

**Natürliche und synthetische polyenische und  
phenolische Wirkstoffe mit antioxidativen  
Eigenschaften: Synthese, Wirkungsmechanismen  
und Aktivitätsbestimmung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Marcus Schmidt**

aus Krefeld

Düsseldorf 2001



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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-D. Martin
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2001



Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Vergabe des Themas und die Gewährung der notwendigen Freiräume in der Gestaltung und Schwerpunktsetzung dieser Arbeit. Seine Anregungen und stete kritische Diskussion haben diese Arbeit immer begleitet und mitgeformt.



***Für meine Frau Julia, meine Eltern und  
meinen Bruder Klaus-Michael  
in ewiger Liebe, Dankbarkeit und Treue***



**11:15, restate my assumptions:**

1. Mathematics is the language of nature.
2. Everything around us can be represented and understood through numbers.
3. If you graph these numbers, patterns emerge.

**Therefore:** There are patterns ... everywhere in nature

Darren Aronofsky, „p“

Und dann gab ich mein Herz hin, um Weisheit zu erkennen und Wahnsinn zu erkennen, und ich habe Narrheit kennengelernt, daß auch dies ein Haschen nach Wind ist. Denn in der Fülle von Weisheit gibt es eine Fülle von Verdruß, so daß, wer Erkenntnis mehrt, Schmerz mehrt. (Prediger, 1, 17-18)



Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Ergebnisse in folgenden Publikationen teilweise veröffentlicht:

„En Route to a Quantitative Assessment of Carotenoid Antioxidant and Prooxidant Function“

Martin, H.-D.; Paust, J.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Sies, H.; Stahl, W.; Walsh, R.

Proceed. Pigments in Food Technology

(Ed. M.I.M. Mosquera, M.J. Galan, D.H. Mendez), Dept. Legal, Sevilla 1999, S. 163-167

„Anti- and Prooxidant Properties of Carotenoids“

H.-D. Martin; C. Jäger; C. Ruck; M. Schmidt; R. Walsh; J. Paust

J. Prakt. Chem. 1999, 341, S. 302-308

„Chemistry of Carotenoid Oxidation and Free Radical Reactions“

H.-D. Martin; S. Beutner; B. Mayer; C. Ruck; M. Schmidt; S. Sell; R. Walsh;

Pure and Appl. Chem., Vol. 71, No. 12 (1999), S. 2253-2262

"Quantitative Assessment of Antioxidant Properties of Natural Colorants and Related Compounds: Carotenoids, Flavonoids and Indigoids"

S. Beutner, B. Bloedorn, S. Frixel, I. Hernández Blanco, Th. Hoffmann, H. D. Martin, B. Mayer, P. Noack, C. Ruck, M. Schmidt, I. Schülke, S. Sell, H. Bettermann, H. Ernst, S. Haremza, J. Paust, F. Prechtel, G. Seybold, H. Sies, W. Stahl, R. Walsh

Application of Natural Colorants for Foods, Nutraceuticals, Confectionery, Beverages, Cosmetics (INF/COL), The Hereld Organization, Hamden, CT, 2000

"Quantitative Assessment of Antioxidant Properties of Natural Colorants and Related Compounds: Carotenoids, Flavonoids and Indigoids"

S. Beutner, B. Bloedorn, S. Frixel, I. Hernández Blanco, Th. Hoffmann, H. D. Martin, B. Mayer, P. Noack, C. Ruck, M. Schmidt, I. Schülke, S. Sell, H. Bettermann, H. Ernst, S. Haremza, J. Paust, F. Prechtel, G. Seybold, H. Sies, W. Stahl, R. Walsh

Colorchem, 2000, 23.

"Quantitative Assessment of Antioxidant Properties of Natural Colorants and

Phytochemicals: Carotenoids, Flavonoids, Phenols and Indigoids. The Role of b-



Carotene in Antioxidant Functions" Stefan Beutner, Britta Bloedorn, Susanne Frixel, Inés Hernández Blanco, Thomas Hoffmann, Hans-Dieter Martin, Bernhard Mayer, Peter Noack, Christoph Ruck, Marcus Schmidt, Ines Schülke, Stefan Sell, Hansgeorg Ernst, Sylke Haremza, Günther Seybold, Helmut Sies, Wilhelm Stahl and Robin Walsh  
J.Sci.Food Agric. 81,559-568 ( 2001)



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1. Einleitung.....	1
1.1. Strukturen und Vorkommen von Carotinoiden.....	2
1.2. Carotinoide als funktionelle Farbstoffe .....	3
1.2. Antioxidantien.....	7
2. Problemstellungen.....	12
3. Synthetischer Teil.....	13
3.1.1.1. Methylgruppenstellungen und -anzahl.....	13
3.1.1.2. Klasse 1: Aromatische Carotinoide mit variabler Methylgruppenanzahl und Polyenlänge.....	18
3.1.2.1. Klasse 2: Tocopherole mit gekoppelten Wirkungssystemen.....	20
3.1.2.2. Synthese kettenmodifizierter Tocopherole .....	25
3.1.3.1. Klasse 3: Carotinoide mit phenolischen Endgruppen.....	31
3.1.3.2. Fehlgeschlagene Methoden.....	32
3.1.3.3. Erfolgreiche Methode zur Darstellung von BHT-CAR.....	35
3.1.3.4. Weitere Versuche mit phenolischen Endgruppen.....	37
3.1.3.5. 4,4,4',4'-Tetramethyl- $\beta$ -Carotin (TMBC).....	38
3.1.3.6. Spezielle Diketone .....	43
3.2. Quantenmechanische Rechnungen.....	44
3.2.1. Kraftfeldrechnungen und semiempirische Verfahren.....	44
3.2.2. Interaktion von Carotinoiden mit Sauerstoffradikalen.....	46
3.2.3: Durchführung und Ergebnisse der Rechnungen.....	48
3.3. Quantitative Bestimmungsmethoden für Peroxidgehalte .....	53
3.3.1 Messung des Sauerstoffverbrauchs.....	53

3.3.2.	Messung der Peroxidbildung.....	55
3.3.3	Indirekte Methoden.....	56
3.3.4.	Verwendete Meßmethoden und Substrate.....	59
3.4.	Ausarbeitung des Meßverfahrens .....	64
3.4.1.	Substanzen, Lösungsmittel und Konzentrationen.....	64
3.4.2.	Geometrie und Dimensionen des Reaktionsgefäßes.....	65
3.4.3.	Glaseffekte.....	68
3.4.4.	Proben- und Gefäßvorbereitungen.....	74
3.4.5.	Sonstige Reaktionsparameter.....	75
3.4.6	Auswertungsmethoden.....	76
3.5.	Graphen und Interpretationen der Einzelmessungen.....	81
3.5.1.	Referenzmessungen am Methyllinoleat.....	81
3.5.2.	$\beta$ -Carotin.....	83
3.5.3	D-L- $\alpha$ -Tocopherol.....	87
3.5.4.	Astaxanthin.....	89
3.5.5.	Kohlenwasserstoffe.....	95
3.5.5.1	Tetrahydrolycopin ( $\zeta$ -Carotin).....	95
3.5.5.2.	13-E,15(Z,E)-Phytoen.....	98
3.5.5.3	13-Z,15(Z,E)-Phytoen.....	100
3.5.6.	Ketocarotinoide.....	102
3.5.6.1	Rhodoxanthin.....	102
3.5.6.2.	Isonorastaxanthin.....	105
3.5.6.3	Isonorastazin.....	107
3.5.6.4	Capsorubin.....	109
3.5.6.5	C <sub>26</sub> -Diketon.....	111
3.5.6.6	C <sub>22</sub> -Diketo-Diketal.....	115
3.5.6.7.	AE533 .....	119
3.5.6.8	AE531 .....	121
3.5.6.9	AE467.....	122
3.5.6.10	Actinioreythrol.....	124

3.5.7	Carotinoide mit Z-fixierten zentralen Doppelbindungen.....	128
3.5.7.1	HDBH.....	130
3.5.7.2	221DBH.....	132
3.5.7.3	HDPD.....	135
3.5.7.4	221DPD.....	137
3.5.7.5	H-9-En.....	140
3.5.7.6	221-9-En.....	142
3.5.8.	Stickstoffhaltige Carotinoide.....	145
3.6.	Messungen mit Cumol.....	149
3.6.1:	Antioxidative Effekte.....	153
3.6.2.1.	$\beta$ -Carotin $2 \cdot 10^{-4}M$ .....	153
3.6.2.2.	$\beta$ -Carotin $1 \cdot 10^{-3}M$ .....	155
3.6.2.3	$\beta$ -Carotin $2 \cdot 10^{-3}M$ .....	156
3.6.2.4	$\beta$ -Carotin $5 \cdot 10^{-3}M$ .....	159
3.6.3.1.	Astaxanthin $2 \cdot 10^{-4}M$ .....	161
3.6.3.2.	Astaxanthin $5 \cdot 10^{-4}M$ .....	163
3.6.3.3.	Astaxanthin $1 \cdot 10^{-3}M$ .....	165
3.6.3.4.	Astaxanthin $2 \cdot 10^{-3}M$ .....	167
3.6.4.1.	$\alpha$ -Tocopherol $2 \cdot 10^{-4}M$ .....	170
3.6.4.2.	$\alpha$ -Tocopherol $1 \cdot 10^{-3}M$ .....	171
3.6.4.3.	$\alpha$ -Tocopherol $2 \cdot 10^{-3}M$ .....	173
3.6.5.	BHT-CAR.....	176
3.6.5.1.	BHT-CAR $2 \cdot 10^{-4}M$ .....	176
3.6.5.2.	BHT-CAR $1 \cdot 10^{-3}M$ .....	178
3.6.5.3.	BHT-CAR $2 \cdot 10^{-3}M$ .....	180
3.6.6.1.	BHT $2 \cdot 10^{-4}M$ .....	183
3.6.6.2	BHT $1 \cdot 10^{-3}M$ .....	184
3.6.6.3.	BHT $2 \cdot 10^{-3}M$ .....	186
3.6.7.1.	Lycopin $2 \cdot 10^{-4}M$ .....	188
3.6.7.2.	Lycopin $1 \cdot 10^{-3}M$ .....	189
3.6.7.3.	Lycopin $2 \cdot 10^{-3}M$ .....	190

3.6.8.	Spezielle Diketone ( <b>96</b> und <b>97</b> ) $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ .....	192
3.6.9.	Aromatische Polyene .....	194
3.6.10	Flavonoide .....	200
3.7.	Globale Diskussion der Messergebnisse .....	205
3.7.1.	Allgemeines .....	205
3.7.2.	Methylinoleat.....	208
3.7.3.	Cumol.....	211
3.7.4.	Prooxidativität.....	214
3.7.4.1.	Kritische Diskussion von Burton und Ingold .....	214
3.7.4.2.	„Krypto-Prooxidiative“ Substanzen.....	217
3.7.5	Konfigurationseffekte .....	221
3.7.5.	Aktivität und Lebensdauer.....	223
3.7.6.	Druckeffekte .....	227
3.7.7.	Phenolische Antioxidantien.....	227
3.7.8.	Kettenlänge, Methylgruppenstellung- und Anzahl.....	230
3.7.9.	Weitere polyenische Antioxidantien.....	235
4.	Zusammenfassung .....	241
5.	Experimenteller Teil .....	247
5.1	Allgemeines .....	247
5.2	Versuchsbeschreibungen.....	250
5.2.1.	Versuch 1 : 4-Methylbenzylbromid.....	250
5.2.2.	Versuch 2 : 3,5-Dimethylbenzylbromid .....	250
5.2.3.	Versuch 3 : 4-Methylbenzyltriphenylphosphoniumbromid.....	251
5.2.4.	Versuch 4 : (3,5-Dimethylbenzyl)-triphenylphosphoniumbromid .....	251
5.2.5.	Versuch 5: 2-Methoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-ol.....	252
5.2.6.	Versuch 6: 6-Acetoxy-2-methoxy-2,5,7,8-teramethyl-chromen.....	252
5.2.7.	Versuch 7: 6-Acetoxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-ol .....	253

5.2.8.	Versuch 8: (6-Acetoxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman2-yl)-Essigsäure-ethylester.....	254
5.2.9.	Versuch 9: (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman-2-yl)-Ethanol.....	254
5.2.10	Versuch 10: 2-(2-Bromomethyl)-3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-6-ol.....	255
5.2.11.	Versuch 11: (6-Acetoxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman2-yl)-Nitromethan..	256
5.2.12.	Versuch 12:(6-Acetoxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman2-yl)-Aminomethan	257
5.2.13.	Versuch 13: Essigsäure-3-[4-(dimethoxy-phosphoryl)-3-hydroxy-3-methyl-butyl]-4-hydroxy-2,5,6-trimethyl-phenylester.....	258
5.2.14.	Versuch 14: 4-(6-acetoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)-2-methyl-but-2-ensäureethylester.....	259
5.2.15.	Versuch 15: 2-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-ol.....	260
5.2.16.	Versuch 16: Benzoesäuresäure-2-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl-ester.....	261
5.2.17.	Versuch 17: [4-(6-acetoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)-2-methyl-but-2-enyl]triphenylphosphoniumbromid.....	262
5.2.18.	Versuch 18: (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-benzyl)-Phosphonsäurediethylester.....	263
5.2.19.	Versuch 19: Benzoesäure-(2,6-di-tert.-butyl-4-methyl-phenyl)-ester.....	264
5.2.20.	Versuch 20: (4-Benzoyloxy-3,5-di-tert.-butyl-benzyl)-Triphenylphosphoniumbromid.....	265
5.2.21.	Versuch 21:1,18-Bis-(4'-Benzyloxy-3',5'-di-tert.-Butyl)-3,7,12,16-tetramethyl-nona-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanen.....	266
5.2.22.	Versuch 22: 1,18-Bis-(4'-Hydroxy-3',5'-di-tert.-Butyl)-3,7,12,16-tetramethyl-nona-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanen.....	268
5.2.23.	Versuch 23: 1,10-Bis-(4'-Benzyloxy-3',5'-di-tert.-Butyl)-3,8-dimethyl-penta-1,3,5,7,9-decanen.....	269
5.2.24.	Versuch 24: 1,4-Dibenzoyloxy-2,3-Dimethyl-benzol.....	271
5.2.25	Versuch 25: (3,6-Bis-Benzoyloxy-2-methyl-benzyl)-Triphenylphosphoniumbromid.....	272
5.2.26.	Versuch 26: 1-Chlor-3-Methyl-Buten-2.....	273

5.2.27.	Versuch 27: 2,3,3 Trimethyl-butan-2-ol.....	273
5.2.28.	Versuch 28: 2,3,3-Trimethyl-buten-1.....	274
5.2.29.	Versuch 29: 6-Chlor-2,6,7,7-tetramethyl-2-octen.....	274
5.2.30.	Versuch 30: 2,2,7-trimethyl-oct-6-en-3-one.....	275
5.2.31.	Versuch 31: $\alpha,\alpha,\alpha'\alpha'$ -Tetramethyladipinsäure.....	275
5.2.32.	Versuch 32: $\alpha,\alpha,\alpha'\alpha'$ -Tetramethyladipinsäurediethylester .....	276
5.2.33.	Versuch 33: 1,8-Bis-methansulfinyl-3,3,6,6-tetramethyl-octan-2,7-dion.....	276
5.2.34.	Versuch 34: 3,3,6,6-tetramethyl-octan-2,7-dion.....	277
5.2.35.	Versuch 35: $\alpha,\alpha,\alpha'\alpha'$ -Tetramethyladipinsäuredinitril.....	279
5.2.36.	Versuch 36: 1,2,3,3,6,6-Hexamethylcyclohex-1-en.....	279
5.2.37.	Versuch 37: (2,3,3,6,6-Pentamethyl-cyclohex-1-enylmethyl)- triphenyl-phosphoniumbromid .....	280
5.2.38.	Versuch 38: 5, 9, 14, 18-Tetramethyl-docosa-3 ,5 ,7 ,9 ,11 ,13 , 15, 17 ,19- nonaen-2, 21-dion.....	281
5.2.39.	Versuch 39: 2, 2, 6, 10, 15, 19, 23, 23-Octamethyl-tetracosa-4 , 6, 8 , 10, 12, 14, 16, 18, 20-nonaen-3, 22-dion.....	282
6.	Literatur .....	283

## 1. Einleitung

Die Naturwissenschaft entspringt den alten Naturreligionen. Solange es Menschen gibt, wurde versucht, die Phänomene der uns umgebenden Welt zu erklären und zu ordnen. Zuerst geschah dies durch Anbetung und Verehrung der Gestirne. Anschließend folgte die Entdeckung und Nutzung des Feuers. Die Schamanen dieser alten Religionen waren die ersten Naturwissenschaftler. Sie waren die Hüter des Wissens der Menschheit. Sie begannen zu katalogisieren und Zusammenhänge aufzustellen.

Die Geschichte der organischen Chemie beginnt mit der Suche nach neuen Lebensmitteln. Jede Pflanze wurde auf ihre Eßbarkeit getestet. Positive und negative Effekte auf den menschlichen Metabolismus wurden dann überliefert. In fast allen alten Kulturen gab es Kräuterfrauen, welche Krankheiten durch Pflanz Zubereitungen heilen oder lindern konnten. Hier findet man die Verknüpfung zwischen Chemie und Medizin.

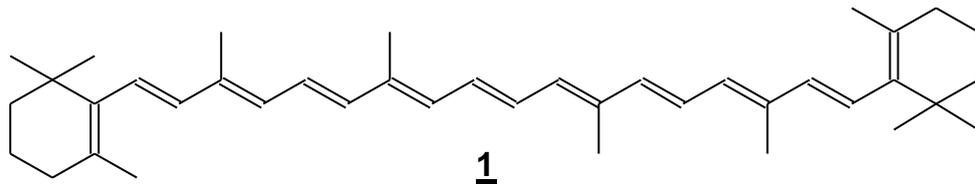
Im Mittelalter wurden dann die naturwissenschaftlich Eingeweihten verfolgt. Es widersprach den kirchlichen Dogmen, daß es Menschen gab, die versuchten den Cyclus von Geburt, Leben und Tod zu durchbrechen oder zu verlängern. Viele Alchimisten suchten damals auch schon nach einer Möglichkeit Gold in großen Mengen herzustellen. Dies zeigt, daß die Geschichte der Chemie auch immer mit Rückschlägen verbunden ist. Prinzipiell aber beruht sie auf zwei großen Säulen: Der Suche nach dem Schlüssel zum ewigen Leben und der kommerziellen Ausbeutung der Natur.

Zwar sind diese Grundziele im Laufe der Jahre in Vergessenheit geraten, aber immer wieder, wenn in den Medien über neue Durchbrüche in den Naturwissenschaften berichtet wird, kann man sie unter der Oberfläche erkennen.

Im Bereich der Krankheitsprävention wurde in den letzten Jahren verstärkt die Wirkung einer Stoffklasse wahrgenommen, die anscheinend mehr Eigenschaften besitzt, als man früher vermutete. Es handelt sich um die Carotinoide. Sie werden in vielen Lehrbüchern meist im Kapitel Farbstoffe abgehandelt. Doch zeigen die Forschungen der letzten 20 Jahre, daß die Farbigkeit nur ein Mittel zum Zweck ist. Die Ästhetik und Signalwirkung von Farben wird in den Hintergrund gestellt. Entscheidend ist die Funktion im Bauplan der Natur.

## 1.1. Strukturen und Vorkommen von Carotinoiden

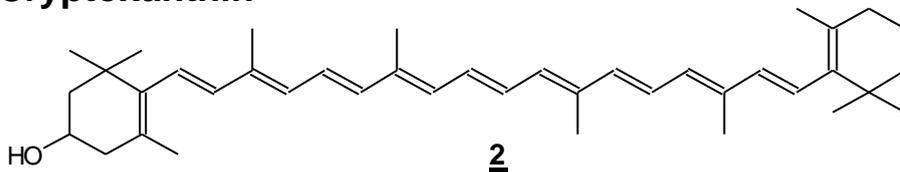
Die Stoffklasse der Carotinoide umfaßt bis heute mehr als 800 identifizierte Moleküle, welche in der Natur ausschließlich von Pflanzen und niederen Organismen produziert werden. Der bekannteste Vertreter ist das  $\beta$ -Carotin 1, welches bereits im 19. Jahrhundert von Wackenroder aus Karotten isoliert wurde.



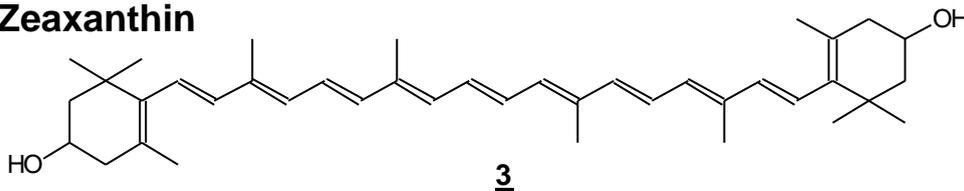
**Abbildung 1:** Struktur von  $\beta$ -Carotin 1

Carotinoide werden durch ihr langes, konjugiertes durch Methylgruppen stabilisiertes  $\pi$ -System charakterisiert. Dies ist eine Konsequenz aus der Biosynthese, welche über die Verknüpfung von Isopreneinheiten (s. Kapitel 3.1.1.1.) abläuft. Oxidationen führen zu den sogenannten Xanthophyllen. Bekannteste Vertreter sind das Cryptoxanthin 2, Zeaxanthin 3 und Astaxanthin 4:

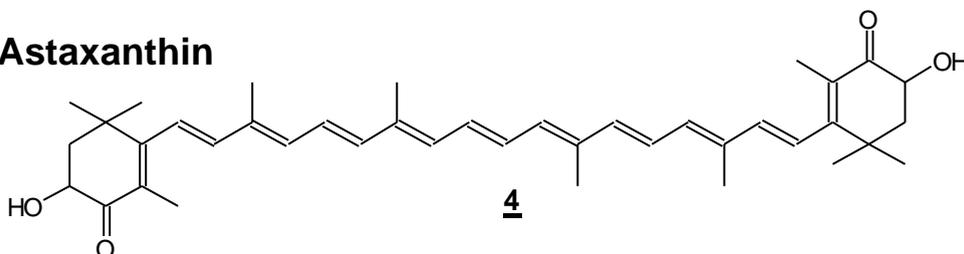
### **Cryptoxanthin**



### **Zeaxanthin**



### **Astaxanthin**



**Abbildung 2:** Strukturen wichtiger Xanthophylle

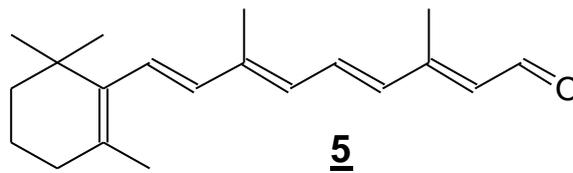
Der Einbau von Sauerstoff in die Moleküle erhöht deren Löslichkeit in polaren Umgebungen und ändert das Einbauverhalten in Biomembranen. Während unpolare Carotinoide, wie z.B.  $\beta$ -Carotin sich im inneren Teil einer Membran aufhalten, sind die Xanthophylle senkrecht in den Membranen, gemäß ihrer Polarität, mit den polaren Teilen der Lipide verankert. [1, 2, 3]

## **1.2. Carotinoide als funktionelle Farbstoffe**

Schon seit vielen Jahren ist es klar, daß die kräftigen Farben der Carotinoide nicht aus ästhetischen Gründen in den Bauplan der Natur eingefügt wurden. Die Funktionalitäten dieser Stoffklasse sind mannigfaltig. Im Folgenden soll ein kleiner Umriß dieser Fähigkeiten gegeben werden:

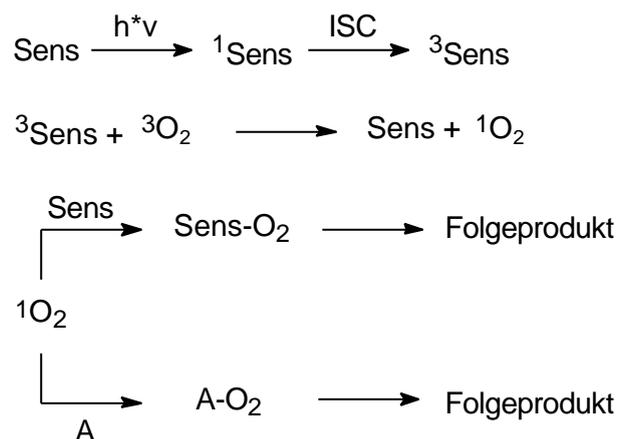
**a) "Lichtsammelnde" Eigenschaften:** Carotinoide haben im Pflanzenreich eine Funktion als "Lichtsammler", da ihre stärksten Absorptionsbanden gewöhnlich im Bereich von 450-570 nm liegen [4]. Dieser Teil des sichtbaren Spektrums kann von Chlorophyllen nicht effektiv genutzt werden, da deren Hauptabsorptionsbanden bei ca. 430 nm (Sorret-Bande) und bei ca. 630-660 nm (Q-Banden) liegen [5]. Würde die Pflanze im Photosyntheseprozess nur auf diesen durch das reine Chlorophyll absorbierten Bereich zugreifen können, wäre die Ausnutzung des gesamten Sonnenlichtes nur sehr schwach. Deshalb bilden sich Carotinoid-Chlorophyll-Komplexe, bei denen das Absorptionsvermögen sich additiv aus den Absorptionsbanden von Chlorophyll und Carotinoid zusammensetzt und somit einen sehr großen Teil des sichtbaren Spektralbereichs abdeckt. Die Energie, welche dabei von den Carotinoiden aufgenommen wird, wird anschließend durch Energietransfer an das Chlorophyll abgegeben [4]. Diese "Lichtsammlerfähigkeit" wird auch als die biologische Antennenfunktion der Carotinoide bezeichnet.

