321*, 555.
- [36] F. Cramer, G. H. Elschmig, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 1.
- [37] H.-D. Martin, S. Beutner, S. Frixel, H. Ernst, S. Haremza, T. Hoffmann, I. Hernandez-Blanco, N. Kiesendahl, B. Mayer, P. Noack, C. Ruck, *Advances in Colour Science and Technology* **2002**, *5*, 103.

- [38] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, **2005**.
- [39] S. Saxena, J. K. Makrandi, S. K. Grover, *Synthesis* **1985**, 6-7, 697.
- [40] S. Goyal, M. R. Parthasarathy, *Ind. J. Chem. B* **1992**, 31, 391.
- [41] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107.
- [42] A. T. Dinkova-Kostova, *Planta Med.* **2008**, 74, 1548.
- [43] K. Yano, S. Ohno, Y. Nakajima, S. Toyoshima, S. Nakajin, *J. Health Sci.* **2003**, 49, 195.
- [44] R. M. Tyrrell, **2004**, 6, 835.
- [45] D. Baltschun, S. Beutner, K. Briviba, H.-D. Martin, J. Paust, M. Peters, S. Röver, H. Sies, W. Stahl, A. Steigel, F. Stenhorst, *Liebigs Ann.* **1997**, 1997, 1887.
- [46] K. T. Borkhade, M. G. Marathey, *Ind. J. Chem.* **1970**, 8, 796.
- [47] T.-H. Chan, L. M.-C. Chow (Hong-Kong-Polytechnic-University), WO2007135592
- [48] G. Beck, U. Schacht, K. Kessler, E. Granzer (Hoechst-AG), EP450588
- [49] C.-C. Peng, T. Rushmore, G. J. Crouch, J. P. Jones, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4064.
- [50] C. T. Davis, T. A. Geissman, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3507.
- [51] J. H. Looker, M. J. Holm, J. L. Minor, S. A. Kagal, *J. Het. Chem.* **1964**, 1, 253.
- [52] J. Greenham, J. B. Harborne, C. A. Williams, *Phytochem. Anal.* **2003**, 14, 100.
- [53] Y. P. Keepers, P. E. Pizao, G. J. Peters, J. van Ark-Otte, B. Winograd, H. M. Pinedo, *Eur. J. Cancer.* **1991**, 27, 897.
- [54] G. Monfrecola, L. Casula, E. M. Procaccini, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **1997**, 8, 258.
- [55] K. D. Poss, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 10925.
- [56] S. M. Keyse, R. M. Tyrrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 99.
- [57] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [58] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680.
- [59] W. N. Burnette, *Anal. Biochem.* **1981**, 112, 195.

6 Substanzverzeichnis

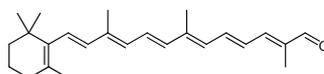
Edukt **BASF 1**: 12-Apo-(*R*)-zeaxanthinyl-12-phosphonium-chlorid

(5-((*R*)-4-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)-3-methylpenta-2,4-dienyl)triphenylphosphonium-chlorid



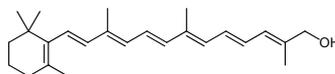
Edukt **BASF 2**: 12'-Apo-β-carotin-12'-al

2,7,11-Trimethyl-13-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-trideca-2,4,6,8,10,12-hexaenal



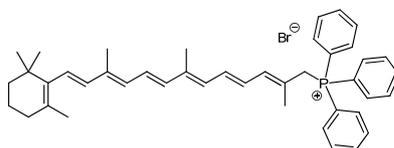
V1: 12'-Apo-β-carotin-12'-ol (**X6**)

2,7,11-Trimethyl-13-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)trideca-2,4,6,8,10,12-hexaen-1-ol

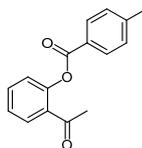


V2: 12'-Apo-β-carotinyl-12'-triphenylphosphonium-bromid (**X21**)

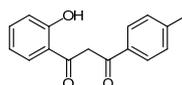
Triphenyl(2,7,11-trimethyl-13-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)-trideca-2,4,6,8,10,12-hexaenyl)phosphonium-bromid

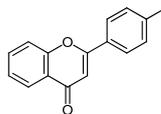
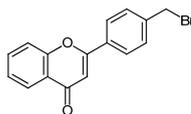
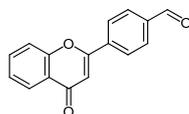
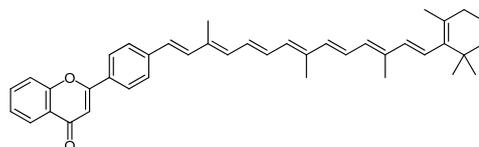
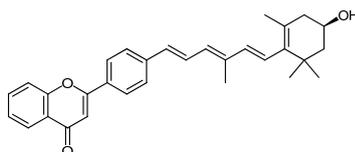
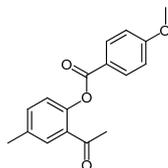
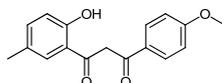