**b) Vitaminaktivität im Sehprozess:** Bei der Metabolisierung der Carotinoide treten gewöhnlich oxidative Spaltungsprodukte auf, deren Biorelevanz enorm ist. Der bekannteste Vertreter dieser Metaboliten ist das Retinal 5, welches durch die zentrale Spaltung eines Moleküls  $\beta$ -Carotin 1 entsteht und der entscheidende Träger des Sehprozesses im menschlichen Auge ist.



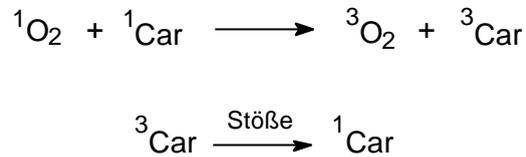
**Abbildung 3:** Struktur von Retinal **5**

**c) antioxidative Eigenschaften:** Ein weiterer wichtiger Grund für die hohe Carotinoidproduktion in der Flora liegt in deren Funktionalität als Schutzsubstanzen gegen die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff und andere Reaktivteilchen und damit im Erhalt des pflanzlichen Lebens [6]. Die Bildung des Singulett-Sauerstoffs ist ein unerwünschter Nebeneffekt bei der Photosynthese: Der Aufbau von Kohlenwasserstoffen in der Pflanze geschieht gewöhnlich durch die Absorption von Sonnenlicht durch das Chlorophyll. Da dieses aber sehr leicht aus dem durch direkte Anregung entstehenden Singulettzustand über *Intersystem Crossing* in den Triplettzustand übergehen kann, wirkt es auch als hervorragender Triplett-Sensibilisator (Sens) für Sauerstoff (Schema 1). Der Singulett-Sauerstoff kann nun das Chlorophyll durch Addition angreifen und zerstören. Somit wird der lebenserhaltende Prozeß der Photosynthese in der Pflanze abgebrochen. Zusätzlich können auch andere Teile der Pflanze (A) durch die Oxidation zerstört werden [6] :



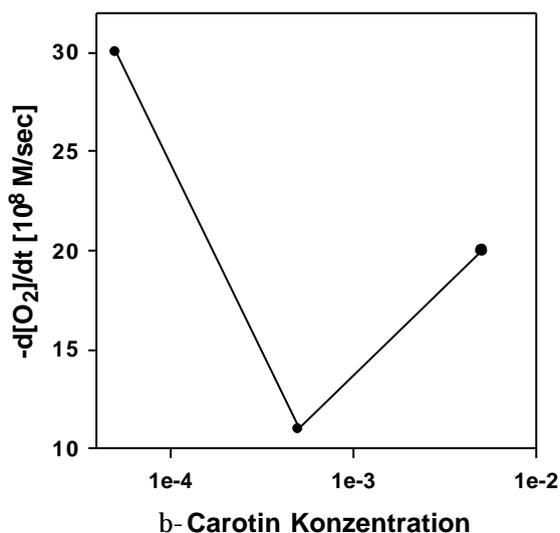
**Schema 1:** Bildung von Singulett-Sauerstoff durch einen Sensibilisator und anschließende Reaktionen (ISC = *Intersystem Crossing*)

Die in den Pflanzen vorkommenden Carotinoide können den Singulett-Sauerstoff desaktivieren. Das entstehende angeregte Carotinoid kann die dabei aufgenommene zusätzliche Schwingungsenergie durch intermolekulare Stöße wieder abgeben:



**Schema 2:** Desaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch Carotinoide

Zu dieser protektiven Wirkung gegen Photooxidationen kommt noch die Schutzwirkung gegen Triplett-Sauerstoff hinzu. Die Basis dazu befindet sich in der Arbeit von Burton und Ingold [7], welche 1984 die Interaktion von  $\beta$ -Carotin mit Triplett-Sauerstoff untersuchten. Dort wurde gezeigt, daß  $\beta$ -Carotin auch langsam ablaufende Dunkelreaktionen des Sauerstoffs wirksam inhibieren kann. Gleichzeitig zeichnete sich aber ab, daß die Wirksamkeit des  $\beta$ -Carotins von seiner Konzentration im Meßsystem und dem Partialdruck des Sauerstoffs abhängig ist. Bei hohen Konzentrationen und Drücken zeichnete sich eine gewisse prooxidative, bzw. abgeschwächte antioxidative Wirkung ab (s. Kapitel 3.7.4.):



**Abbildung 4:** Ergebnisse der Messungen von Burton und Ingold (nach [7]) bei 150 torr Sauerstoffpartialdruck

Ähnliche Ergebnisse brachten die ATBC ( $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin)-Studie 1994 [8] und die CARET (Carotene and Retinol Efficiency Trial)-Studie [9]. Dort wurden

starken Rauchern über längere Zeiträume hohe  $\beta$ -Carotin-,  $\alpha$ -Tocopherol- und Retinol-Dosen verabreicht. Die Kombination von Retinol und  $\beta$ -Carotin steigerte das Lungentumorrisiko der Testpersonen um 28%, so daß die Studien abgebrochen werden mußten.  $\beta$ -Carotin kann also auch schädliche Wirkungen auslösen. Deswegen wird versucht, neuartige, natürliche oder synthetische Carotinoide zu finden, deren Wirkung die positiven Effekte behält und die negativen Effekte eliminiert.

In den letzten Jahren sind bezüglich dieser Eigenschaften die Xanthophylle in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. 1989 zeigte Terao [10], daß Astaxanthin ein wesentlich besseres Antioxidans ist als  $\beta$ -Carotin. Ruck [11] zeigte, daß der von Burton und Ingold bei  $\beta$ -Carotin gemessene Anstieg des Sauerstoffverbrauchs bei hohem Sauerstoffpartialdruck in Gegenwart von Astaxanthin nicht mehr auftritt.

Mechanistisch gibt es in der Literatur viele Modelle, welche diese Effekte erklären sollen [z.B. 12, 13, 14]. Selbst der erste Schritt dieser Reaktionskaskade, die Addition von Sauerstoff an das Polyensystem ist nicht vollständig aufgeklärt, obwohl es mittlerweile DFT-Rechnungen von Robb [15] gibt, welche diese Addition etwas verständlicher machen. Eine einheitliche Theorie ist bis zum heutigen Tag nicht vorhanden. Dies liegt daran, daß mit sehr vielen unterschiedlichen Meßmethoden in vitro und in vivo gearbeitet wird.

Diese antioxidativen Wirksamkeiten zeigen die enorme Wichtigkeit der Carotinoide in der Prävention von Krankheiten. Heute ist man der Überzeugung, daß insbesondere freie Nitrosyl- Peroxyl- und Hydroxylradikale Schäden an DNA-Strängen hervorrufen und so maßgeblich an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligte Moleküle sind. Auch Arteriosklerose und AMD (**a**ltersbedingte **M**acular**d**egeneration) laufen über Radikalprozesse ab. [16]

Kardiovaskuläre Krankheiten, welche in den Industrienationen erhöht auftreten, werden durch die Peroxidation von Lipiden ausgelöst. In Ländern, wo viel Gemüse und Rotwein die Ernährung bestimmen, treten diese Krankheiten wesentlich weniger auf (das sogenannte „french paradoxon“). Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, daß die oben genannte Ernährung stark dazu beiträgt. Die in dem Gemüse vorhandenen Carotinoide und Flavonoide aus dem Rotwein sind wirksame Antioxidantien und beweisen eindrucksvoll ihre Wirksam- und Notwendigkeit.

## 1.2. Antioxidantien

**a) Definition:** "Antioxidantien sind Substanzen die, in geringen Mengen zugegeben, einen zeitweiligen Stillstand oder wenigstens eine erheblich Verzögerung der oxidativen Vorgänge bei dem zu schützenden Produkt bewirken. Insbesondere dann wird von einem Antioxidans gesprochen, wenn die Schutzwirkung nach einem besonderen Mechanismus verläuft und besser als die eines einfachen Reduktionsmittels ist." [17]

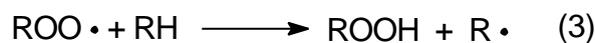
**b) Mechanismus der radikalischen Peroxidation [18]:** Bevor auf die einzelnen Klassen von Antioxidantien näher eingegangen wird, soll zuerst noch einmal der Mechanismus einer Peroxidation *en detail* dargestellt werden. Diese Reaktionen sind Kettenreaktionen. Sie bestehen aus vier großen Teilschritten:

**1) Kettenstart:** Ein Initiator abstrahiert ein Wasserstoffradikal von dem zu schützenden Substrat.



**Schema 3:** Kettenstart von Radikalreaktionen

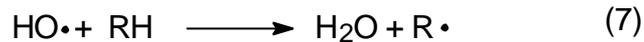
**2) Kettenpropagation:** Das entstandene Kohlenstoffradikal reagiert zunächst mit Sauerstoff und bildet ein hochreaktives Peroxidradikal, welches erneut ein Substratmolekül angreifen kann.



**Schema 4:** Kettenpropagation

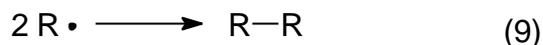
**3) Kettenverzweigungen:** Diese Reaktionen können vorkommen und bewirken autokatalytische Erhöhungen der Reaktionsgeschwindigkeit.





**Schema 5:** Kettenverzweigung

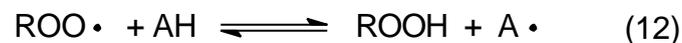
**4) Kettenabbruchreaktionen:** Die gebildeten Radikale reagieren untereinander zu nichtradikalischen Produkten.



**Schema 6:** Kettenabbruch

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist der Reaktionsschritt (3). Je stabiler das gebildete Radikal  $\text{R}\cdot$  ist, um so mehr Peroxid  $\text{ROO}\cdot$  wird gebildet, da die Bildung des Radikals begünstigt wird. Aber auch Lösungsmittel oder Metallspuren im Reaktionsgefäß können die Peroxidation beschleunigen oder inhibieren.

**c) Antioxidative Radikalfänger :** Antioxidantien wirken gewöhnlich dadurch, daß sie alternative Reaktionspfade öffnen in denen das zu schützende Substrat nicht mehr involviert ist:



**Schema 7:** Wirkungsmechanismus von Antioxidantien

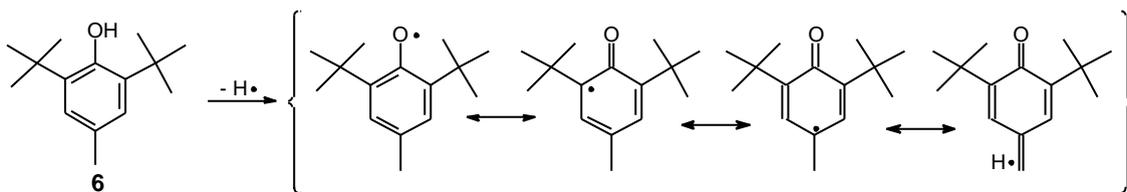
Handelt es sich beim Antioxidans um ein phenolisches, so kann es nach Mahoney [19] in eine der folgenden Kategorien eingeordnet werden:

Bei den sterisch nicht gehinderten Antioxidantien konkurrieren die Reaktionen (13) und (16) mit den Abbruchreaktionen (14) und (15). Die Radikale  $\text{ROO}\bullet$  und  $\text{A}\bullet$  sind die Kettenträger. Kritisch anzumerken ist, daß bei dieser Art von Antioxidantien auch wieder  $\text{R}\bullet$ -Radikale gebildet werden, welche einer Zerstörung des Substrates entsprechen.

Bei sterisch gehinderten Antioxidantien sind die Schritte (14) und (15) so schnell, daß (13) und (16) praktisch keinen Einfluß auf die Kinetik mehr ausüben. Die Desaktivierung von  $\text{ROO}\bullet$  wird zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

**d) Phenolische Antioxidantien:** Das bekannteste synthetische Antioxidans ist das BHT **6** (Butyliertes Hydroxytoluol), es findet seinen Einsatz in der Technik, Parfümindustrie und als Zusatz in der Tiernahrung und Kaugummi.

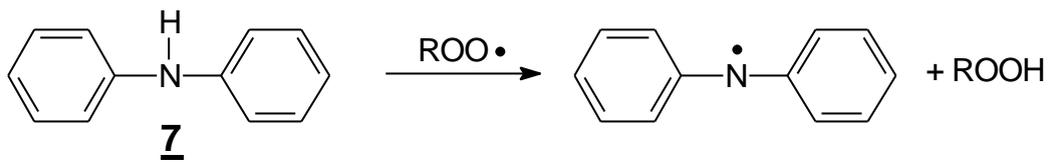
Nach der Abstraktion des phenolischen Wasserstoffatoms kann sich das freie Elektron durch Mesomeriestabilisierung im aromatischen Ring verteilen. Durch die sterische Hinderung der zwei tert.-Butylgruppen wird die Abstraktionstendenz des entstandenen Radikals stark unterdrückt:



**Schema 8:** Entstehung und Stabilisierung des BTH-Radikals aus BHT **6**

Ähnliche Wirkungsmechanismen werden auch für  $\alpha$ -Tocopherol **30** formuliert (S. 20).

**e) Weitere Antioxidansklassen:** In der Technik werden auch stickstoffhaltige Antioxidantien verwendet, wie z.B. N,N-Diphenylamin **7**. Auch hier ist die mechanistische Wirkung ähnlich wie bei den Phenolen, aber nicht so stark ausgeprägt:



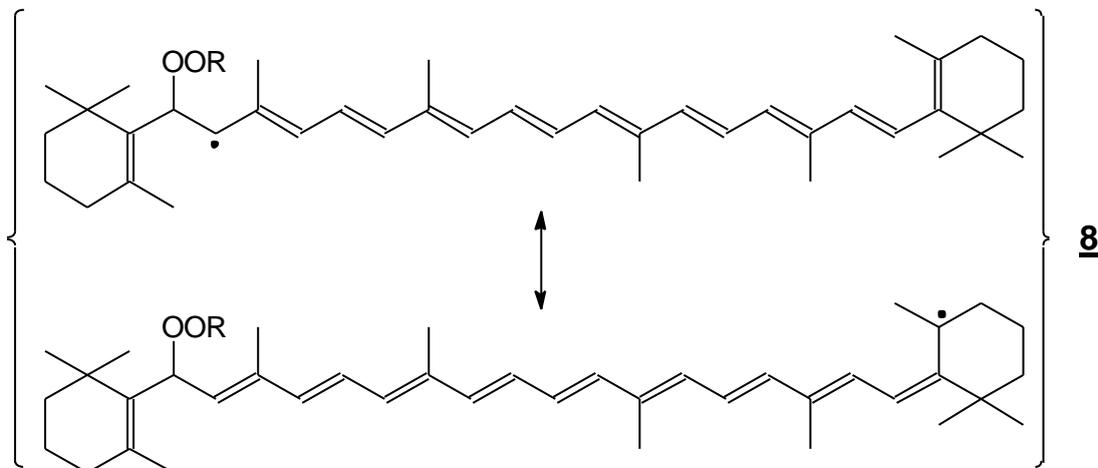
**Schema 9:** Wirkung von N,N-Diphenylamin **7**

Zu den Antioxidantien werden weiterhin Peroxidzersetzer, UV-Absorber, Metallionendesaktivatoren und Antiozonantien gezählt.

**f) Carotinoide:**  $\beta$ -Carotin wurde von Burton und Ingold als ungewöhnliches Antioxidans bezeichnet. Dies liegt daran, daß diese Molekül nicht die üblichen, bei Antioxidantien verwendeten, Strukturelemente besitzt. Die antioxidativen Eigenschaften müssen auf dem langen, konjugierten Polyensystem beruhen, welches verschiedene Reaktionspfade öffnen kann:

**1) Wirkung als Reduktionsmittel:** Radikalkationen oder elektrophile Radikale mit ausreichendem Redoxpotential können ein Elektron aus der Polyenkette entfernen und so desaktiviert werden. Der Radikalkationencharakter wird auf das Carotinoid übertragen.

**2) Addition an das Polyensystem:** Nach Burton und Ingold [7] kann sich ein reaktives Radikal ROO• an das Polyensystem von  $\beta$ -Carotin addieren. Es entsteht •CAR-OOR **8**:



**Schema 10:** Mesomere Grenzformeln von •CAR-OOR **8**

**3) Abstraktion:** Die Methylgruppen und die Wasserstoffatome in den Positionen 4 und 4' im Ring des  $\beta$ -Carotins sind allylisch. Damit wird die Wahrscheinlichkeit einer Abstraktion von Wasserstoff erhöht. Die Wasserstoffatome in den Positionen 4 und 4' sind dabei bevorzugt, da sie an sekundäre Kohlenstoffatome gebunden sind.

Alle oben genannten Wirkungsweisen führen zu Radikalen, welche über das konjugierte  $\pi$ -System das freie Elektron stark delokalisieren können. Dies bedeutet nicht zwangsläufig eine Stabilisierung, sondern kann auch Folgereaktionen ermöglichen.[20]

Nach Krinsky [14] beruht der ungewöhnliche antioxidative Effekt der Carotinoiden darauf, daß sich direkt an die Bildung von  $\bullet\text{CAR-OOR}$  ein weiteres Molekül  $\text{ROO}\bullet$  addiert, so daß das relativ stabile Produkt  $\text{ROO-CAR-OOR}$  entsteht und die Kettenreaktion zum Erliegen kommt.

## **2. Problemstellungen**

Diese Arbeit versucht, mehrere Fragestellungen bezüglich der antioxidativen Effekte der Carotinoide zu klären:

- a) Mittlerweile hat sich allgemein die These etabliert, daß Xanthophylle einen wesentlich besseren antioxidativen Effekt haben als  $\beta$ -Carotin oder Lycopin [z.B. 10 und 21]. Mit Hilfe der Untersuchung einer großen Anzahl von Carotinoiden und quantenmechanischer Rechnungen wird diese Eigenschaft quantifiziert und näher untersucht.
- b) Nach Burton und Ingold wird beim  $\beta$ -Carotin unter speziellen Bedingungen ein prooxidativer Effekt beobachtet. Es werden Experimente zur kritischen Überprüfung dieses Effektes durchgeführt und diskutiert.
- c) Es gibt bis dato noch keine genauen Untersuchungen über den direkten Reaktivitätsunterschied zwischen polyenischen und phenolischen Antioxidantien. Dazu werden konzentrationsabhängige Untersuchungen angestellt.
- d) Die bisher in der Literatur untersuchten Substanzen sind nur ein kleiner Teil der natürlich vorkommenden und synthetisch hergestellten Carotinoide. Aufgrund der in unserem Arbeitskreis vorrätigen großen Menge verschiedenster, auch selten vorkommender Carotinoide wurden die Möglichkeit zu einer umfassenderen Untersuchung dieser Substanzklasse genutzt. Ziel ist eine wesentlich erweiterte Datenbank zum antioxidativen Verhalten dieser Verbindungen.
- e) Nach dem aktuellen Stand der Literatur war vor dieser Arbeit Astaxanthin als bestes carotinoides Antioxidans anerkannt. Wie stark ist der antioxidative Effekt der Carotinoide durch Modifikation der Moleküle noch ausbaubar?
- f) Weiterhin werden im Rahmen dieser Dissertation neuartige Antioxidantien mit gekoppelten Wirkungsmechanismen vorgestellt. Dies Substanzen wirken zweistufig und ermöglichen neuartige Möglichkeiten in der Antioxidansforschung. Als neuartige Endgruppen wurden Chromane und Phenole untersucht.

### 3. Synthetischer Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, neben den schwerpunktmäßigen mechanistischen Studien, neuartige Verbindungen verschiedener Substanzklassen zu synthetisieren. Die Klassifizierung wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

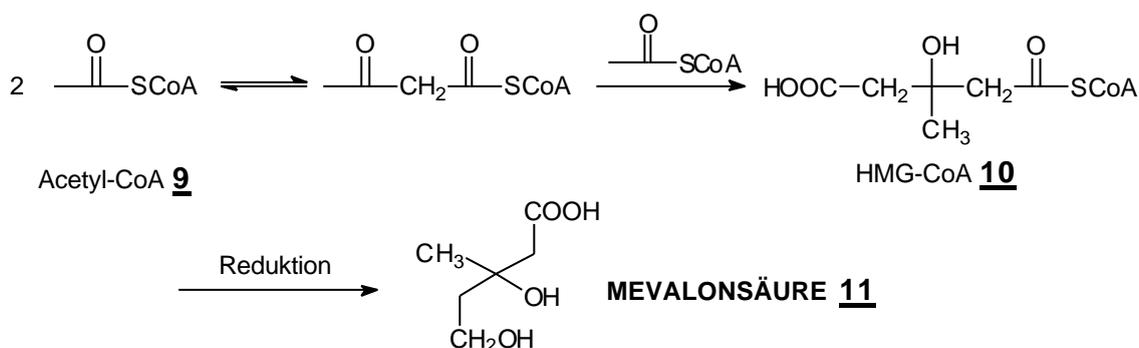
**Klasse 1** umfaßt carotinoide Systeme mit aromatischen Endgruppen und Variationen in der Polykettenlänge und Methylgruppenstellung.

**Klasse 2** besteht aus modifizierten Tocopherolen mit Polyketten anstatt des gesättigten Phytylrestes. Von diesen Verbindungen verspricht man sich eine gute antioxidative Wirkung durch die Kupplung von zwei Antioxidansklassen (Abstraktions- und Additionsantioxidantien).

**Klasse 3** beinhaltet synthetische Carotinoide deren antioxidativer Effekt den der natürlich vorkommenden übertreffen sollte. Modifikationen beschränken sich bei diesen Verbindungen nur auf die Endgruppen. Diese sind entweder so angelegt, daß Wasserstoffabstraktionen verhindert werden oder die Oxidation im ersten Schritt keine kettenpropagierenden Intermediate erzeugen kann.

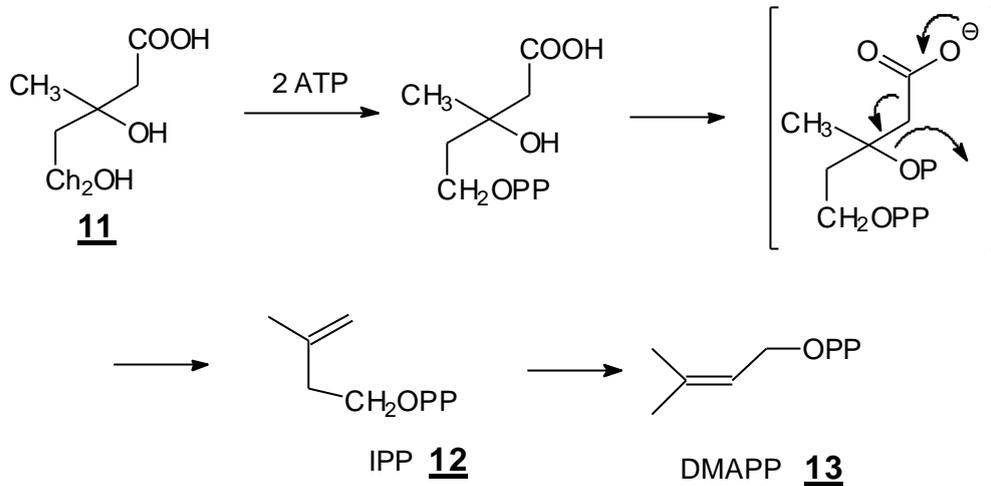
#### 3.1.1.1. Methylgruppenstellungen und -anzahl

Carotinoide sind typische Vertreter der Terpene und werden biosynthetisch aus C<sub>5</sub>-Einheiten, sogenannten Isoprenäquivalenten, aufgebaut. Der Schlüsselbaustein in dieser Synthesekaskade ist die Mevalonsäure **11**, welche über die Zwischenstufe der Hydroxymethylglutarsäure-CoA (HMG-CoA) **10** aus Acetyl-Coenzym-A **9** gebildet wird [22]:



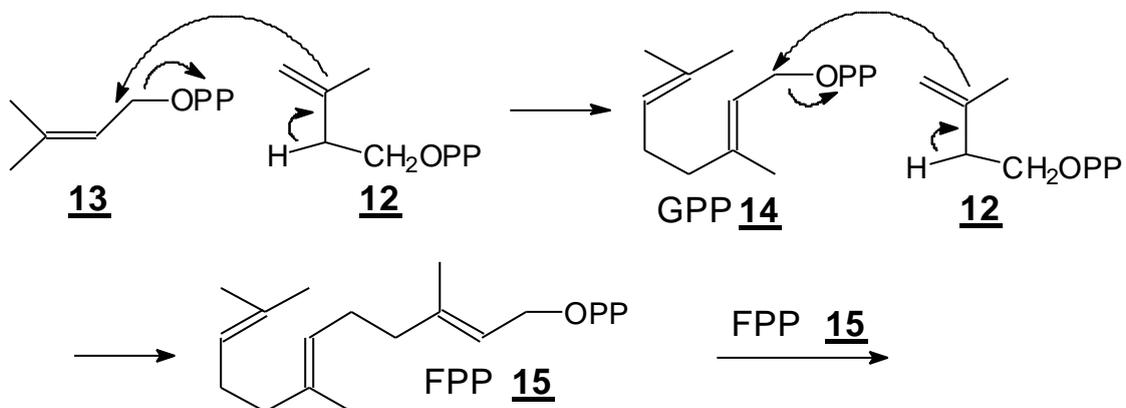
**Schema 11:** Biosynthese von Mevalonsäure **11**

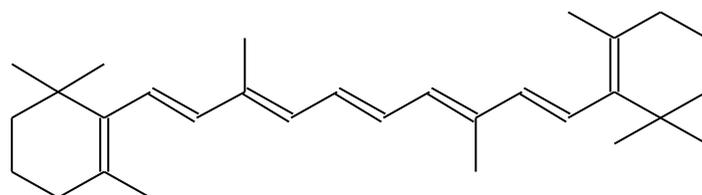
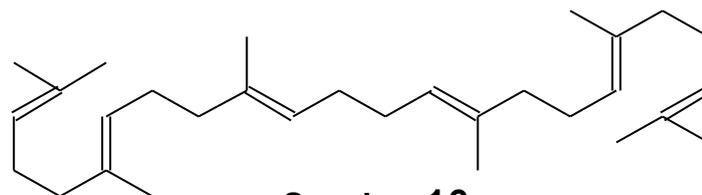
Veresterungen mit Pyrophosphat, Decarboxylierungen und Umlagerungen führen zu den eigentlichen Kupplungsbausteinen: Isopentylpyrophosphat (IPP) **12** und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) **13**.



**Schema 12:** Biosynthese von IPP **12** und DMAPP **13**

DMAPP **13** ist ein hochreaktiver Allylalkohol, welcher formal als kationischer Baustein verwendet werden kann. Dieser reagiert dann mit einem Äquivalent IPP **12**, so daß es zur Ausbildung des ersten C<sub>10</sub>-Körpers, dem Geranylpyrophosphat (GPP) **14** kommt. Würde man den Mechanismus ionisch formulieren, ist die Verknüpfungsstelle durch die Struktur der imaginär auftretenden kationischen Intermediate exakt vorherbestimmt. Eine weitere C<sub>5</sub>-Verlängerung und Dimerisierung des entstehenden Farnesylpyrophosphates (FPP) **15** führt zum Squalen **16**, welches die Schlüsselverbindung für die Biosynthese von Steroiden und Carotinoiden ist. Um dies zu verdeutlichen befindet sich im folgenden Schema zusätzlich eine Darstellung eines kettenverkürzten C<sub>30</sub>-β-Carotins **17**:

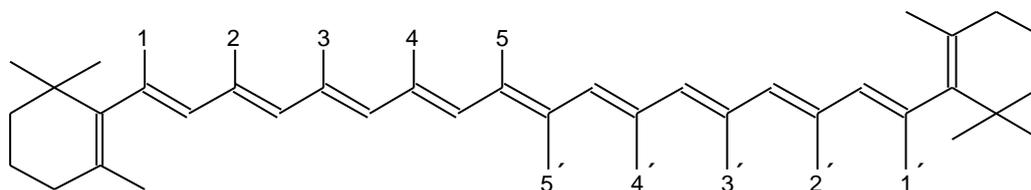




**Schema 13:** Biosynthese von Squalen und Strukturähnlichkeit zu C<sub>30</sub>-β-Carotin 17

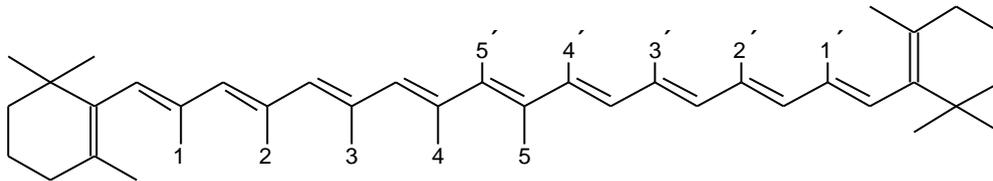
Wie man den obigen Schemata entnehmen kann, sind Stellung und Anzahl der Methylgruppen in den natürlichen vorkommenden Carotinoiden durch die Intermediate der Biosynthese zwingend festgelegt. Bezüglich der Verwendbarkeit als potentielle Antioxidantien ist dieses Design der Natur praktisch perfekt. Dies ist durch folgende theoretische Überlegungen nachvollziehbar, bei denen zunächst die Methylgruppen in der Polyenkette des β-Carotins in drei Kategorien unterteilt werden:

1. Diese Gruppe umfaßt alle Kettenmethylgruppen, welche nach Wasserstoffabstraktion ein Allylsystem ausbilden können, welches mindestens über 6 Doppelbindungen verläuft:



**Abbildung 5:** Stellung von Kettenmethylgruppen in β-Carotin mit potentieller Allylstabilisierung über mindestens 6 Doppelbindungen (jede Zahl stellt eine mögliche Methylgruppe dar)

2. Diese Gruppe umfaßt alle Methylgruppen, welche nach Wasserstoffabstraktion ein Allylsystem ausbilden können, das maximal über 6 Doppelbindungen verläuft:



**Abbildung 6:** Stellung von Methylgruppen in  $\beta$ -Carotin mit potentieller Allylstabilisierung über weniger als 5 Doppelbindungen (jede Zahl stellt eine mögliche Methylgruppe dar)

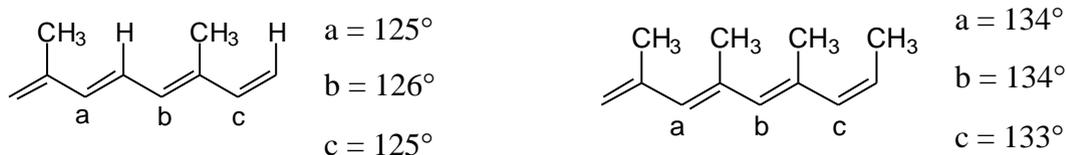
3. Methylgruppen aus Gruppe 1. oder 2. mit starker sterischer Hinderung bezüglich der Endgruppe. In diese Kategorie fallen die Methylgruppen 1 und 1' aus den Abbildungen 5 und 6.

Vom reinen chemischen Grundverständnis würde man folgende Kriterien aufstellen, wenn es nötig wäre selbständig ein Polyensystem durch allylische Methylgruppen zu modifizieren, welches bezüglich der Wasserstoffabstraktion möglichst stabile Produkte ausbildet, gleichzeitig aber auch eine genügend hohe Reaktivität bezüglich der Addition von Sauerstoff besitzt. Diese Reaktivität sollte aber so abgesenkt sein, daß das Polyensystem nur mit relativ reaktiven Zwischenstufen reagiert und nicht direkt vollständig von Sauerstoff zersetzt wird. Es wird also der Mittelweg zwischen Reaktivität und Lebensdauer gesucht:

- Die Planarität des Polyensystems sollte möglichst erhalten bleiben. Diese bedeutet, daß Radikalbildung durch Verdrillung von Doppelbindungen oder Stollpressungseffekte im Carotinoid möglichst unterdrückt werden sollte.
- Daraus folgt auch, daß der Verdrillungswinkel zwischen Ring und Kette möglichst klein zu halten ist.
- Weiterhin gilt für die Stabilität: Maximale Anzahl von Methylgruppen, bei minimaler sterischer Hinderung.

Die Methylgruppen der Kategorie 1 (abgesehen von denen in 5 und 5` Position) bilden nach der Wasserstoffabstraktion grundsätzlich größere Allylsysteme aus als diejenigen, welche der Kategorie 2 zugeordnet werden. Geht man von der allgemein anerkannten These aus, daß die Stabilität eines Allylsystems mit der Konjugationsgröße steigt, sind die Methylgruppen 1-4 bzw. 1`-4` der Kategorie 2 denen der Kategorie 1 unterlegen.

Benachbarte Methylgruppen (z.B. 1 und 2 oder 2 und 3) behindern sich sterisch und destabilisieren somit das Polyensystem durch Winkelaufweitung des zentralen  $sp^2$ -Zentrums an dem sich die Methylgruppen befinden durch Abweichung von idealen  $120^\circ$  Winkel. Dies läßt sich schon mit einer simplen AM1-Rechnung darstellen: Für die unmethylierte Kette ergeben sich nach AM1 für die Bindungswinkel a, b und c jeweils  $123^\circ$ . Die Ergebnisse für die methylierte Kette sind:

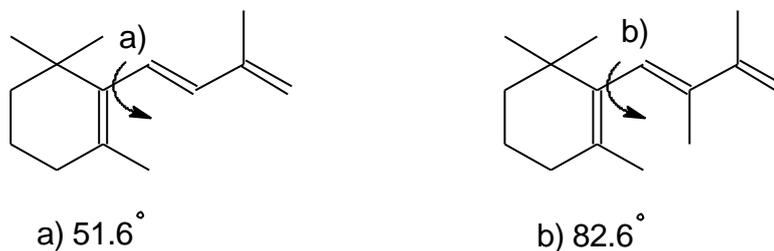


**Abbildung 7:** Winkelaufweitung von  $sp^2$ -Zentren bedingt durch Stollpressung von Methylgruppen (Ergebnisse von AM1-Rechnungen)

Aus diesen Ergebnissen sieht man, daß die Einführung von Methylgruppen zwischen denen drei  $sp^2$  Zentren liegen nur  $2-3^\circ$  Winkelaufweitung bewirken. Die Stollpressung zwischen einer Methylgruppe und einem Wasserstoffatom ist also sehr gering. Dagegen bewirkt die sterische Interaktion von zwei Methylgruppen eine Winkelaufweitung von  $10-11^\circ$ . Somit ist es leicht einsichtig, daß es für die Stabilität des Polyensystems sehr ungünstig ist, benachbarte Methylgruppen einzuführen.

Die Methylgruppen der Kategorie 3 sind a priori zu verwerfen, da sie die bereits vorhandene Verdrillung zwischen Ring und Kette, bedingt durch die Wechselwirkung der Methylgruppe in der 5-Position des Ringes und dem Wasserstoffatom an Position 1 bzw. 1` in Kategorie 2, noch wesentlich verstärken würden und zu einer fast vollständigen Abkopplung der Doppelbindung des Ringes von der Kette führen würden. Dies ist einsichtig, wenn man bedenkt, daß beim  $\beta$ -Carotin der Verdrillungswinkel

zwischen Ring und Kette schon ca.  $39^\circ$  [23] beträgt. AM1-Rechnungen bestätigen diese Überlegungen:



**Abbildung 8:** Ergebnisse von AM1-Rechnungen für den Verdrillungswinkel zwischen  $\beta$ -Jonon-Ring und Kette bei Einführung von Methylgruppen in die Kette

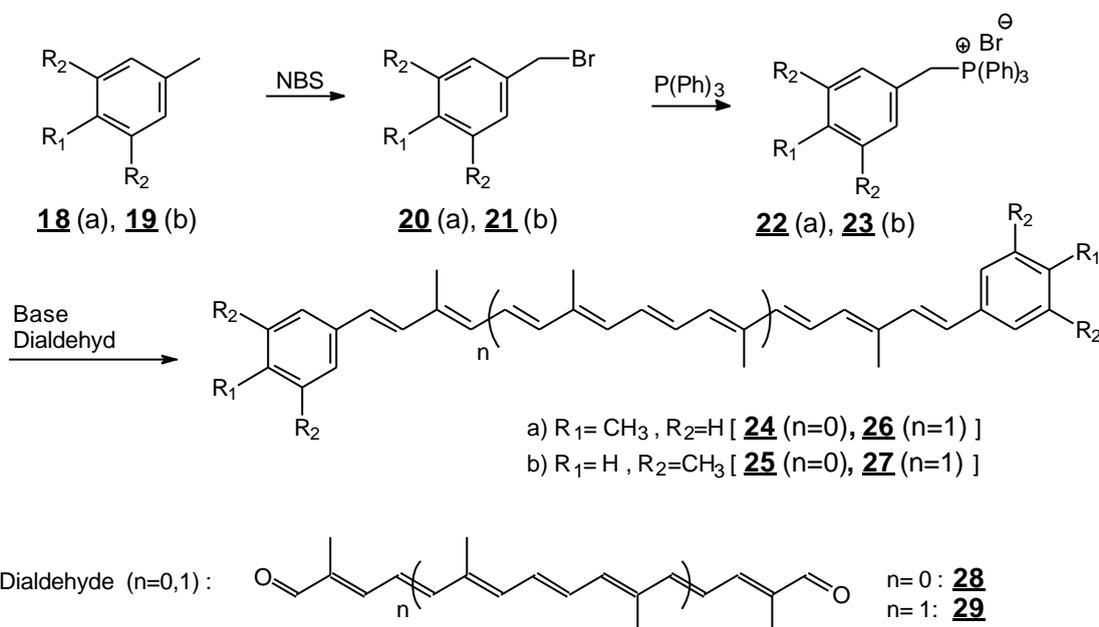
Faßt man diese Ergebnisse und Überlegungen zusammen ist die günstigste Zahl und Anordnungen der Methylgruppen in der Polyenkette diejenige, welche auch im  $\beta$ -Carotin natürlich vorkommt. Modifikationen führen zu Molekülen, bei denen der antioxidative Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt ist als bei den Carotinoiden mit natürlicher Methylgruppenstellung. [s. dazu Kapitel 3.7.8.]

### 3.1.1.2. Klasse 1: Aromatische Carotinoide mit variabler Methylgruppenanzahl und Polyenlänge

Anzahl und Stellung allylischer Methylgruppen können einen entscheidenden Einfluß auf die antioxidative Wirkung von Carotinoiden haben (s. z.B. 3.6.9. oder 3.5.6.7-3.5.6.10.). Einerseits schützen die Methylgruppen die Moleküle vor Zersetzung, da die räumliche Ausdehnung dieser Gruppen den Angriff des Sauerstoffs auf das  $\pi$ -System erschwert (sterischer Faktor). Diese Abschirmung schwächt die Additionsreaktionen mit Sauerstoff ab und setzt somit aber auch die Tendenz des Moleküls Radikale abzufangen, herab.

Andererseits muß man berücksichtigen, daß diese Methylgruppen allylische Wasserstoffatome besitzen, welche nach Abstraktion Radikale erzeugen. Diese relativ unreaktiven Allylradikale können zwar als eine der Hauptursachen für den antioxidativen Effekt angesehen werden, auf der anderen Seite sind sie aber auch potentielle Träger der Kettenreaktion (elektronischer Faktor).

Zur Quantifizierung dieser Effekte wurden Substanzen synthetisiert, welche leicht zugänglich und modifizierbar sind. Die Wahl fiel auf Polyensysteme mit aromatischen Endgruppen, da die Endgruppen kommerziell erhältlich und die Phosphoniumsalze unaufwendig darstellbar sind. Von M. Schmidt und G. Bucholski wurden mit den Phosphoniumsalzen **22** und **23** insgesamt 11 Substanzen dieser Verbindungsklasse synthetisiert und vollständig charakterisiert. Diese Routen folgen der klassischen Carotinoidchemie und basieren auf doppelter Wittig-Reaktion von Dialdehyden. Die dabei anfallenden halbseitig umgesetzten Dialdehyde sind gleichzeitig wertvolle Bausteine zur Synthese von asymmetrischen Carotinoiden. Aus der Vielzahl der möglichen Experimente sei hier nur eine kleine Auswahl gegeben. Weitere Details findet man bei [24].



V 1-4

#### **Schema 14:** Beispielroute für die Synthese aromatischer Carotinoide

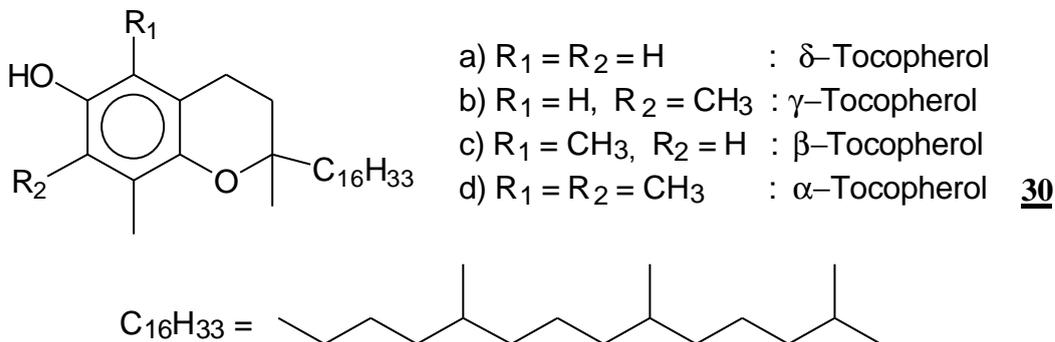
Die Verbindung mit der Mesitylenendgruppen besitzt zwei arylische Methylgruppen mehr als die entsprechende p-Xylol-Verbindung. Bestünde ein Zusammenhang zwischen der Wasserstoffabstraktionsmöglichkeit am Antioxidans und einer positiven Auswirkung auf den antioxidativen Effekt, so würde das Mesitylencarotinoid wesentlich bessere Eigenschaften besitzen als das p-Xylol-Carotinoid. Die Meßergebnisse widersprechen exakt dieser Hypothese. In dem Kapitel 3.6.9 wird genauer auf diese Effekte eingegangen.

### 3.1.2.1. Klasse 2: Tocopherole mit gekoppelten Wirkungssystemen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht Substanzen zu synthetisieren, deren Wirkung denen des natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Tocopherols überlegen sein sollten. Deswegen wurden modifizierte Tocopherole und Carotinoide mit phenolischen Endgruppen dargestellt, die neuartige Wirkmechanismen aufzeigen sollten. Es wurde Wert darauf gelegt, daß diese Substanzen zweistufig reagieren können. Dies bedeutet, daß diese Moleküle im Antioxidationsprozeß im ersten Schritt in definierte Produkte übergehen, welche selber wieder als Antioxidantien wirken können.

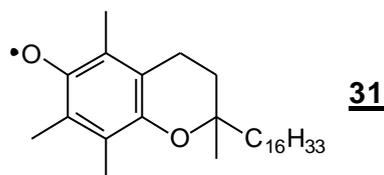
#### a) Wirkungsmechanismen natürlicher Tocopherole:

Tocopherole sind in biologischen Systemen sehr wichtige kettenbrechende Antioxidantien. Sie sind aufgebaut aus einem Chromanring, welcher den antioxidativen Effekt in sich trägt und einem Phytylrest, welcher für die Lipophilie des Moleküls sorgt. Die bekanntesten Tocopherole sind das  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  Tocopherol von denen  $\alpha$ -Tocopherol **30** die höchste antioxidative Effizienz in biologischen Systemen hat [25].



**Abbildung 9:** Struktur der biologisch aktiven Tocopherole

Die antioxidative Wirkung dieser Stoffklasse benötigt nicht die Teilnahme von katalysierenden Enzymen [26]. Der Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einem konzertierten Wasserstofftransfer oder einer Sequenz aus Elektronen- und Protonentransfer bei denen ein Tocopherylradikal **31** gebildet wird [27].