V3: (2-Acetylphenyl)-4-methylbenzoat (**X22**)

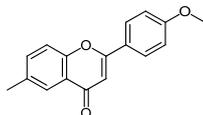


V4: 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-tolyl)propan-1,3-dion (**X23**)

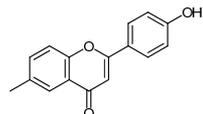


V5: 4'-Methylflavon (**X24**)2-(*p*-Tolyl)-4*H*-chromen-4-onV6: 4'-Bromomethylflavon (**X25**)2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-4*H*-chromen-4-onV7: 4'-Formylflavon (**X26**)4-(4-Oxo-4*H*-chromen-2-yl)benzaldehydV8: 4'-(11'-Apo-β-carotiny)lflavon (**X27**)2-(4-(3,8,12-Trimethyl-14-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)tetradeca-1,3,5,7,9,11,13-heptaenyl)phenyl)-4*H*-chromen-4-oneV9: 4'-(12-Apo-(*R*)-zeaxanthinyl)flavon (**X30**)2-(4-(6-((*R*)-4-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)-4-methylhexa-1,3,5-trienyl)phenyl)-4*H*-chromen-4-oneV10: (2-Acetyl-4-methylphenyl)-4-methoxybenzoat (**X39**)V11: 1-(*o*-Hydroxy-5-methylphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (**X40**)

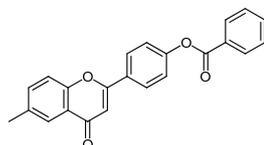
V12: 4'-Methoxy-6-methylflavon (**X41**)
2-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-4*H*-chromen-4-on



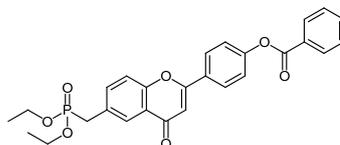
V13: 4'-Hydroxy-6-methylflavon (**X42**)
2-(4-Hydroxyphenyl)-6-methyl-4*H*-chromen-4-on



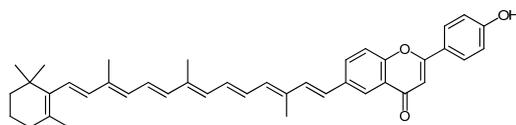
V14: 4'-Benzoyloxy-6-methylflavon (**X43**)
4-(6-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenylbenzoat



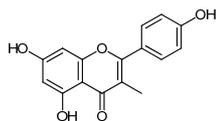
V15: 4'-Benzoyloxy-6-((diethoxyphosphoryl)methyl)flavon (**X45**)
4-(6-((Diethoxyphosphoryl)methyl)-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenyl benzoat



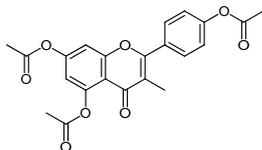
V16: 6-(11'-Apo-β-carotiny)-4'-hydroxyflavon (**X46**)
2-(4-Hydroxyphenyl)-6-(3,8,12-trimethyl-14-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)tetradeca-1,3,5,7,9,11,13-heptaenyl)-
4*H*-chromen-4-on



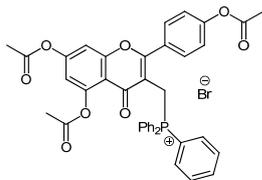
V17: 5,7,4'-Trihydroxy-3-methylflavon (**X69**)
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-methyl-4*H*-chromen-4-on



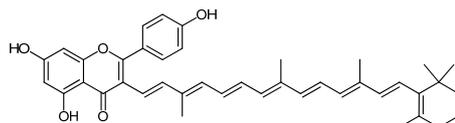
V18: 5,7,4'-Triacetoxy-3-methylflavon (**X70**)
2-(4-Acetoxyphenyl)-3-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-5,7-diyl diacetat



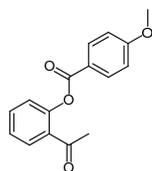
V19: 5,7,4'-Triacetoxyflavon-3-yl-methyl-triphenyl-phosphonium-bromid (**X72**)
(5,7-Diacetoxy-2-(4-acetoxyphenyl)-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)methyltriphenylphosphoniumbromid



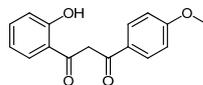
V20: 3-(11'-Apo- β -carotiny)-5,7,4'-trihydroxyflavon (**X73**)
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-(3,8,12-trimethyl-14-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)tetradeca-1,3,5,7,9,11,13-heptaenyl)-4*H*-chromen-4-on X73