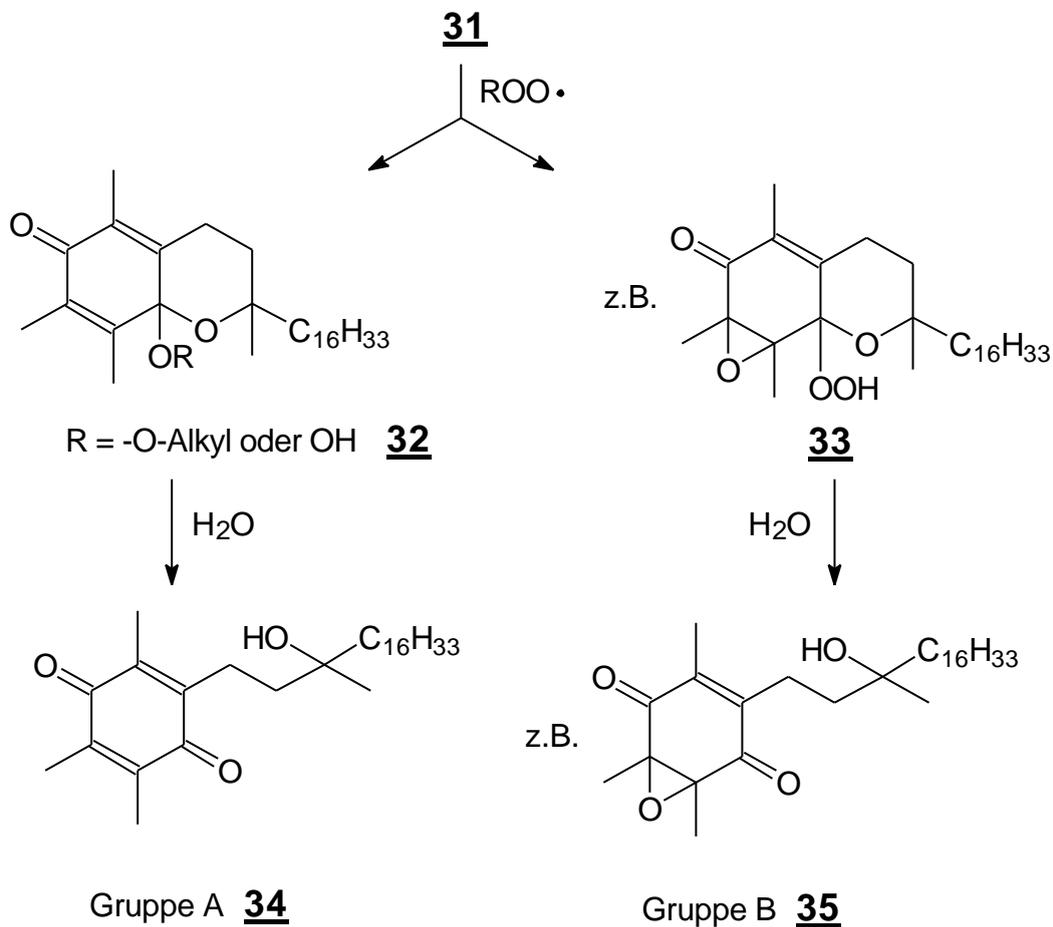


**Abbildung 10:** Struktur des Tocopherylradikals **31**

Dieses Radikal kann auf drei Wegen reagieren:

- Reaktion mit einem zweiten Radikal unter Bildung nichtradikalischer Produkte
- Reduktion zurück zum Tocopherol
- Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem Lipidmolekül und somit Kettenfortpflanzung in der Lipidperoxidation.

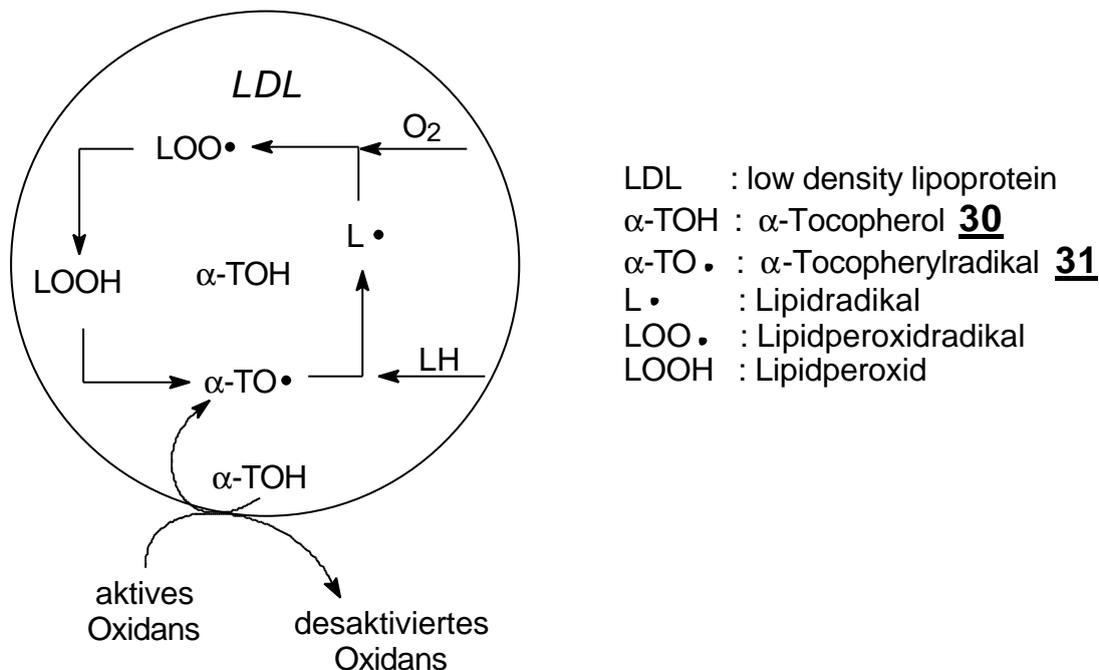
Die Route a) führt zu zwei Hauptgruppen von Produkten, den 8- $\alpha$ -substituierten Tocopheronen **34** (Gruppe A), welche sich aus Addukten mit Peroxidradikalen bilden oder aus Epoxy-8- $\alpha$ -Hydroxyperoxytocopheronen **33**, welche leicht zu Epoxychinonen **35** hydrolysieren (Gruppe B). In biologischen Systemen werden substituierte Chinone der Gruppe A bevorzugt gebildet [28] [29].



**Schema 15:** Abbaumechanismus des  $\alpha$ -Tocopherylradikals **31**

Während die Wege a) und b) Antioxidationen beschreiben, ist c) eine prooxidative Route. Dieser Reaktionspfad wird eingeschlagen, wenn die Konzentration des Ketteninitiators (Hydroxylradikale oder Peroxide) sehr gering ist [30]. Nach Witting et. al. [31] ist die Geschwindigkeitskonstante der Peroxidation invers proportional zur Initiationsgeschwindigkeit.

Dieser Effekt tritt aber nur in Lipoproteinemulsionen, wie z.B. LDL, auf. Dort findet man Wasser/Fett-Grenzflächen. Die hydrophobe Natur des bei der Oxidation entstehenden Tocopherylradikals  $\alpha\text{-TO}\cdot$  **31** verhindert die Wanderung in andere Partikel. Somit wird das Radikal abgetrennt von anderen Reaktivteilchen, welche die Kettenreaktion unterbrechen können. Die einzige Möglichkeit ist die Reaktion mit den Lipiden in der direktem Umgebung im LDL und damit Aufrechterhaltung der Kettenreaktion, welche zur Lipidperoxidation führt. Schema 15 illustriert diesen Effekt:



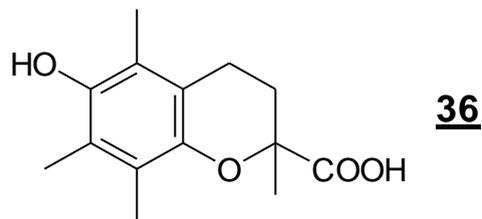
**Schema 16:** Mechanismus des prooxidativen Effektes von  $\alpha$ -Tocopherol nach Bowry und Stocker [30]

### **b) Synthetische Tocopherole:**

Um die hervorragenden antioxidativen Eigenschaften der natürlichen Tocopherole zu übertreffen wurde in den letzten Jahren versucht Wirksamkeit dieser Moleküle durch Modifikationen noch zu steigern. Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit der Modifikation der Substituenten am aromatischen Ring, Substitution des Sauerstoffs

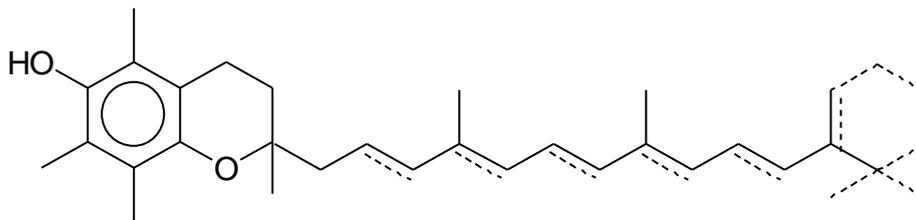
durch Heteroatome und Verwendung von Benzofuran- statt Chromanringen [32]. Die antioxidativen Eigenschaften dieser Moleküle blieben aber weit hinter den Erwartungen zurück. Deswegen wurde in neuerer Zeit Versucht die Aktivität der Tocopherole durch strukturelle Veränderungen der Phythylkette zu erhöhen.

Die erste auch technisch interessante Verbindung war das Trolox® **36**. Bei dieser Substanz ist die Phythylkette durch eine Carboxylgruppe ersetzt. Trolox ist ein hervorragendes Antioxidans in wässrigen Phasen. Dies ist auch nicht verwunderlich, da der Phythylrest des natürlichen Tocopherols nur für die Lipidlöslichkeit zuständig ist. Der antioxidative Effekt liegt alleine in der Chromangruppe. Somit ist es nur gelungen den Wirkungsbereich des Tocopherols von lipophilen zu hydrophilen Phasen hin zu verschieben. Die Aktivität bleibt aber gleich.



**Abbildung 11:** Trolox® **36**

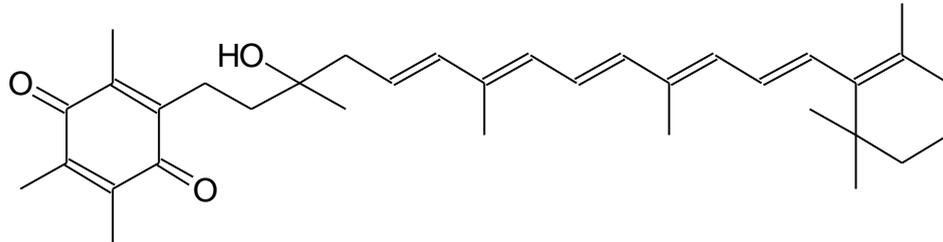
Eine weitere Möglichkeit die Aktivität des Tocopherols zu erhöhen ist die Modifikation des Phythylrestes:



**Abbildung 12:** Struktureller Zusammenhang zwischen der Phythylkette und Carotinoiden

Da die Phythylkette konstitutionell dieselbe Kette ist, welche in Carotinoiden auftritt, war es interessant ein Molekül zu kreieren, welches die Eigenschaften von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\beta$ -Carotin verknüpfen soll. Die in der Natur nur für die Löslichkeit zuständige Phythylkette wird in diesem Molekül zu einer antioxidativen Gruppe ohne die Lipophilie des  $\alpha$ -Tocopherols zu beeinflussen. Moleküle dieser Art haben also

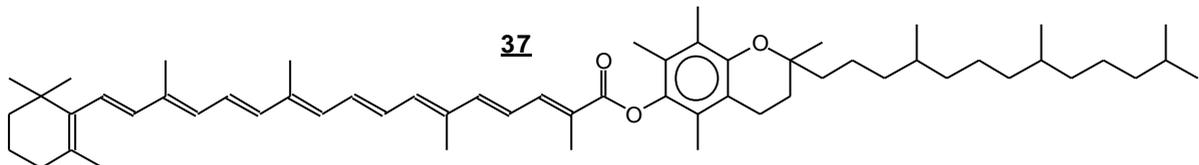
mehrere antioxidative Effekte. Das Endprodukt der Gruppe A (Schema 15) beim Abbau des Tocopherols entspräche bei der phythylkettenmodifizierten Form folgender Struktur:



**Abbildung 13:** Mögliches Produkt der Oxidation eines in der Kette modifizierten Tocopherols

Die entstehende Verbindung ist das Äquivalent zu einem kettenverkürzten Carotinoid und kann über den Mechanismus des antioxidativen Effektes von Carotinoiden weiter wirken. Von der Theorie her müßte damit ein Effekt erzeugt werden, welcher über der Wirksamkeit des reinen Tocopherols liegt.

Grundlagenforschung für diese Stoffklasse wird im hiesigen Institut seit 1995 betrieben [33]. 1998 veröffentlichte Slivka [34] eine ähnliche Verbindung, welche die Effekte von Carotinoiden und Tocopherolen vereinigen sollte:

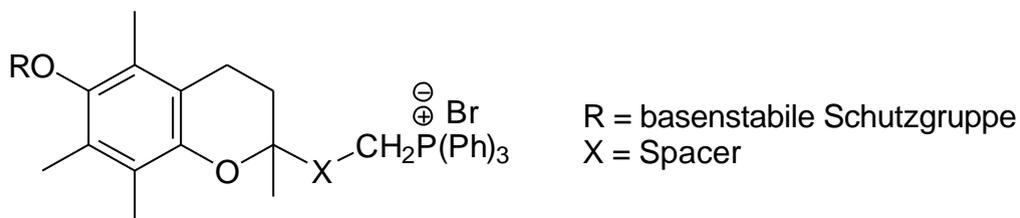


**Abbildung 14:** Modifiziertes Tocopherol **37** nach Slivka et. al.

Über die Wirksamkeit der Substanz gibt es in der Literatur keine Auskünfte. Trotzdem kann man voraussagen, daß die maximale Wirksamkeit dieser Verbindung nur auf der formalen Zugabe von zwei Äquivalenten Antioxidans beruht, nicht auf einer gekoppelten Wirksamkeit. Weiterhin muß man berücksichtigen, daß die Wirksamkeit des Tocopheroläquivalentes abgeschwächt sein müßte, da durch die Kupplung ein vor Oxidation geschütztes Tocopherol entsteht.

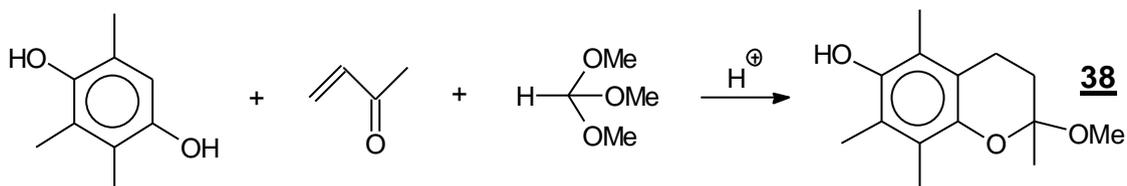
### 3.1.2.2. Synthese kettenmodifizierter Tocopherole

Um das Potential für die bequeme Synthese der kettenmodifizierten Tocopherole zu erhalten, ist es nötig einen Baustein zu besitzen, mit welchem man die in der Carotinoidsynthese gewöhnlich verwendeten Bausteine (z.B. Retinal, Crocetindialdehyd etc.) kuppeln kann. Als Ausgangsretron wurde folgende Struktur in Angriff genommen:



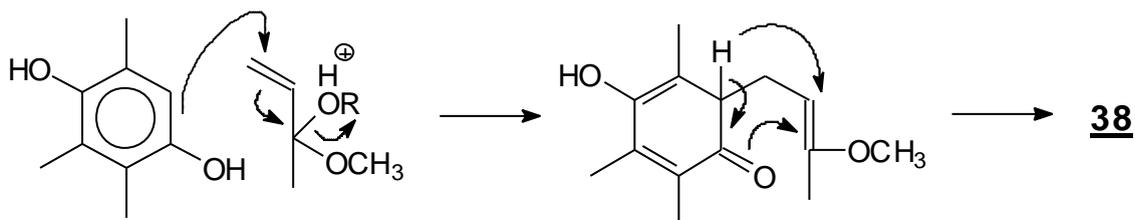
**Abbildung 15:** Benötigter Kupplungsbaustein für Carotinoid-Tocopherole

Der Aufbau des Chromangerüsts erfolgte zunächst auf der Route von Scott [35]: Das über drei Stufen erhaltene Intermediat **40** ist ein wertvoller Baustein zur Synthese der kettenmodifizierten Tocopherole. Ein Vorteil dieser Syntheseroute ist, daß das Produkt der ersten Stufe **38** schwerlöslich in dem als Lösungsmittel verwendetem Methanol ist und direkt ausfällt:



**Schema 17:** Synthese von **38**

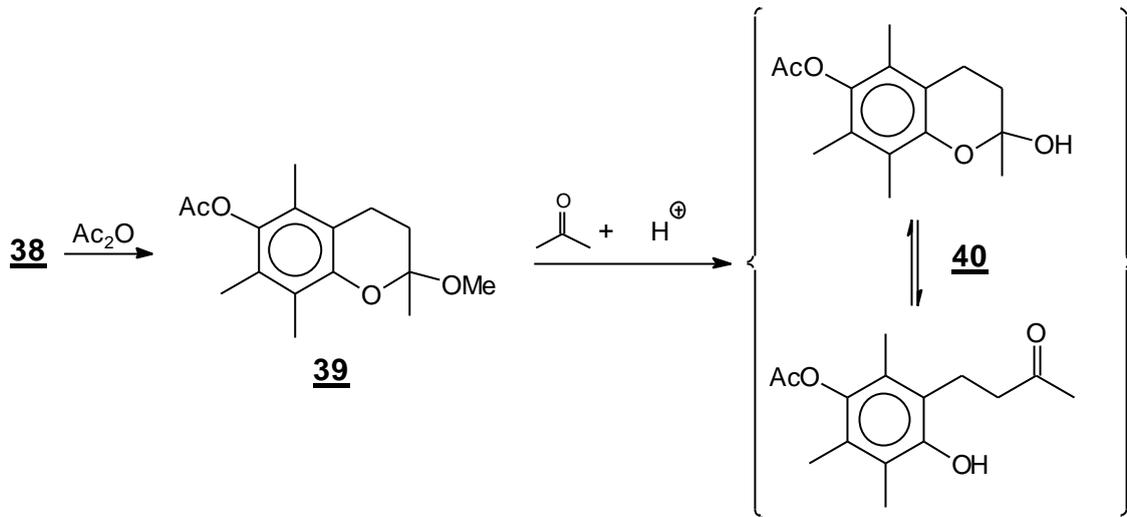
Mechanistisch ist diese Stufe interessant, da sich nicht, wie man vermuten könnte, direkt das Methyl-vinyl-keton addiert und anschließend methyliert wird. Nach Scott. et al. Verläuft die Reaktion so, daß es sich um eine Addition des ketalisierten Methyl-vinyl-ketons handelt:



**Schema 18:** Mechanismus der Bildung von **38**

Der Baustein **38** wird anschließend an der phenolischen Hydroxygruppe mit Essigsäureanhydrid acetyliert und die Ketalfunktion im Molekül sauer gespalten.

V6  
V7

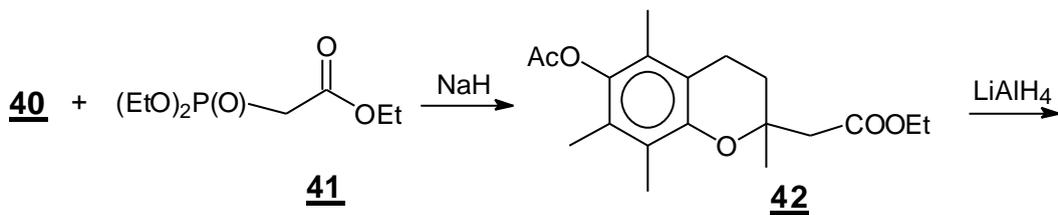


**Schema 19:** Synthese des Tocopherol-Intermediates **40**

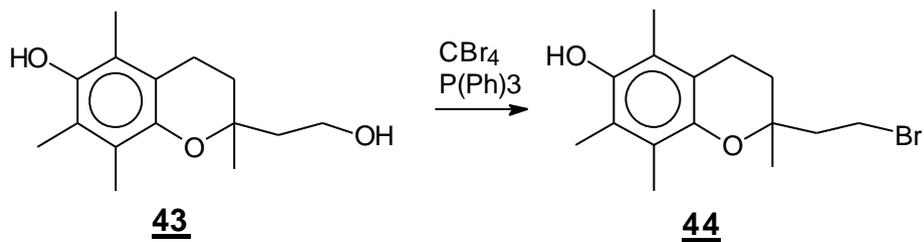
Das in dieser Sequenz synthetisierte Halbketal **40** steht im Gleichgewicht mit seiner Keto-Form. Es ist möglich, diesen Baustein über Wittig-(Horner-Emmons)-, Aldol oder andere Carbonylverlängerungen bequem zu verlängern.

**a) C<sub>2</sub>-Verlängerungsmethoden:** Die Reaktion mit Triethylphosphonoessigsäure und anschließende Hydrolyse und Reduktion, bzw. direkte Reduktion des entstehenden Esters führt zum gewünschten Alkohol **43**, welcher nach [36] mit Tetrabrommethan und Triphenylphosphin in das gewünschte Bromid **44** überführbar ist:

V8



V9  
V10



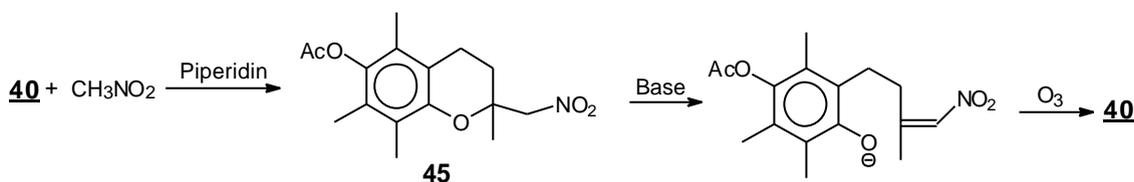
**Schema 20:** Synthese des Chromanyl bromids **44**

Leider ist es nicht möglich aus diesem Baustein **44** ein Phosphoniumsalz oder Phosphonat zu gewinnen. Das  $\gamma$ -Kohlenstoffatom der Kette wirkt durch seine drei Substituenten dermaßen sterisch abschirmend, daß Substitutionsreaktionen mit sterisch anspruchsvollen Reagentien, wie Triphenyl- oder Tributylphosphin nicht gelingen. In der Literatur sind deswegen wahrscheinlich auch nur Umsetzungen mit Trimethylphosphin beschrieben [36].

Zwar ist es möglich das Bromid **44** in der Schmelze mit Triphenylphosphin teilweise in eine Substanz zu überführen, welche wahrscheinlich das Phosphoniumsalz darstellt ( $^{31}\text{P}$ -NMR-Kontrolle), doch ist es nicht möglich, diese Substanz zu isolieren.

Aus diesen Gründen wurden andere Routen zur Darstellung eines geeigneten Synthons im Sinne von Abb. 15 gesucht.

**b)  $\text{C}_1$ -Verlängerungsmethoden:** Um der sterischen Hinderung des oben erwähnten Bromids **44** auszuweichen, wurde versucht einen aldehydischen Baustein mit einen Kohlenstoffatom weniger in der Kette zu synthetisieren. Dazu war geplant **40** mit Nitromethan zu verlängern und anschließend die Nitroverbindung durch eine Nef-Reaktion in einen Aldehyd zu überführen. Dieser sollte dann mit einem entsprechenden Phosphoniumsalz zum gewünschten Produkt umgesetzt werden:

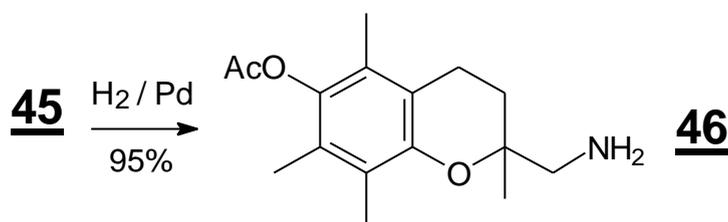


**Schema 21:** Nicht praktikable Methoden zur Herstellung eines Aldehyds aus **40**

Die ozonolytische Variante der Nef-Reaktion brachte keinen Erfolg. Da zu über 90% Verbindung **40** wieder erhalten wurde, liegt die Vermutung nahe, daß das durch die Base gebildete Anion eine Ringöffnung bevorzugt, statt eine Doppelbindung zum Stickstoff auszubilden (Schema 21). Es wurde zwar noch versucht durch eine Variation des Lösungsmittels von Methanol zu Butanol die Bildung des polaren Phenolations zu unterdrücken, aber diese Reaktionsführung blieb auch erfolglos.

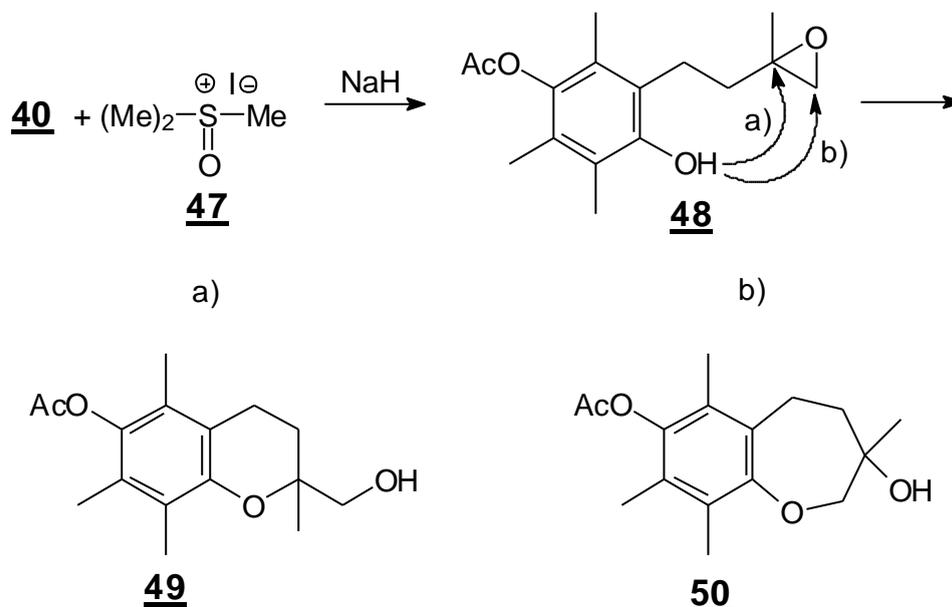
Eine andere Idee zur Synthese des gewünschten Bromids war die Reduktion der Nitrogruppe mittels katalytischer Hydrierung. Diese Reaktion läuft in über 90%iger Ausbeute sehr gut ab. Das erhaltene Aminochroman **46** läßt sich aber nicht diazotieren. Alle Versuche führten zu einer vollständigen Zersetzung des Eduktes.

V12



**Schema 22:** Synthese des Aminochromans **46**

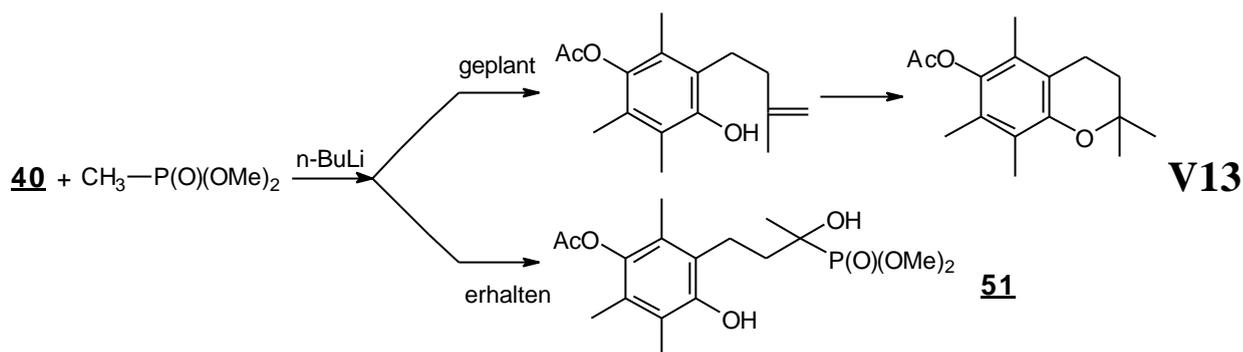
b<sub>1</sub>) Als weitere Variante der C<sub>1</sub>-Verlängerung wurde versucht die Carbonylgruppe von **40** mit Trimethylsulfoxoniumiodid zu epoxidieren und anschließend das Epoxid zu spalten. Diese Reaktion ist auch in der Literatur [37] an einer ähnlichen Substanz beschrieben. Trotz Variation der Reaktionsparameter erhielt man nur ein Gemisch des in der Literatur beschriebenen Siebenringes und des gewünschten Sechsrings. Dieses Gemisch ließ sich nicht trennen, noch war es möglich das als Hauptprodukt (ca. 60%) entstandene Oxepin sauer zum Sechsring umzulagern:



**Schema 23:** C<sub>1</sub>-Verlängerung mittels Schwefelyliden

Das Entstehen des Siebenringes ist nicht erstaunlich, da aus sterischen Gründen die Methylengruppe des Epoxides angegriffen wird. Da aber der Siebenring gegenüber dem Sechsring spannungsmäßig benachteiligt ist, entsteht auch der Sechsring.

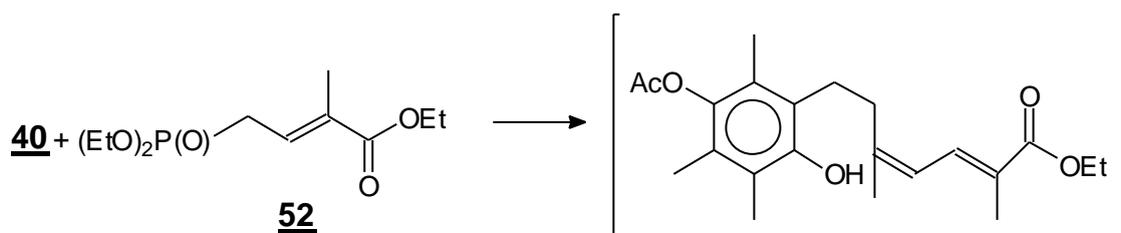
b<sub>2</sub>) Als letzte Variante in der Serie der C<sub>1</sub>-Verlängerungen wurde **40** mit einem C<sub>1</sub>-Phosponat umgesetzt. Aber auch bei dieser Reaktion wurde nicht das geplante Produkt erhalten:

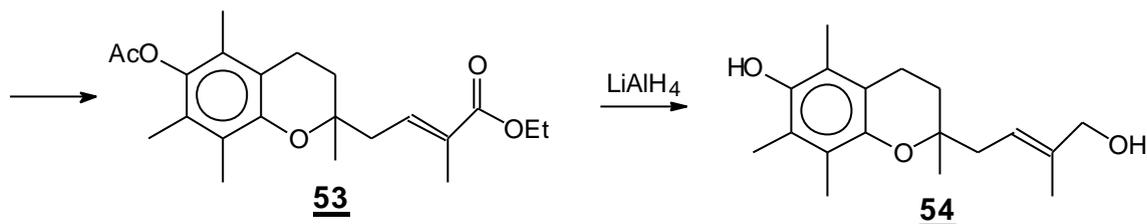


**Schema 24:** Ungewöhnliche "Wittig-Horner-Emmons-Reaktion"

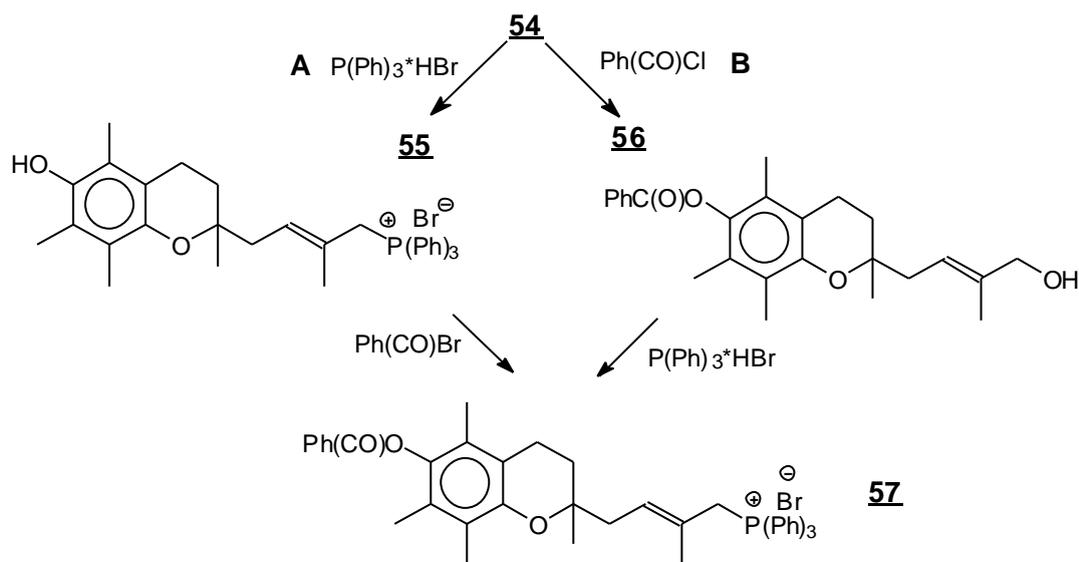
Die geplante Wittig-Horner-Emmons-Reaktion olefiniert nicht die Carbonylgruppe. Statt dessen findet man eine Aldol-ähnliche Addition des Ylids an die Carbonylgruppe von **40**. Bei dieser Verbindung war es auch nicht möglich, unter saurer Katalyse die Cyclisierung zu erreichen. GC-Kontrollen zeigten keinen Umsatz, auch nicht bei Variation von Lösungsmittel, Reaktionszeit und -temperatur.

**c) C<sub>5</sub>-Verlängerungsmethoden:** Als letzte Möglichkeit zur Darstellung des benötigten Phosphoniumsalzes wurde ein C<sub>5</sub>-Phosponat **52** eingesetzt, welches auch in Carotinoidchemie gängige Verbreitung hat. Die Wittig-Horner-Reaktion und anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid führt in guten Ausbeuten (60-80%) zu folgender Zwischenstufe:



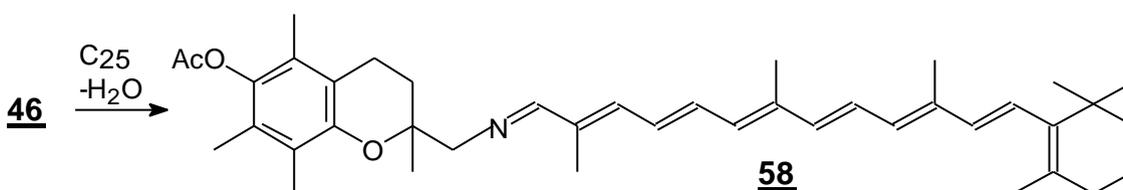
V14  
V15**Schema 25:** C<sub>5</sub>-Verlängerung von **40**

Der erhaltene Alkohol **54** wurde anschließend direkt mit Triphenylphosphoniumhydrobromid zum Phosphoniumsalz umgesetzt. Das erneute Schützen der phenolischen Hydroxygruppe mit Benzoylchlorid führt zum Phosphoniumsalz, welches als Anion sowohl Chlorid- als auch Bromidionen enthält. Dieses gemischte Phosphoniumsalz fällt unter den üblichen Bedingungen zur Synthese von Phosphoniumsalzen (Ausfällung in Diethylether) nicht in sauberer Form an. Weiterhin ist es nicht möglich das überschüssige Benzoylchlorid abzutrennen, da es beim Absaugen des Salzes immer in diesem ausfällt und die Kristallisation erschwert. Hydrolyse des Benzoylchlorids ist aufgrund der Reaktivität des Phosphoniumsalzes mit Basen nicht möglich. Zur Umgehung dieser Probleme wurde deswegen Benzoylbromid verwendet (Route A in Schema 26). Bessere Reinheiten ergeben sich, wenn man zuerst den Alkohol **54** mit Benzoylchlorid schützt und anschließend mit Triphenylphosphoniumhydrobromid das Phosphoniumsalz darstellt (Route B in Schema 26). Diese Route ist aber arbeitsaufwendiger, da der geschützte Chromanalkohol säulenchromatographisch gereinigt werden muß.

V16  
V17**Schema 26:** Syntheseroute für Chroman-Phosphoniumsalz **57**

Das somit synthetisierte Phosphoniumsalz **57** läßt sich aber nicht mit den gängigen Bausteinen zur Carotinoidsynthese (Retinal, Crocetininaldehyd etc.) umsetzen. Sowohl Variation der Base (n-BuLi, Natriumhydrid, Natriumamid, Natriummethanolat, Epoxybutan) und Variation der Versuchsbedingungen (Temperatur, Zeit, etc.), führten zu keinem Ergebnis. Zwar kann durch HPLC-Kontrolle nachweisen, daß Umsatz stattfindet, aber dieser liegt nur im Bereich von unter 3%.

**d) Schiff'sche Basen:** Aufgrund der oben erwähnten synthetischen Probleme wurde versucht eine ähnliche Substanz wie die geplante zu synthetisieren. Als Schlüsselintermediat wurde das Aminochromanol **46** verwendet. Diese Verbindung läßt sich mit  $\beta$ -Apo-12'-carotinal ( $C_{25}$ -Aldehyd) unter wasserentziehenden Bedingungen zu der entsprechenden Schiffbase **58** umsetzen:

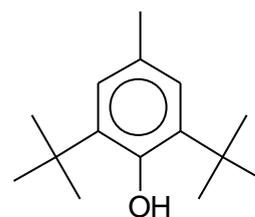


**Schema 27:** Synthese von **58**

In diesem Fall war es nicht möglich, die Substanz zu isolieren. Auf Kieselgel besitzen beide Verbindungen erstaunlicherweise exakt dasselbe Laufverhalten. Dazu wurden über 40 Laufmittelgemische getestet. Man muß davon ausgehen, daß die Verbindung entstanden ist, da Ansäuern der Lösung eine stark bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums bewirkt. Dies ist ein ganz typisches Verhalten für Schiff'sche Basen.

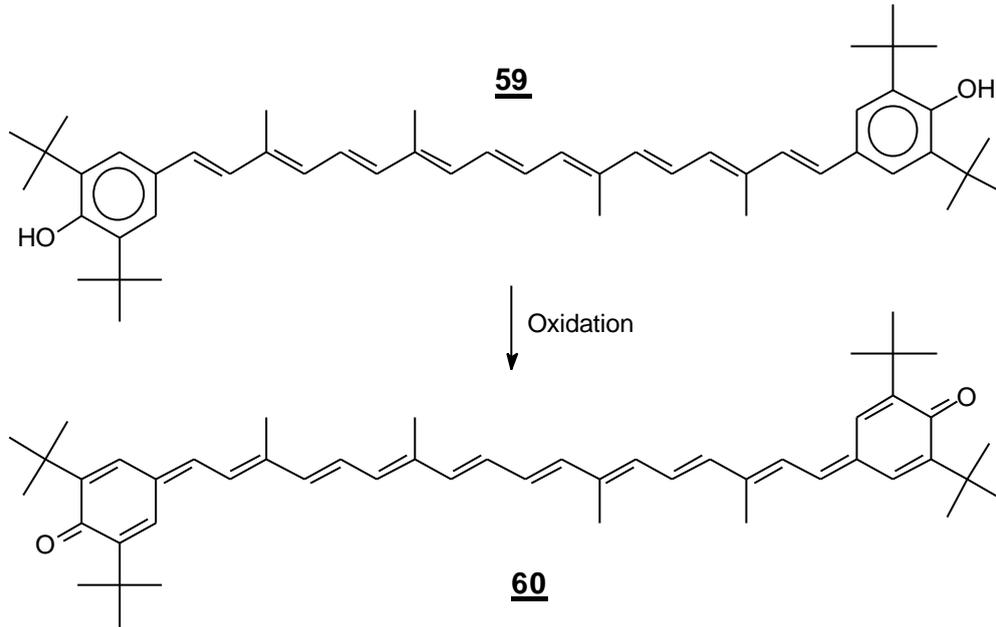
### **3.1.3.1. Klasse 3: Carotinoide mit phenolischen Endgruppen**

Auch bei dieser Verbindungsklasse stand auch das Design von gekoppelten Antioxidantien im Vordergrund. Als Basisverbindung wurde ein Carotinoide gewählt, dessen Endgruppe aus dem 2,5-Di-tert.-Butyl-para-Cresol synthetisiert wurde und im weiteren als BHT-CAR **59** bezeichnet wird. (s. auch S.9)



**Abbildung 16:** BHT

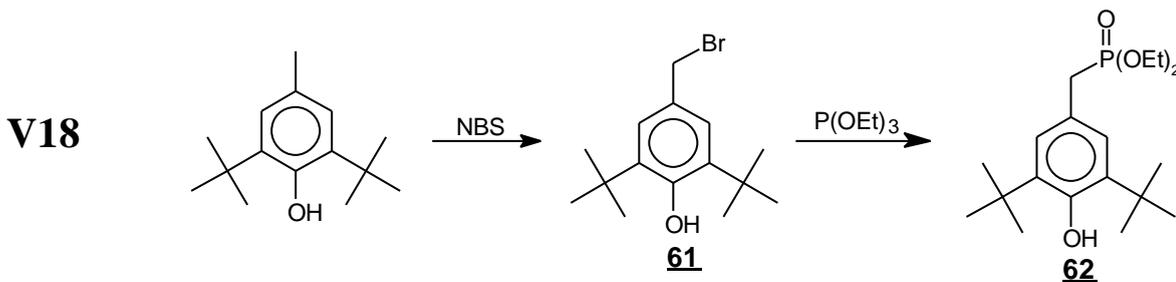
Koppelt man nun BHT **6** an die Enden eines Polyensystems, so besteht die Gefahr, daß der oben erwähnte Wirkungsmechanismus außer Kraft gesetzt wird. Die Struktur dieser Verbindung ermöglicht aber gleichzeitig einen neuartigen antioxidativen Effekt:



**Schema 28:** Oxidation des BHT-CAR

Wie aus Schema 28 ersichtlich, handelt es sich beim BHT-CAR **59** um ein vinylog verlängertes Hydrochinon. Diese Substanz ist entsprechend oxidationsempfindlich und geht an der Luft schnell in das tintenblaue Chinon **60** über. Dieser Effekt zeigt, daß das BHT-CAR **59** ein hervorragendes Antioxidans ist, da es quasi sofort mit Sauerstoff reagiert. Bei gewöhnlichen Chinonen ist damit der antioxidative Effekt erschöpft. Die hier vorgestellte Verbindung jedoch geht in ein chinoides Retrocarotinoid über. Zur Synthese dieser Verbindung wurden mehrere Routen ausprobiert.

### 3.1.3.2. Fehlgeschlagene Methoden



**Schema 29:** Erste Route zur Darstellung von BHT-CAR **59**

Es war geplant diesen Baustein nach Deprotonierung der Hydroxy- und Methylengruppe im Sinne einer Wittig-Horner-Emmons-Reaktion mit Crocetindialdehyd **29** zu der geschützten Form **65** der oben beschriebenen Verbindung **59** umzusetzen. Jedoch zeigten alle Versuche, daß der doppelt deprotonierte Baustein nicht mehr reaktiv ist. Als Basen wurden Piperidin, Natriumhydrid, Natriummethanolat und n-Butyllithium unter den gängigen Bedingungen erprobt. Auch eine Variation von Lösungsmitteln (Methanol, Tetrahydrofuran, DME), Reaktionstemperaturen (-78°C bis 100°C) und -zeiten (mehrere Stunden bis 10 Tage) brachte kein Ergebnis. Bei allen Reaktionen konnte zu keinem Zeitpunkt ein Umsatz des Phosphonates mit dem Aldehyd festgestellt werden.

Dieser Effekt liegt wahrscheinlich darin begründet, daß das bei der ersten Deprotonierung entstehende Phenolation nicht die Einführung einer zweiten negativen Ladung in das Molekül zuläßt. Eine Beobachtung spricht für diese Erklärung: Versucht man das Phosphonat mit zwei Äquivalenten Natriumhydrid zu deprotonieren, bleibt die Lösung auch nach Beendigung der Gasentwicklung immer noch getrübt durch suspendiertes Natriumhydrid. Gibt man nun vorsichtig Wasser hinzu beobachtet man sofort heftige Gasentwicklung. Das zweite Äquivalent Natriumhydrid greift also das Phenolatanion gar nicht an.

Um diesen Effekt zu unterdrücken ist es nötig die Hydroxygruppe mit einer Schutzgruppe zu blockieren: Da die beiden tert.-Butylgruppen einen sehr hohen Anspruch haben wurde zunächst testweise versucht BHT mit Trimethylchlorsilan und Pyridin als Säurefänger zu schützen. Diese Reaktion ist auch in der Literatur [48] beschrieben. Die guten Ausbeuten und Reinheit ließen sich aber nicht auf das Phosphonat übertragen: Die einzig probate Methode zur Isolierung von silylierten Alkoholen ist die Reinigung mittels Destillation. Bei dem hier vorliegenden Phosphonat liegen aber die Siedepunkte des Phenols und des Silylethers im gleichen Siedeintervall von ca. 3°C. Damit ist eine Reinigung auf destillativem Wege fast unmöglich.

Die erstaunlich geringe Siedepunktsdifferenz der beiden Verbindungen ist folgendermaßen erklärbar: Gewöhnlich besitzen silylierten Verbindungen trotz der höheren polaren Masse einen deutlich geringeren Siedepunkt als die korrespondierenden Alkohole. Dies hängt an der Fähigkeit der Alkohole Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Beim BHT ist anscheinend die Stärke der

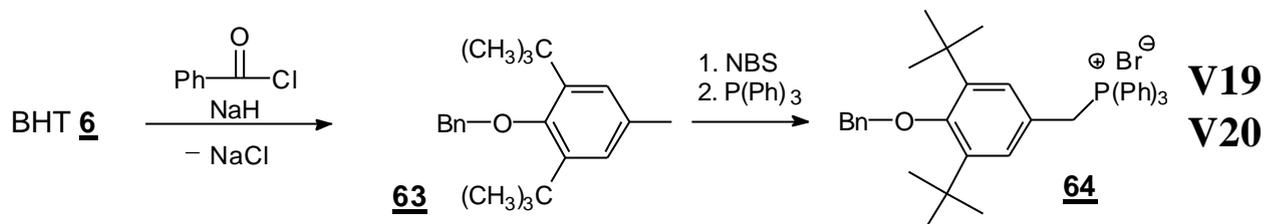
Wasserstoffbrücken durch die sterische Hinderung der Hydroxygruppe so stark herabgesetzt, daß die Erhöhung der Molekülmasse um die Trimethylsilylgruppe bezüglich des Siedepunktes denselben Einfluß hat, wie die geschwächten Wasserstoffbrückenbindungen und der Siedepunkt somit annähernd konstant bleibt. Deswegen erhält man bei der Silylierung mit Trimethylchlorsilan auch immer nur ein ca. 50:50 Gemisch von Edukt und Produkt.