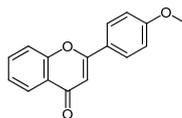
V21: (2-Acetylphenyl)-4-methoxybenzoat (**X99**)



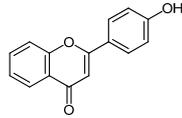
V22: 1-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(*p*-anisoyl)propan-1,3-dion (**X100**)



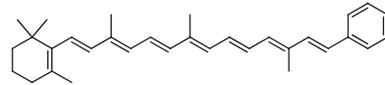
V23: 4'-Methoxyflavon (**X101**)
2-(4-methoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-on



V24: 4'-Hydroxyflavon (**X102**)
2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-chromen-4-on



V25: (11'-Apo- β -carotiny)benzol (**X104**)
(14-(6,6-Dimethylcyclohex-1-enyl)-3,8,12-trimethyltetradeca-1,3,5,7,9,11,13-heptaenyl)benzol



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Damen und Herren, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz besonders herzlich bedanken. Die Reihenfolge der Nennung steht in keiner Beziehung zur Größe der Dankesschuld:

Herrn Dr. Hansgeorg Ernst von der BASF danke ich für die Bereitstellung einiger Carotinoide und deren Vorstufen,

Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Schrader vom MPI in Mülheim a.d.R. für die Messung der hochaufgelösten Massen,

Frau Beate Rau und besonders Herrn Peter Behm für die vielen zeitnahen Messungen am NMR, die aufgrund der hohen Empfindlichkeit einiger Verbindungen nötig waren,

Herrn Dr. Peter Tommes und Herr Ralf Bürgel für die Aufnahme der Massenspektren an der HHU,

Frau Gaby Zerta für die zeitnah durchgeführten Elementaranalysen,

Frau Irmgard Menzel, Frau Dagmar Riedl und Frau Dagmar Koschel für die Messungen von IR-Spektren,

Frau Heidi Webers für die freundliche Unterstützung bei Bestellungen,

Herrn Eric Schönstein für die Bereitstellung von Glasgeräten und Gasbomben,

Herrn Dr. Dirk Prüstel für die Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten,

Frau Vera Foremny für Sekretariatsangelegenheiten,

Herrn Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper für seine stete Diskussionsbereitschaft in fachlichen Fragestellungen und die Durchsicht dieser Arbeit,

Herrn Dr. Bernhard Mayer für alle organisatorischen Angelegenheiten und die Hilfe bei der Behebung diverser Hard- und Softwareprobleme,

Herrn Dr. Stefan Beutner für den mir gewährten Freiraum als Praktikumsassistent im Biologie- Grundpraktikum und für seine stete Diskussionsbereitschaft,

allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Studenten der Arbeitskreise der chemischen Institute der HHU, die mich auf meinem Weg ein Stück weit begleitet haben, insbesondere Herrn Dr. Oszkar Keray, Herrn Dr. Thorsten Meier, Herrn Dr. Sebastian Kock, Frau Dr. Grit Kock insbesondere für die Durchsicht dieser Arbeit, Herrn Dr. Stefan Herweg, Frau Dr. Sonja Köhn, Frau Dr. Nicole Kiesendahl, Herrn Dr. Benjamin Willy, Herrn Dipl.-Chem. Peter Noack und Frau Dipl.-Chem. Brigitte Bier.

Frau Dr. Silke De Spirt, Frau Dipl.-Biol. Kaya Lutter, Frau Dipl.-Chem. Tanja Wagener und Frau Dipl.-Biol. Tatjana Brossette danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die wundervolle Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe. Frau Dr. Silke De Spirt und Frau Dipl.-Biol. Kaya Lutter danke ich darüber hinaus für die Einführung in die Zellkultur menschlicher Hautfibroblasten. Frau Dr. Silke De Spirt danke ich darüber hinaus für die kritische Durchsicht des biochemischen Teils dieser Arbeit.

Herrn Thomas Becher danke ich für alle EDV-Angelegenheiten,

Herrn Peter Graf und Frau Andrea Borchardt für ihre stete Hilfe und Diskussionsbereitschaft,

Frau Heide Krahl für ihre stete Hilfsbereitschaft, Herrn Norbert Mester für die Aufrechterhaltung des Laborbetriebs,

Frau Marlies Scholtes für Sekretariatsangelegenheiten,

darüber hinaus allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern im Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, mit denen ich meine (Arbeits-)Zeit dort verbringen durfte.

Herrn Dipl.-Biol. Ulrich Dirks danke ich insbesondere dafür, dass er mich auf den neu eingeführten Biochemiestudiengang an der HHU Düsseldorf aufmerksam gemacht hat und für viele interessante Diskussionen und Ideen im Bereich der Naturwissenschaften bei der einen oder anderen Kuvette aus Fertigkuchen.