Es ist nicht möglich dieses Gemisch für eine Wittig-Horner-Emmons-Reaktion zu verwenden. Zwar kann man einen Umsatz von ca. 2-3% nach HPLC beobachten, weiter geht die Reaktion in keinem Fall. Die Unmöglichkeit der doppelten Deprotonierung des ungeschützten Phosphonates kann also nicht der einzige Grund für das Ausbleiben der Reaktion sein. Eine möglich Erklärung liegt in der Natur des BHT und der Wittig-Horner-Emmons-Reaktion. BHT ist ein hervorragendes Antioxidans, welches Radikalreaktionen vollständig blockieren kann. Reaktionen vom Wittig- und Wittig-Horner-Emmons-Typ laufen aber nach neueren Erkenntnissen [39] aber über Radikal- bzw. SET-Mechanismen ab. Diese Vorgänge werden aber durch das noch vorliegende ungeschützte BHT vollständig blockiert.

Aufgrund dieser beobachteten Effekte wurde versucht, das Phosphonat mit Hexamethyldisilazan zu silylieren. Dieses Reagenz ist wesentlich reaktiver, benötigt keine Zugabe von Base und kann nach erfolgter Reaktion einfach abdestilliert werden. Gewöhnlich fällt das entstehende Produkt in dem auch als Lösungsmittel verwendeten Hexamethyldisilazan aus. Somit ist es möglich die Reaktion quantitativ in Richtung der silylierten Spezies zu drängen und die Reaktionsblockierung wäre damit aufgehoben. Dieser Effekt wurde auch beobachtet. GC/MS-Untersuchungen des erhaltenen Feststoffes zeigen immer noch BHT. Da nicht sicherzustellen ist, ob es sich nur um Hydrolyseprodukte bedingt durch die Probenvorbereitung und Meßmethode handelt, wurde versucht den erhaltenen Feststoff mit Crocetindialdehyd in THF mit Natriumhydrid als Base umzusetzen. Aber auch in diesem Fall blieb die Reaktion aus. Die Silylierung mit Hexamethyldisilazan war anscheinend auch nicht quantitativ und beim Abdestillieren des Lösungsmittels fällt das ungeschützte Edukt wieder aus und blockiert die Reaktion.

### 3.1.3.3. Erfolgreiche Methode zur Darstellung von BHT-CAR

1) Darstellung der geschützten Endsubstanz: Da alle Methoden mit Silylierungen scheiterten, wurde als Schutzgruppe die Veresterung der phenolischen Hydroxygruppe mit Benzoylchlorid gewählt.

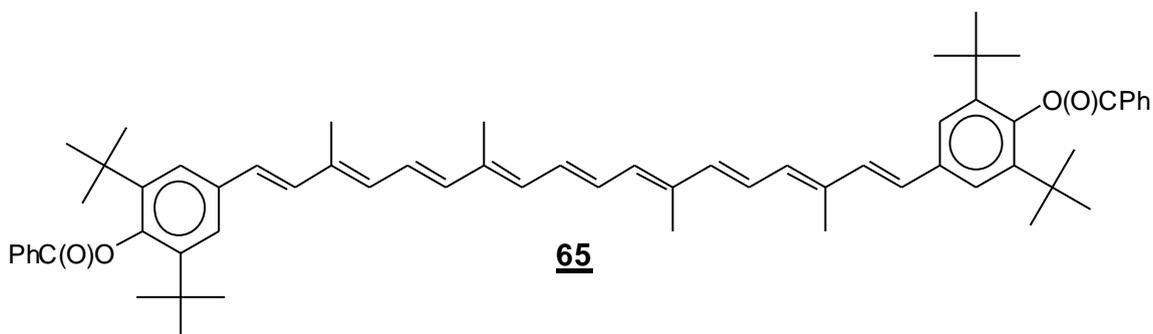


**Schema 30:** Darstellung des Phosphoniumsalzes **64** (Bn = Benzoyl)

Die Bromierung des geschützten BHT's **63** bereitet keine Schwierigkeiten. Dies deutete darauf hin, daß die radikalfangende Eigenschaft des BHT's deaktiviert ist, sonst müßte die NBS-Bromierung ungleich schwieriger ablaufen. Aus Gründen der einfacheren Aufarbeitung wurde im letzten Schritt statt des Phosphonates das korrespondierende Phosphoniumsalz hergestellt.

Die gängigste Methode zur Kupplung des Phosphoniumsalzes **64** ist die Deprotonierung mit Natriummethanolat in Methanol. Dieser Weg wurde beim ersten Versuch vermieden, um die mögliche basische Verseifung der Esterschutzgruppe zu verhindern. Statt dessen wurde ein 1:1 Gemisch von Dichlormethan und Epoxybutan in einer Variante der Budrusreaktion [40] benutzt. Diese Route führte trotz einer Reaktionszeit von 50h zu dem gewünschten Produkt **65**.

V21



**Abbildung 17:** Struktur des geschützten BHT-CAR **65**

V22

2) Entschützen: Die basische Verseifung des Benzoylestere mit konzentrierter Natronlauge oder Versuche zur Umesterung mit Methanol/Natriummethanolat schlugen fehl. Die Substanz ist dermaßen stabil, daß selbst mehrtägiges Kochen in diesen Gemischen zu keinem Ergebnis führt. Die Schutzgruppe ist nicht auf konventionelle Art entfernbar. Die einzige zum Ziel führende Methode war die Verwendung eines 10-fachen Überschusses von DIBAL und mehrstündiges Rühren bei Raumtemperatur.

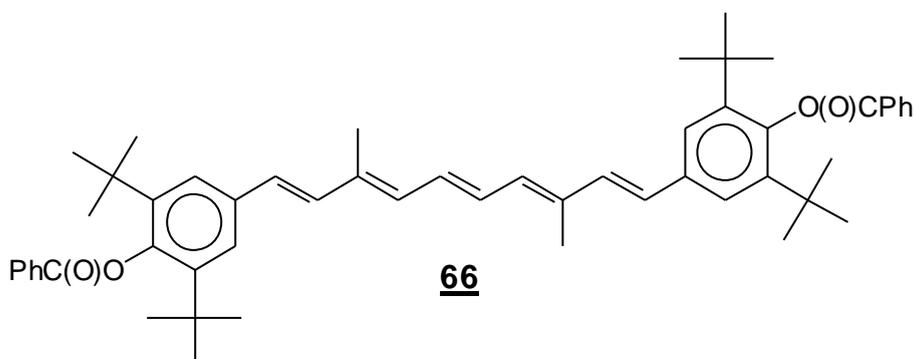
3) Anmerkungen: Die Reinigung des Produktes erfolgt über Säulenchromatographie mit reinem Methylenechlorid als Laufmittel (RF Crocetindialdehyd **29**: 0.1, RF **59** und **65** 1.0). Die Trennung ist möglich, da die Abspaltung der Schutzgruppe quantitativ verläuft. Zur Reaktionskontrolle ist es jedoch nötig, statt DC HPLC zu verwenden.

Das Produkt ist wie zu erwarten sehr oxidationsempfindlich, deshalb muß die säulenchromatographische Trennung sehr schnell durchgeführt werden. Die Reinheit der Substanz ist mittels DC nur unter Schutzgas zu ermitteln, da sie auf den verwendeten Platten an der Luft sofort teilweise oxidiert. Deswegen ist in diesem Fall auch nur eine genaue Reinheitsanalyse mittels HPLC vorzuziehen.

Weiterhin ist es möglich die Reaktionszeiten drastisch zu kürzen, wenn man das Phosphoniumsalz in Methanol/Methylenechlorid mit Natriummethanolat als Base umsetzt. Dies ist möglich, da die normalerweise basenempfindliche Esterschutzgruppe nicht mit Natriummethanolat entfernbar ist.

d) Auf dieselbe Methode wurde noch das entsprechende kettenverkürzte Pendant synthetisiert. Hier wurde als Aldehyd ein C<sub>10</sub>-Dialdehyd verwendet. Ausbeuten und Reaktionsbedingungen sind identisch:

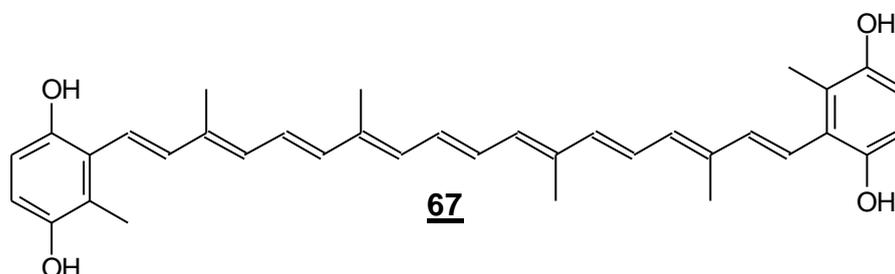
V23



**Abbildung 18:** Kettenverkürztes BHT-CAR **66**

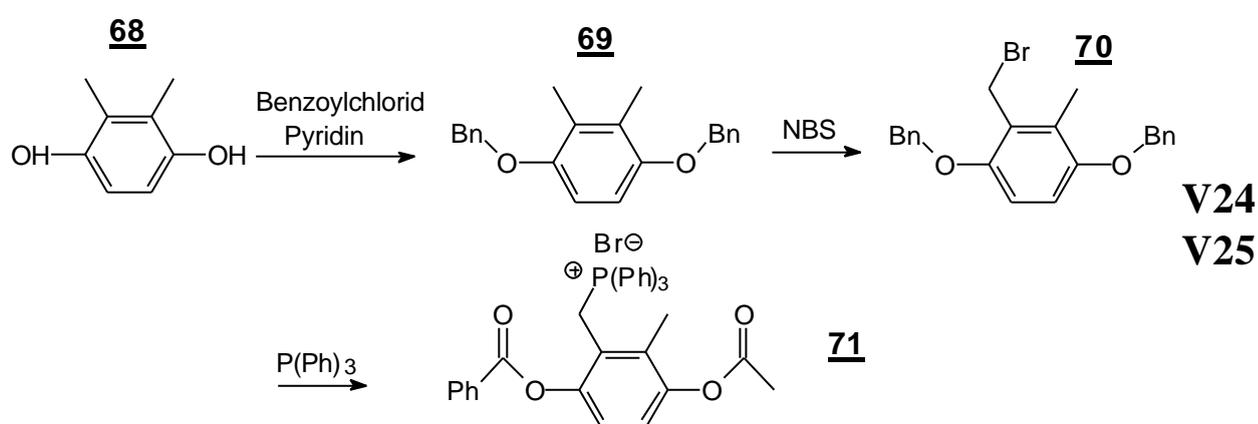
### 3.1.3.4. Weitere Versuche mit phenolischen Endgruppen

Die oben gezeigt Syntheseroute gab den Anlaß zu der Vermutung, daß noch eine weitere Substanz **67** auf diesem Weg dargestellt werden könnte:



**Abbildung 19:** Hydrochinon Carotinoid HC-CAR **67**

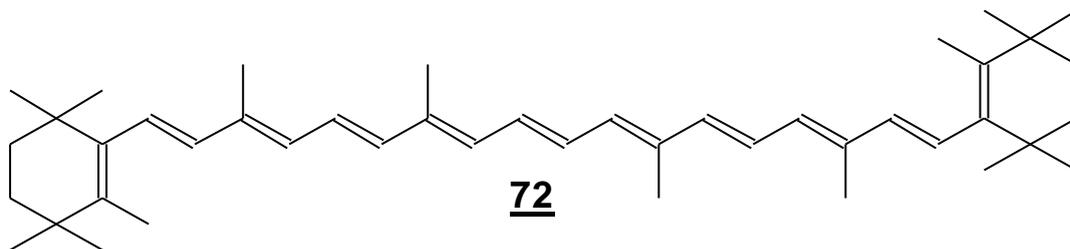
Synthetisch wurde dabei vom 2,3-Dimethylhydrochinon **68** ausgegangen. Dieses wird zunächst mit Benzoylchlorid geschützt, dann mittels Wohl-Ziegler Bromierung umgesetzt und durch Reaktion mit Triphenylphosphin in das gewünschte Phosphoniumsalz **71** überführt:



**Schema 31:** Synthese von **71** (Bn = Benzoyl)

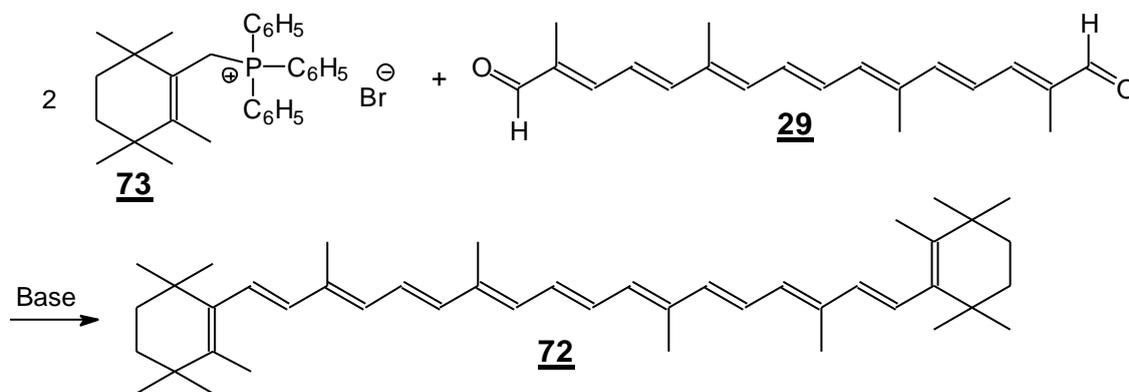
Das Phosphoniumsalz wird in 90%iger Ausbeute gewonnen. Im Gegensatz zum geschützten Phosphoniumsalz des BHT's ist es aber nicht möglich, diese Substanz im Sinne einer Wittig-Reaktion einzusetzen. Trotz vieler Varianten bezüglich Base, Reaktionszeit, -medium und -temperatur konnte kein Umsatz festgestellt werden. Wahrscheinlich ist die Schutzgruppe hier labil gegen aprotische Basen, während sie bei **64** so stark sterisch abgeschirmt ist, daß sie nicht hydrolysiert wird.

### 3.1.3.5. 4,4,4',4'-Tetramethyl- $\beta$ -Carotin (TMBC)



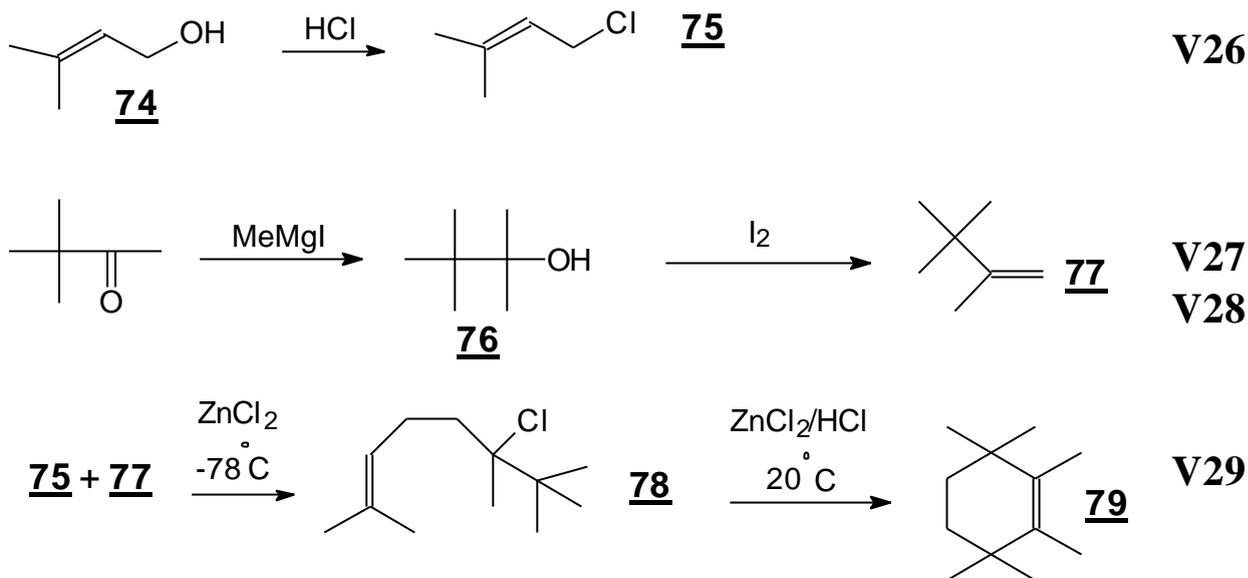
**Abbildung 20:** 4,4,4',4'-Tetramethyl- $\beta$ -Carotin (TMBC) 72

Diese Verbindung ist eine Schlüsselsubstanz zur Aufklärung des Struktur-Wirkungsunterschiedes zwischen  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin. TMBC 72 besitzt in den 4-Positionen des Ringes keine Abstraktionspositionen. Da quantenmechanische Rechnungen ergeben, daß die Carbonylgruppen im Astaxanthin keinen besonderen Einfluß auf die Stabilisierung der möglichen radikalischen Intermediate ergeben (s. Kapitel 3.2.3.), ist es möglich, daß der Reaktionsunterschied zwischen Astaxanthin und  $\beta$ -Carotin einfach auf der Blockierung der möglichen Abstraktionspositionen im  $\beta$ -Jonon-Ring beruht. Genauere Diskussionen finden sich in Kapitel 3.7.9. Von der Synthesepaltung wurde folgende Route in Angriff genommen:



**Schema 32:** mögliche Syntheseroute von 72

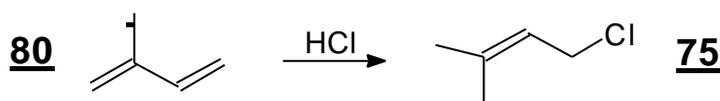
Die Synthese der entsprechenden Endgruppe wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Mayr et al. [41] versucht:



**Abbildung 21:** Synthese von 1,2,3,3,6,6 Tetramethyl-Cyclohex-1-en **79** nach Mayr et al

**Dabei traten folgende Probleme auf:**

a) Bei Versuch 30 war es nicht möglich trotz guter Trocknung das Produkt **75** wasserfrei zu erhalten. Nach der Destillation trennte sich immer eine zweite wäßrige Phase vom erhaltenen Destillat ab. Deswegen wurde der Baustein **75** direkt aus Isopren mit ähnlich guten Ausbeuten gewonnen (Versuch 30, Variante b):

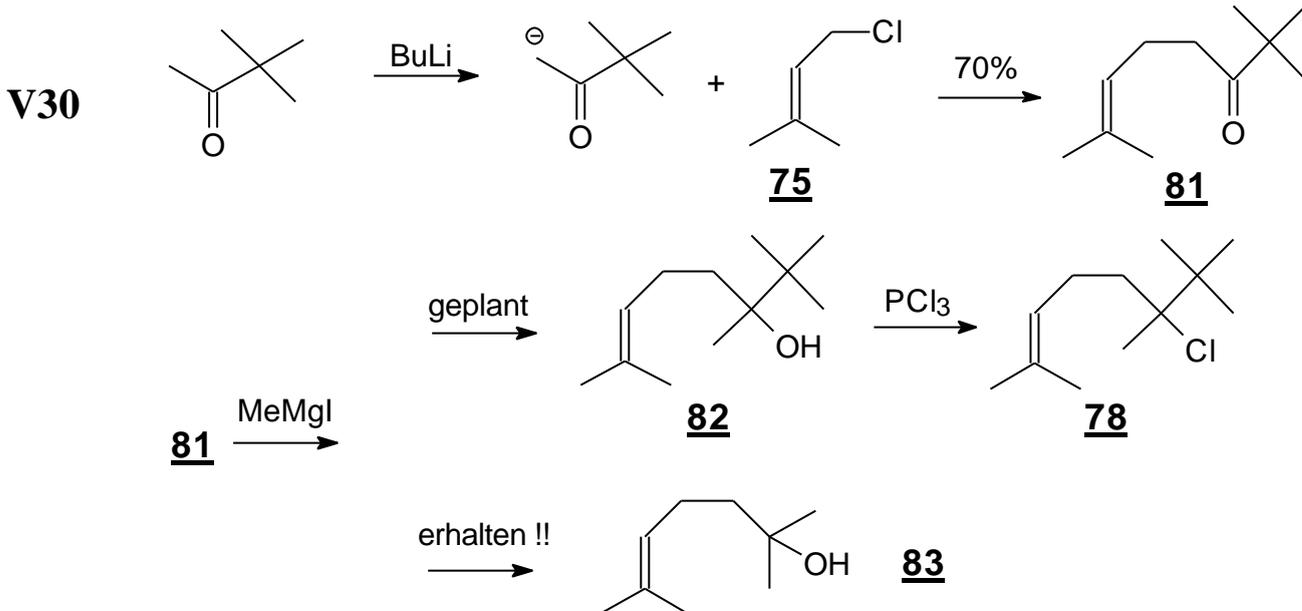


**Schema 33:** Alternativroute zur Darstellung von **75**

b) Die Synthese des Chlorids **78** verläuft in sehr schlechten Ausbeuten bezogen auf **77**, welches in fünffachen Überschuß eingesetzt werden muß. In [42] ist zusätzlich erwähnt, daß die Vergrößerung des Ansatzes (2.6g Produkt) die Ausbeuten verschlechtert. Da zur Darstellung des gewünschten Carotinoids noch mindestens drei Synthesestufen nötig sind (Bromierung, Darstellung des Phosphoniumsalzes, Umsetzung mit Crocetinindialdehyd), wäre es ein zu hoher Arbeitsaufwand das Chlorid **78** in verwendbaren Mengen darzustellen. Die benötigten großen Substanzmengen sind nötig

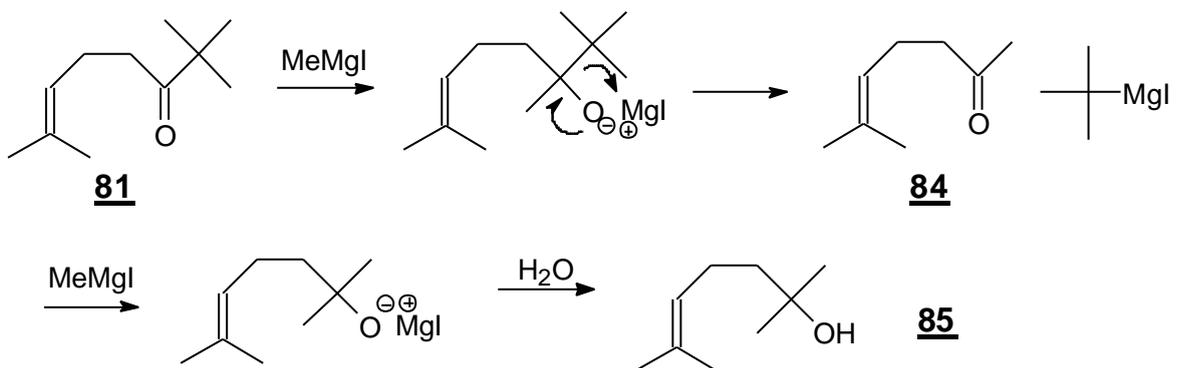
für die vollständige Charakterisierung der antioxidativen Effekte dieser Substanz mit den in unserem Arbeitskreis verwendeten Methoden. Außerdem war es nicht möglich die in der Literatur beschriebenen Ausbeuten bei der Synthese von **78** auch nur im entferntesten zu erreichen.

Zur Umgehung der oben dargestellten Probleme wurde folgende Route erprobt:



**Schema 34:** Versuch der Darstellung des Chlorids **78**

GC/MS und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigen, daß statt der gewünschten Verbindung **82** Verbindung **83** erhalten wurde. Mechanistisch wäre folgende Erklärung möglich:

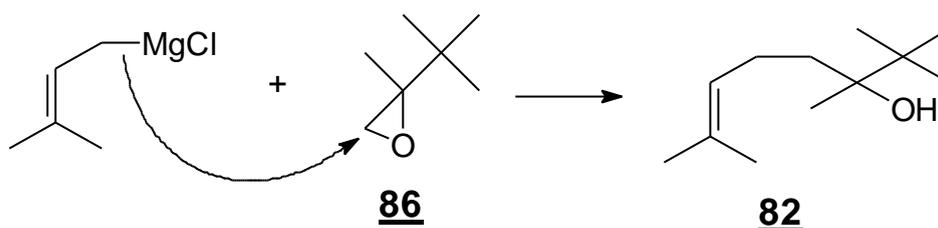


**Schema 35:** Ungewöhnliche Reaktion von **81** mit Methylmagnesiumiodid

Das Intermediat reagiert anscheinend im Sinne einer Retro-Barbier-Reaktion, wobei ein tert.-Butylanion als Abgangsgruppe fungiert. Dies ist in Anbetracht der Reaktanden

erstaunlich. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus wäre die Abspaltung der tert.-Butylgruppe reversibel, die Addition des Methylmagnesiumiods irreversibel. Dies widerspricht den allgemeinen Tendenzen für die Stabilität von Anionen. Man muß aber berücksichtigen, daß die Reaktion nicht über die nackten Anionen, sondern über die entsprechenden Magnesiumiodide verläuft.

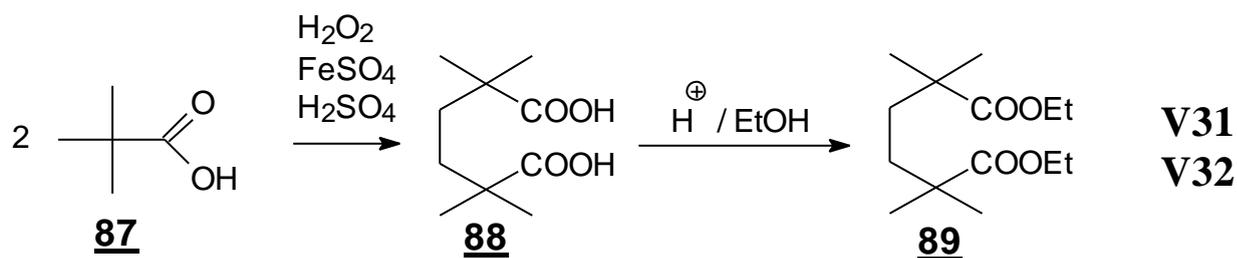
Aufgrund dieser Erfahrungen wurde versucht das Schlüsselintermediat **78** auf einer anderen Route herzustellen:



**Schema 36:** Alternativroute zur Darstellung von **32**

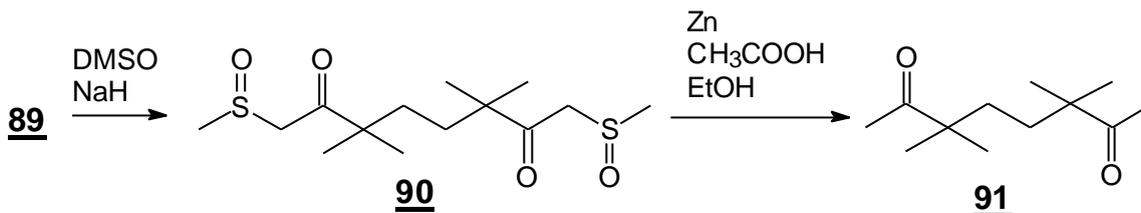
Es wurde versucht, das oben benötigte Epoxid mittels Corey-Chaykowsky-Epoxidierungen mit Schwefelyliden aus **77** zu synthetisieren. Dabei ergaben sich aber nur Ausbeuten von ca. 20% (NMR-Kontrolle). Außerdem war es unmöglich Edukt und Produkt voneinander zu trennen.

Die erfolgreiche Route zur Darstellung des gewünschten Phosphoniumsalzes ist folgende: In den ersten beiden Schritten wurde nach [42] mittels Fentons Reagenz Pivalinsäure dimerisiert und anschließend sauer verestert.



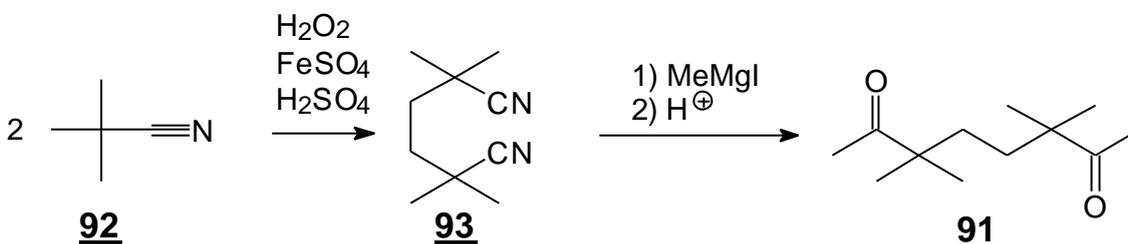
**Schema 37:** Darstellung des Diesters **89**

Der erhaltene Diester **89** wird dann mit Dimethylsulfoxid und Natriumhydrid in 68%iger Ausbeute zum entsprechenden Di-β-oxo-Sulfoxid **90** in Anlehnung an eine Vorschrift von Corey und Chaykowsky umgesetzt und anschließend mit Zink in Eisessig / Ethanol in quantitativer Ausbeute zum Diketon **91** reduziert:

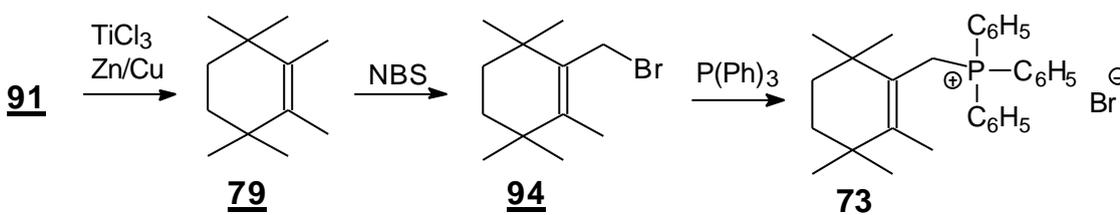
V33-  
V34a**Schema 38:** Darstellung des Diketons 91

Die Ausbeuten bei der Synthese des Di- $\beta$ -oxo-Sulfoxides **90** lassen auch zu wünschen übrig. In 5 Versuchen gelang es nur einmal nach der literaturbekannten Vorschrift die Substanz rein zu isolieren und charakterisieren, wobei die Ausbeute nur 35% betrug. In der Literatur werden für Reaktionen dieser Art Ausbeuten von mindestens 80% angegeben.

Die schließlich verwendete Route verläuft nur noch über drei Stufen, bei denen das Diketon **91** in guten Ausbeuten gewonnen wird. Das Dinitril **93** wird nach [42] synthetisiert, die Grignard-Reaktion zum Keton erfolgt nach einer Variante von [43] in 56%iger Ausbeute:

V35  
V34b**Schema 39:** Alternative Route zur Darstellung von **91**

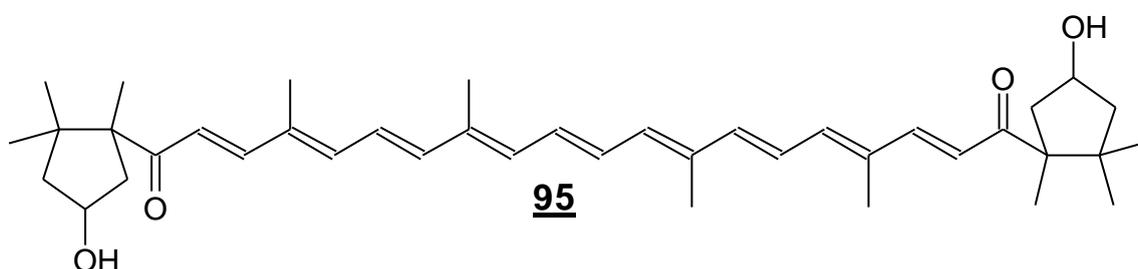
McMurry Cyclisierung [44] mit Titantrichlorid und Zn/Cu Paar, NBS-Bromierung und Umsetzung mit Triphenylphosphin ergeben schließlich das gewünschte Phosphoniumsalz **73**:

V36  
V37**Schema 40:** Darstellung des Phosphoniumsalzes **73**

Dieses kann im Sinne von Schema 31 mit n-Butyllithium in Anlehnung an eine Vorschrift von S. Liaaen Jensen et al. [45] zum gewünschten 4,4,4',4'-Tetramethyl- $\beta$ -Carotin umgesetzt werden. Entsprechende Experimente werden im Augenblick durchgeführt.

### 3.1.3.6. Spezielle Diketone

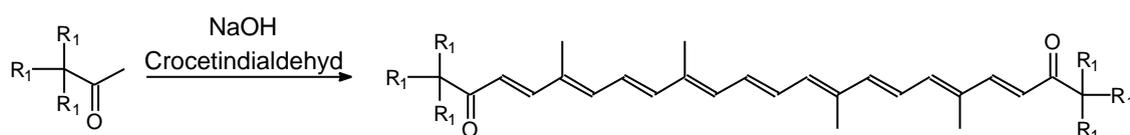
Zur Untersuchung der antioxidativen Effekte des Capsorubins **95** wurden zwei Verbindungen synthetisiert, die nur den Chromophor des Capsorubins beinhalten.



**Abbildung 22:** Struktur von Capsorubin **95**

Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob zur Ketogruppe vicinal stehende Wasserstoffatome einen Einfluß auf das antioxidative Potential der Verbindungen haben. Die Synthese dieser Verbindungen wurde bereits vor 1953 durchgeführt [46].

Die Produkte **96** und **97** entstehen in Ausbeuten von über 80% und lassen sich leicht durch Umkristallisation aus Methanol reinigen:



R1 = H : C26-Diketon (**96**)

R1 = CH3 : C32-Diketon (**97**)

**V38**  
**V39**

**Schema 41:** Synthese der Diketone **96** und **97**

### **3.2. Quantenmechanische Rechnungen**

Zum besseren Verständnis des Mechanismus wurden quantenmechanische Rechenverfahren zur Hilfe genommen um die Interaktion des Sauerstoffs mit den Polyensystemen eingehender zu untersuchen. Die Rechnungen sollten Aufschluß über die Reaktivität von Carotinoiden i.A. und Erklärungen für die starken Unterschiede der antioxidativen Aktivität zwischen reinen Kohlenwasserstoffcarotinoiden und Ketocarotinoiden liefern. Als Modellverbindungen wurden deswegen  $\beta$ -Carotin (bzw. Zeaxanthin) und Astaxanthin ausgewählt, welche die klassischen Vertreter der oben genannten Carotinoidspezies sind.

#### **3.2.1. Kraftfeldrechnungen und semiempirische Verfahren**

Kraftfeldrechnungen basieren auf dem Prinzip von gekoppelten Federpendeln. Dabei werden die Atome des zu berechnenden Moleküls als Massepunkte behandelt, während die Bindungen den Federn entsprechen. Mit Hilfe des Hook'schen Gesetzes kann man nun für jede einzelne dieser Bindungen die Elongation berechnen, bei denen die "Federpendel" einen minimalen Energieinhalt haben. Diese erste Näherung wird durch die Einführung von weiteren Termen im Hook'schen Gesetz, welche Federverbiegungen und die Kopplungen der Federpendel untereinander berücksichtigen, verfeinert. Das dabei erhaltene Ergebnis gibt die Anordnung der Atome untereinander an, bei denen die potentielle Energie und damit die sterischen Wechselwirkungen minimal sein dürften.

Ein für diese Rechnungen verwendbares Computerprogramm ist z.B. das 1973 von Allinger [47] veröffentlichte MMP1 (**M**olecular **M**echanics **P**rogram **1**), welches 1977 unter dem Namen MMP2 ebenfalls von Allinger in einer erweiterten Form präsentiert wurde. Bei diesem Programm wird vor der eigentlichen Kraftfeldrechnung zusätzlich noch eine SCF-MO-Rechnung (**S**elf **C**onsistent **F**ield- **M**olecular **O**rbital) durchgeführt, welche die Orbitalwechselwirkungen der Atome untereinander berücksichtigt und  $\pi$ -Bindungsordnungen erfaßt.

Bei den Rechnungen wurde zunächst das Kraftfeldprogramm MM+ aus dem integrierten Programmpaket Hyperchem© [48] verwendet. Von den zur Auswahl stehenden Parametersätzen wurde der Newton-Raphson-Algorithmus, mit einem RMS-Gradienten von 0.1 gewählt. Da es sich dabei aber nur um reine Kraftfeldrechnungen

handelt, wurden die erhaltenen Ergebnisse als Startgeometrien für PM3-Rechnungen (*Perturbation Modell 3*) verwendet.

PM3-Rechnungen beruhen auf dem Hartree-Fock-Verfahren [49] (MNDO-Niveau): Hierbei handelt es sich prinzipiell um eine quantenmechanische Variationsrechnung für Mehrelektronensysteme. Zur Berechnung wird eine modifizierte Form der Schrödinger-Gleichung [50] verwendet:

$$H_{\text{HF}} \Psi_a(i) = e_a \Psi_a(i)$$

mit  $H_{\text{HF}}$  = Hartree-Fock-Operator

$\Psi_a(i)$  = Hartree-Fock-Orbital des Elektrons  $i$  am Kern  $a$

$e_a$  = Hartree-Fock-Orbitalenergie

### **Gleichung 1:** Hartree-Fock-Gleichung

Der Hartree-Fock-Operator ist ein Hamilton-Operator, welcher die Bewegung eines Elektrons im Feld der Atomkerne und der übrigen Elektronen beschreibt [51].

Da es nicht möglich ist, diese Gleichungen direkt zu lösen, beruht das Verfahren auf einer iterativen Variation von Versuchsfunktionen. Dabei werden die Versuchsfunktionen in die Hartree-Fock-Gleichung eingesetzt und die Ergebnisse berechnet. Von den so erhaltenen Lösungen werden die energetisch niedrigsten zur Bildung eines neuen Hartree-Fock-Operators verwendet. Dieses Verfahren wird solange durchgeführt, bis die erhaltenen Funktionen innerhalb einer vorher festgelegten Grenze invariant bleiben. Dieses Ergebnis ist in sich selbst konsistent [SCF-Methode (*self-consistent field*)].

Für routinemäßige Rechnungen werden zur Lösung der Hartree-Fock-Gleichungen semiempirische Näherungen und Parametersätze verwendet. Diese Verfahren beruhen auf der Vernachlässigung von Integralen. Man bezeichnet sie als NDO (*N*eglect of *D*ifferential *O*verlap) Verfahren. Die bekanntesten Näherungen dieser Art sind:

a) die CNDO-Näherung (*C*omplete *N*eglect of *D*ifferential *O*verlap) [52] : Hierbei werden alle Elektronenwechselwirkungsintegrale außer den Coulombintegralen gleich Null gesetzt.

b) die INDO-Näherung (*I*ntermediate *N*eclect of *D*ifferential *O*verlap) [52]: Bei diesem Verfahren werden gegenüber der CNDO-Näherung die Einzentren-Austauschintegrale mitberücksichtigt.

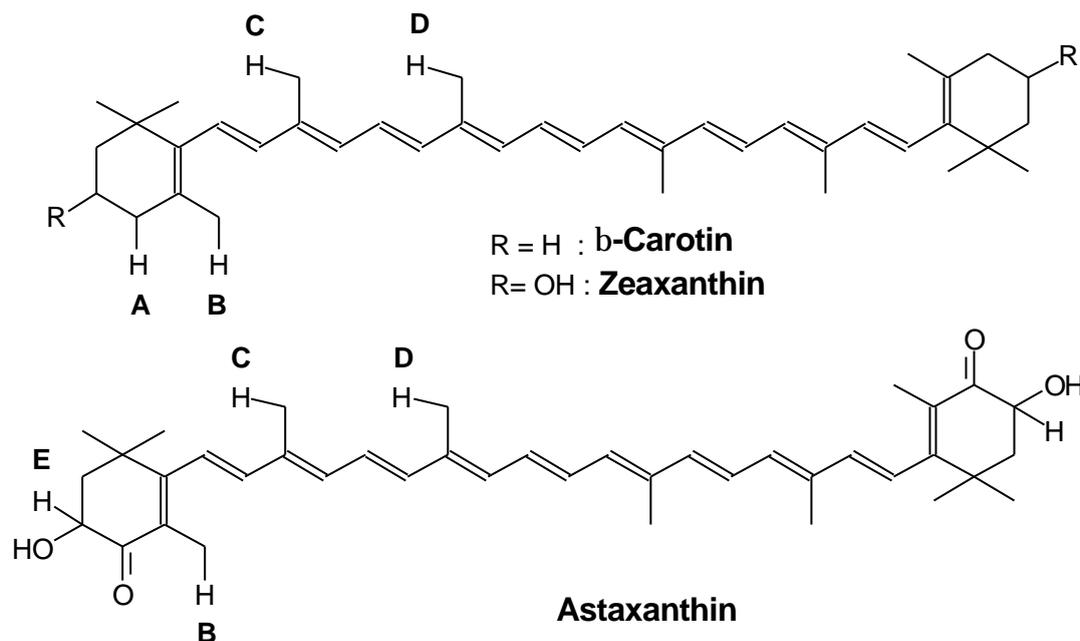
c) die MNDO-Näherung (*M*odified *N*eclect of *D*ifferential *O*verlap) [53]: Bei diesem Verfahren werden alle Zweizentren- und Einzentren-Elektronenwechselwirkungsintegrale und die Rumpfrepulsion berücksichtigt.

Die MNDO-Näherung ist das Standardverfahren für semiempirische Rechnungen. Gewöhnlich verwendet man die Parametersätze AM1 und PM3. Diese Parametersätze liefern i.A. bessere Ergebnisse für die Bildungswärmen der berechneten Moleküle. Bei PM3 wird zusätzlich die Rumpfrepulsion der Atome stärker berücksichtigt, so daß PM3 deswegen und wegen seines größeren und optimierteren Parametersatzes bei Molekülen mit Heteroatomen der AM1-Methode überlegen ist.

### **3.2.2. Interaktion von Carotinoiden mit Sauerstoffradikalen**

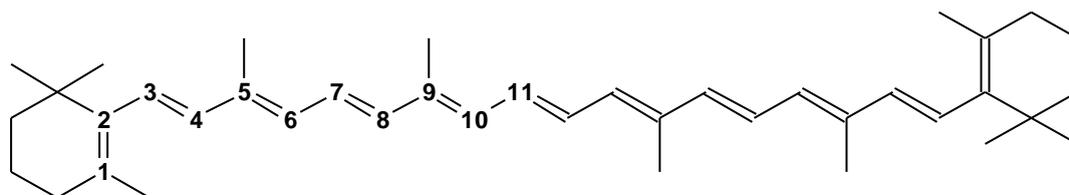
Die Interaktion von carotinoiden Systemen mit Sauerstoff kann a priori in zwei Kategorien eingeteilt werden:

- a) **Abstraktion von Wasserstoffatomen:** Es ist allgemein bekannt, daß die Wahrscheinlichkeit der Abstraktion von Wasserstoffatomen an allyl- bzw. carbonylständigen Kohlenstoffatomen wesentlich leichter ist als von nicht allylischen Wasserstoffatomen. Der Grund dafür liegt in der Möglichkeit der Mesomeriestabilisierung der entstehenden Allylradikale. Verlängerung des Allylsystems bedingt eine weitere Stabilisierung, da sich die Mesomerie über noch größere Bereiche des Moleküls ausdehnen kann. In Abb. 23 sind die bevorzugten Abstraktionspositionen durch explizites Einzeichnen der aktiven Wasserstoffatome gekennzeichnet. Auf Grund der Symmetrie der Verbindungen wurden nur die Wasserstoffatome auf einer Seite des Moleküls gekennzeichnet. Abstraktionen auf der anderen Seite führen zu redundanten Ergebnissen



**Abbildung 23:** potentielle Wasserstoffabstraktionspositionen in  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Astaxanthin (A, B, C, D, E bezeichnen in der Diskussion die entsprechende Position)

**b) Addition an das Polyensystem:** Die Addition von Triplett-Sauerstoff an das Polyensystem ist wahrscheinlich einer der Hauptgründe für die antioxidative Wirkung von Carotinoiden. Diese Addition widerspricht den gängigen Theorien, da es nicht einsichtig ist, daß eine Triplett-Spezies mit einer Singulett-Spezies reagiert. Für die hier durchgeführten Rechnungen ist der Mechanismus dieser Addition nicht entscheidend. Es werden hier nur die Stabilitäten und Elektronendichten durch diese Addition entstandener imaginärer Produkte verglichen. Die folgende Abbildung 24 zeigt die möglichen Angriffspositionen des Sauerstoffs. Die Zahlen repräsentieren die Kohlenstoffatome für welche Rechnungen mit addiertem Sauerstoff durchgeführt wurden. Auch hier wurde bedingt durch die Symmetrie des Moleküls nur eine Seite betrachtet:



**Abbildung 24:** Angriffspositionen für eine Addition von Sauerstoff an  $\beta$ -Carotin

Die Addition von reinem Sauerstoff an das Polyensystem ergibt Moleküle mit zwei ungepaarten Elektronen. Um Probleme in den Rechnungen, welche durch die gebildeten Triplett-Zustände entstehen zu vermeiden, wurde nicht Sauerstoff, sondern Hydroperoxidradikale addiert. Dieses Verfahren ist zulässig, wenn man bedenkt, daß die gewünschten Ergebnisse sich nur auf die Ladungsverteilung in der Polyenkette und Bildungsenergien der entsprechenden Addukte beziehen sollen. Ob die andere Seite des addierten Sauerstoffs ein freies Elektron oder ein Wasserstoffatom enthält dürfte diese Ergebnisse nicht beeinflussen.

### **3.2.3 Durchführung und Ergebnisse der Rechnungen:**

**a) Abstraktion:** Bei der Durchführung der Rechnungen für  $\beta$ -Carotin gelang es nicht die Rechnungen zur Konvergenz zu bewegen. Deswegen wurde versucht eine Modellverbindung zu finden, bei welcher die Rechnungen Konvergenz zeigen und die Ergebnisse mit denen des  $\beta$ -Carotins vergleichbar sind. Die Wahl fiel auf Zeaxanthin. Bei diesem Molekül ergaben sich keine Konvergenzprobleme. Die Reaktivität von Zeaxanthin ist nach [10] praktisch identisch mit der von  $\beta$ -Carotin. Somit kann diese Verbindung Verwendung finden.

Nach Abstraktion der entsprechenden Wasserstoffatome wurden die Geometrien mit Hyperchem<sup>®</sup> voroptimiert (Fletcher-Reeves-Algorithmus, RMS-Gradient = 0.01) und anschließend mit MOPAC auf PM3-Niveau berechnet.

#### **1) Zeaxanthin:**

Abstraktionsposition	Zeaxanthin	Differenzen
Position A	-157.9 KJ/mol	$\Delta_{BA} = 19.7$ KJ/mol
Position B	-138.2 KJ/mol	$\Delta_{CB} = 9.5$ KJ/mol
Position C	-128.7 KJ/mol	$\Delta_{DC} = 3.8$ KJ/mol
Position D	-124.9 KJ/mol	

**Tabelle 1:** Radikalbildungswärmen für Zeaxanthin nach Wasserstoffabstraktion (PM3)

Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen: Beim Zeaxanthin ist die Abstraktion an Position A am stärksten begünstigt, weil dabei zunächst ein sekundäres Radikal

entsteht, welches sich über die gesamte Polykettenlänge delokalisieren kann. Da die Positionen A und B bezüglich ihrer Lage zum Polyensystem als gleichwertig anzusehen sind kann man die Differenz  $\Delta_{AB}$  (19.7 KJ/mol) als den Verlust an Stabilisierungsenergie interpretieren, welcher durch die Radikalbildung an einem primären Kohlenstoffatom erfolgt.

Weiterhin ist klar zu erkennen, daß die relativen Verluste an Stabilisierungsenergie durch die Abstraktion an einem Kohlenstoffatom, welches nur eine kürzerkettige Konjugation als die durch die Abstraktion an A oder B entstehende, ausbilden kann immer geringer werden. D.h. die Abstraktionstendenz an den Positionen C und D ist annähernd gleichwertig und energetisch gesehen wesentlich ungünstiger als an den Positionen A und B.

Damit ist ein deutlicher Hinweis darauf gegeben, daß Wasserstoffabstraktionen, falls sie für den Mechanismus von Bedeutung sind, beim  $\beta$ -Carotin bzw. Zeaxanthin in Position A erfolgen.

## 2) Astaxanthin:

Abstraktionsposition	Astaxanthin	Differenzen
Position B	-338.1 KJ/mol	$\Delta_{CB} = 11.2$ KJ/mol
Position C	-326.9 KJ/mol	$\Delta_{DC} = 3.4$ KJ/mol
Position D	-323.5 KJ/mol	
Position E	-337.9 KJ/mol	

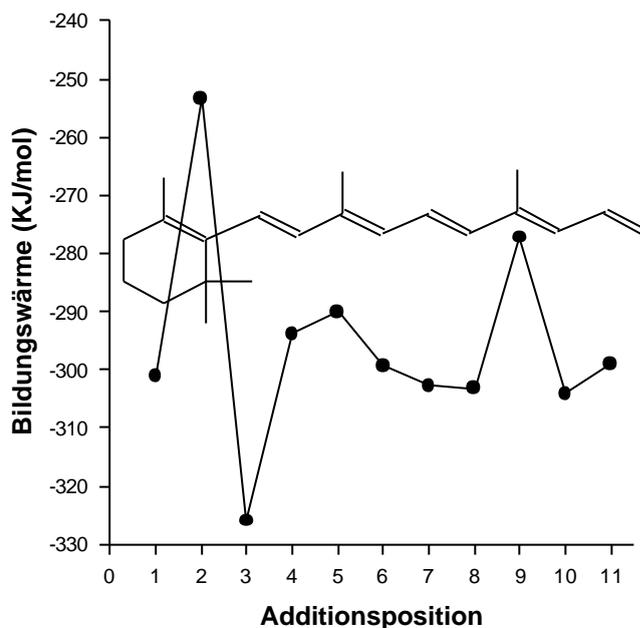
**Tabelle 2:** Radikalbildungswärmen für Astaxanthin nach Wasserstoffabstraktion (PM3)

Die Ergebnisse der Rechnungen für Astaxanthin decken sich im wesentlichen mit den Ergebnissen für das Zeaxanthin. Auch hier sieht man, daß die Abstraktion an Position B gegenüber den anderen Abstraktionsmöglichkeiten begünstigt ist.

Interessant ist bei diesem Molekül, daß die Bildungswärme für ein Radikal mit Wasserstoffabstraktion an Position E in derselben Größenordnung liegt, wie an Position B. Dies zeigt deutlich, daß bei Carotinoiden mit  $\alpha$ -Keto-Wasserstoffatomen ein zweiter Reaktionspfad für Wasserstoffabstraktionsreaktionen eröffnet wird, welcher unabhängig vom Polyensystem existieren kann.

**b1) Addition am Zeaxanthin**

Zur Erstellung der Eingabematrizen wurden die Hydroperoxidradikale orthogonal zu den entsprechenden Molekülen hinzugefügt. Anschließend erfolgten dieselben Vorooptimierungen, welche bereits bei den Additionen verwendet wurden.



**Abbildung 25:** Graphische Auftragung der Bildungswärmen von Radikalen nach Addition von Hydroperoxidradikalen an das Kohlenstoffgerüst von Zeaxanthin.

Die Kohlenstoffatome an welche die Hydroperoxide addiert wurden liegen vertikal zu ihren im Graphen korrelierenden Bildungswärmen

Zur Diskussion der oben dargestellten Ergebnisse werden die Additionspositionen in zwei Gruppen eingeteilt:

**a) sterisch gehinderte Kohlenstoffatome (1, 2, 5 und 9)**

Position 2 ist bei weitem die ungünstigste Additionsposition, da der sich an diesem Kohlenstoffatom befindliche gesättigte Teil des Jonon-Ringes bezüglich seines sterischen Anspruches in die Dimensionen einer tert.-Butylgruppe vordringt. Weiterhin entsteht durch die Addition ein Allylradikal, welches nur über eine Doppelbindung stabilisiert ist. Bei allen anderen Kohlenstoffatomen in dieser Gruppe erfolgt die Allylstabilisierung mindestens über sechs Doppelbindungen. Somit ist es verständlich, daß vom thermodynamischen Standpunkt aus, eine Addition an Position 2 mit Abstand am ungünstigsten anzusehen ist, was sich durch die geringste Bildungswärme aller in dieser Serie gerechneter Moleküle bemerkbar macht.

Die Positionen 5 und 9 stellen lokale Maxima im Graphen dar, was durch die sterische Abstoßung der Methylgruppen an diesen Kohlenstoffatomen erklärbar ist.

Position 1 ist ein Sonderfall. Zwar liegt hier auch wieder die sterische Abstoßung der Methylgruppe vor, die Stabilisierung des entstehenden Radikals ist aber durch die 10 konjugierten Doppelbindungen maximal. Das durch Angriff auf diese Position entstehende Radikal besitzt von allen sterisch gehinderten den geringsten Energieinhalt. Es liegt also die Schlußfolgerung nahe, daß ein Angriff in dieser Position am wahrscheinlichsten ist. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen von z.B. Mordí [54], welcher die Epoxidierung des  $\beta$ -Jonon-Ringes als primäre Hauptreaktion formulierte.

#### **b) Sterisch ungehinderte Kohlenstoffatome (3,4,6,7,8,10,11)**

Additionen an diese Positionen führen zu sterisch relativ ungehinderten Produkten. Hier liegt eine mögliche Erklärung für den beobachteten Abbau der Carotinoide in die entsprechenden Apo-Verbindungen. Die Position 3 scheint dabei besonders begünstigt zu sein. Eine Addition an dieser Position wäre damit am wahrscheinlichsten. Dieses Ergebnis widerspricht aber der gesamten Literatur. Dort spielt die Position 3 eine, wenn überhaupt, untergeordnete Rolle.

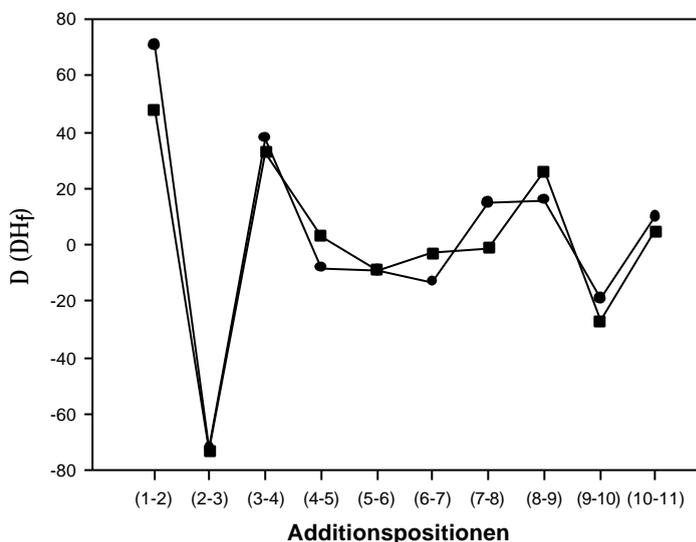
Allgemein liegen die Ergebnisse für die Produkte aus Reaktionen mit sterisch ungehinderten Positionen deutlich niedriger als bei den sterisch anspruchsvolleren, obwohl die entstehenden Produkte an Positionen angreifen, bei denen die Möglichkeit zur Mesomeriestabilisierung des Produktes deutlich herabgesetzt ist, da sich das Radikal immer auf der kürzeren Seite des Polyensystems ausbildet. Das Rechenverfahren bewertet also den sterischen Faktor zu stark. Dadurch sind die Unstimmigkeiten mit experimentellen Daten zu erklären.

Trotz dieser Verzerrungen ist die Tendenz zu erkennen, daß die Position 1, trotz ihrer sterischen Hinderung eine potentiell hervorragende Additionsposition ist. Sie liefert die niedrigste Energie aller sterisch anspruchsvolleren Positionen und würde, bei Abschwächung der Berücksichtigung sterischer Faktoren noch tiefer liegen.

#### **b2) Addition am Astaxanthin**

Wenn man die relativen Veränderungen in den Bildungswärmen beim Durchlauf durch die Kette betrachtet sind die Ergebnisse für Astaxanthin und Zeaxanthin sehr ähnlich. Die Änderungen der Bildungswärmen beider Moleküle liegen quantitativ in denselben

Bereichen. Dies heißt, daß die für Zeaxanthin getroffenen Aussagen auch auf Astaxanthin zutreffen. Das bedeutet, daß die Rechnungen für die Addition keinen Aufschluß über die Unterschiede in den Reaktivitäten der beiden Verbindungen geben.



**Abbildung 26:** Relative Veränderungen in den Bildungswärmen.

Auf der Abszisse sind die Paare der Additionspositionen angegeben von welchen für den jeweiligen Ordinatenwert Differenzen gebildet wurden

Ein Ziel dieser Rechnungen war es auch nachzuweisen, ob die Addition eines Radikals an Astaxanthin zu einer besonderen, durch die Carbonylgruppe bedingten, Stabilisierung der Produkte führt, welche dann die hohe Stabilität und bessere antioxidative Wirkung von Astaxanthin relativ zu  $\beta$ -Carotin erklären könnte. Dazu wurden zunächst Rechnungen zur Bestimmung der Bildungswärme der Ausgangsverbindungen gemacht. Man erhält für Zeaxanthin eine Bildungswärme von -113 KJ/mol und für Astaxanthin -407 KJ/mol. Für das Produkt der Addition eines Hydroperoxidradikals an Position 1 ergeben sich Bildungswärmen von -301 KJ/mol (Zeaxanthin) und -516KJ/mol (Astaxanthin). Da beide Moleküle in gleicher Art modifiziert wurden, kann man die Ergebnisse auch direkt miteinander vergleichen: Der relative Energieverlust durch die Adduktbildung ist beim Zeaxanthin deutlich geringer als beim Astaxanthin. Damit wären die Produkte des Zeaxanthins besser stabilisiert. Dies widerspricht der Grundthese, daß Carbonylgruppen zur Adduktstabilisierung einen zusätzlichen Beitrag liefern. Damit wäre gezeigt, daß entweder die Rechenverfahren nicht zur Beantwortung des Problems hinzugezogen werden können oder daß der Unterschied im antioxidativen Verhalten der beiden Verbindungen andere Gründe haben muß.

### 3.3. Quantitative Bestimmungsmethoden für Peroxidgehalte

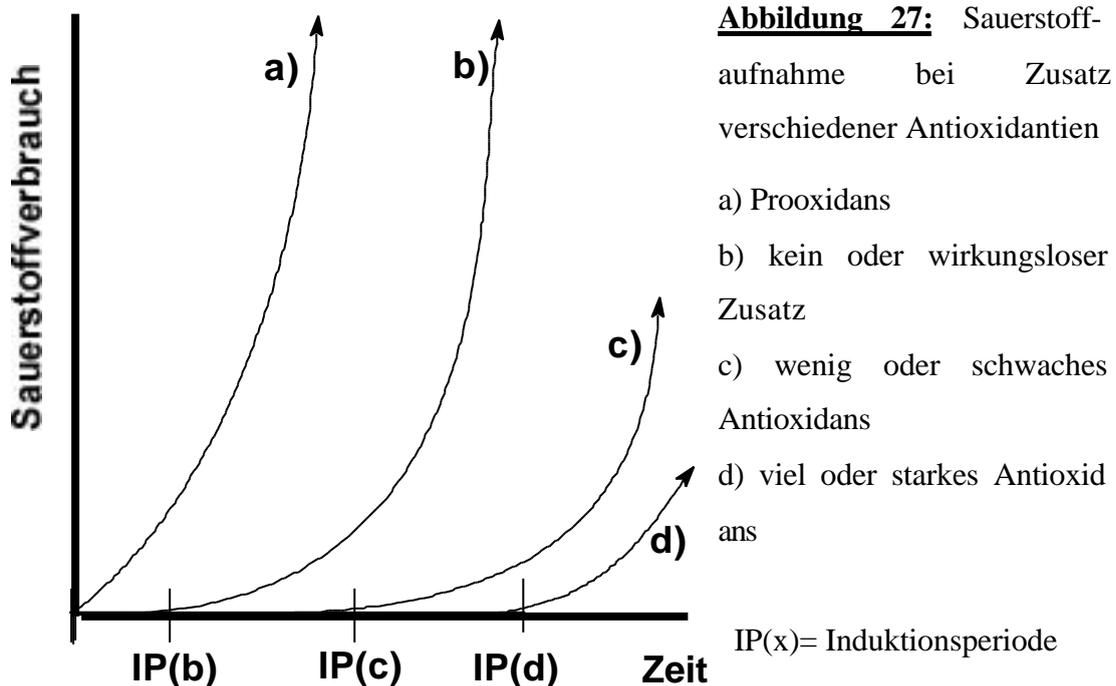
Da die quantitative Bestimmung des Wirkungsgrades von Antioxidantien sowohl in der Technik, als auch in physiologischen Systemen ein wichtiges Verfahren darstellt, gibt es viele Methoden für diese Bestimmungen. Diese können grob in folgende Kategorien eingeteilt werden:

**a) direkte Methoden:** hier sind der Sauerstoffverbrauch oder die Menge des gebildeten Peroxides die Meßgrößen

**b) indirekte Methoden:** hier werden die Abbauprodukte des zu schützenden Substrates quantitativ bestimmt und daraus Rückschlüsse auf die Reaktivität des Substrates gegenüber Sauerstoff in Gegenwart des Antioxidans gezogen

#### 3.3.1 Messung des Sauerstoffverbrauchs

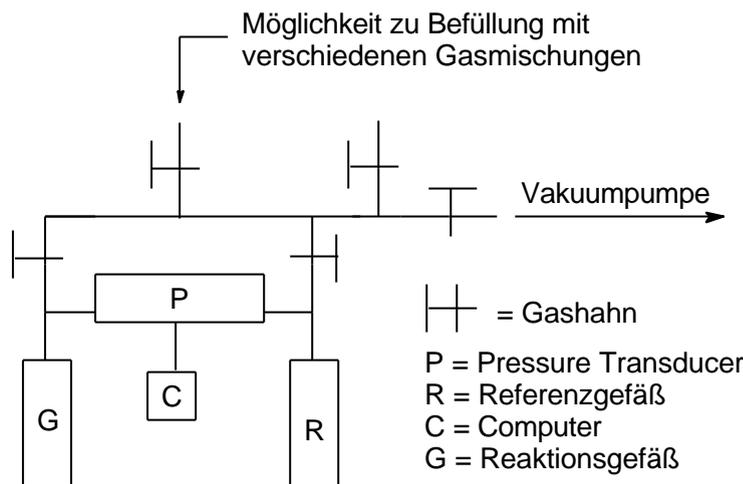
Die Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften einer Substanz wird mit der Menge des während der Reaktion aufgenommenen Sauerstoffs korreliert [17]:



Diese Methode geht von der Annahme aus, daß der Sauerstoff nur durch das zu schützende Substrat aufgenommen wird. Prooxidation bedeutet, daß die Zugabe einer Substanz die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation erhöht bzw. die Induktionsperiode verkürzt. Bei diesem Verfahren wird also die Güte eines Antioxidans

mit der Verlängerung der Induktionsperiode direkt in Verbindung gebracht. Graph b) ist dabei die Referenzmessung.

Apparativ wird dieses Verfahren z.B. in den Untersuchungen von Burton und Ingold [7] oder C. Ruck [11] und S. Frixel [55] angewendet. Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme wird mit Hilfe eines Pressure Transducers vorgenommen. Vom Aufbau her ist die Apparatur folgendermaßen konzipiert:



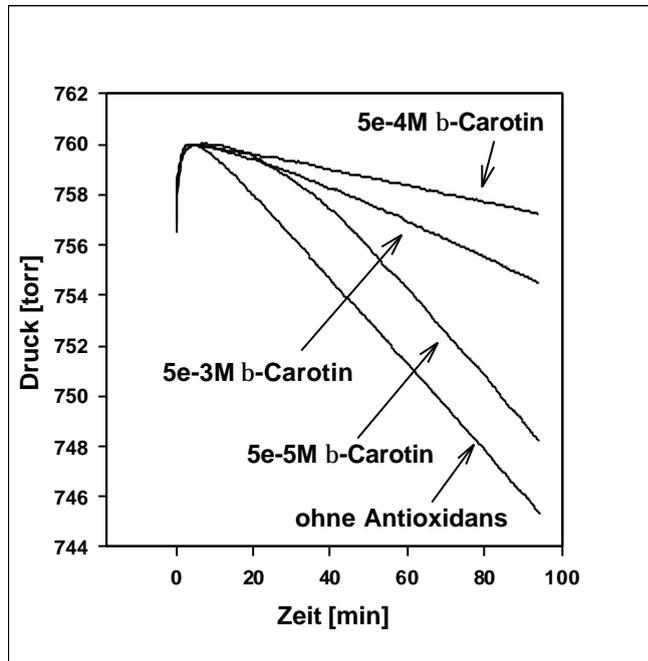
**Abbildung 28:** Meßapparatur zur Bestimmung des Gasverbrauches einer Reaktion nach Ruck, Schmidt und R. Walsh [21]

Das Reaktionsgefäß wird mit der zu untersuchenden Substanzmischung gefüllt, mit der gewünschten Gasmischung geflutet und mittels eines Hahn abgedichtet. In das Reaktionsgefäß wird nur die Gasmischung gegeben. Der Pressure Transducer mißt die Druckdifferenz zwischen Reaktionsgefäß und Referenzgefäß. Sobald im Reaktionsgefäß Sauerstoff verbraucht wird, ändert sich dort der Druck. Diese Änderung wird von dem angeschlossenen Computer in variablen Abständen registriert. Aus diesen Daten kann man Druck/Zeit-Kurven aufnehmen.

Da die Einzelvolumina der Komponenten der Apparatur bekannt sind, kann man aus der Druckdifferenz direkt den Sauerstoffverbrauch ausrechnen. Dabei ergeben sich Meßkurven von folgendem Verlauf (Abb. 29): Der Druck im Reaktionsgefäß steigt zunächst leicht an und stabilisiert sich zunächst nach 5-10 Minuten. Dies liegt daran, daß die Messungen bei 30°C durchgeführt wurden und Teile des verwendeten Lösungsmittels durch die erhöhte Temperatur in die Gasphase übergehen.

Anschließend beobachtet man verschieden starke Abfälle im Druck. Der Sauerstoff wird als mehr oder minder stark verbraucht. Eine Substanz oder eine Konzentration des Antioxidans bei der dieser Druckabfall eine geringere Steigung hat als bei der Messung mit reinem Cumol wird als antioxidativ bezeichnet. Hier zeigt sich auch, daß die

Zugabe von  $\beta$ -Carotin in hohen Konzentrationen den Druck im Reaktionsgefäß stärker abfallen läßt, als bei geringeren Konzentrationen. Dieser Effekt wurde bereits von Burton und Ingold [7] beobachtet und einem prooxidativen Verhalten zugeschrieben



**Abbildung 29:** Autoxidation des Cumols und antioxidative Effekte von  $\beta$ -Carotin. [21]

Die Ergebnisse dieser Methode müssen besonders kritisch betrachtet werden. Es ist nämlich möglich, daß das zugegebene Antioxidans, z.B.  $\beta$ -Carotin, selber Sauerstoff verbraucht. Bei höheren Konzentrationen kann dies dazu führen, daß der Verbrauch so groß wird, daß ein prooxidatives Verhalten des Substrates nur vorgetäuscht wird. Deswegen ist es nötig, diese Methode immer in Kombination mit einem Verfahren zu verwenden bei dem die tatsächliche Menge des gebildeten Peroxides bestimmt wird. Ein solches Verfahren ist z.B. 3.3.2.

### **3.3.2. Messung der Peroxidbildung**

Die direkte Messung des Peroxidgehaltes mittels HPLC-DA-Detektion ist mit vielen Vorteilen verbunden: Das Reaktionssystem kann direkt unbehandelt und zügig untersucht werden und ist relativ unabhängig von Substrat und Natur des verwendeten Antioxidans. Die dabei mögliche Messfrequenz liegt nach eigenen Untersuchungen bei ca. 1 Meßpunkt/10-15 min.

Durch Eichgeraden mit bekannten Substanzen ist es z.B. möglich, bei der Verwendung von Methylinoleat den Peroxidgehalt bis auf 0.01% genau zu quantifizieren.

Es sind keine naßchemischen Aufarbeitungsmethoden oder Umsetzungen nötig, welche systematische Fehler verursachen können. Naßchemisch vorgeschaltete Reaktionsschritte müssen zur Bestimmung des Peroxidgehaltes grundsätzlich quantitativ ablaufen. Dies ist nicht immer gewährleistet. Außerdem können Nebenreaktionen, wie z.B. die Peroxidbildung des Antioxidans, die Untersuchungsergebnisse verfälschen. Deswegen muß bei jeder Messung mit einem neuen Antioxidans oder Substrat eine genaue Analyse der möglichen Nebenreaktionen durchgeführt werden.

Weiterhin werden die Peroxide bei der HPLC-DAD-Methode keinen thermischen Belastungen unterworfen. Diese können durch die Zersetzung der Substanzen auch systematische Fehler hervorrufen. Dieses Problem kann bei der Verwendung von quantitativer GC/MS-Analytik auftreten.

Darüber hinaus besitzt die HPLC-DAD-Methode den Vorteil, daß man bei geeigneten Substanzen noch zusätzliche Parameter, wie Abbau des Antioxidans oder Zersetzung des Peroxides, im Reaktionssystem direkt beobachten und quantifizieren kann.

Für die Substanzklasse der Carotinoide als Antioxidantien bei der Peroxidation des Methylinoleates gibt es für die HPLC-Bedingungen sehr genaue Parameter von Terao [7]. Diese wurden in dieser Arbeit zunächst verwendet und für die Peroxidation des Cumols entsprechend modifiziert. Die genauen experimentellen Bedingungen werden im gesamten Kapitel 3.4. diskutiert.

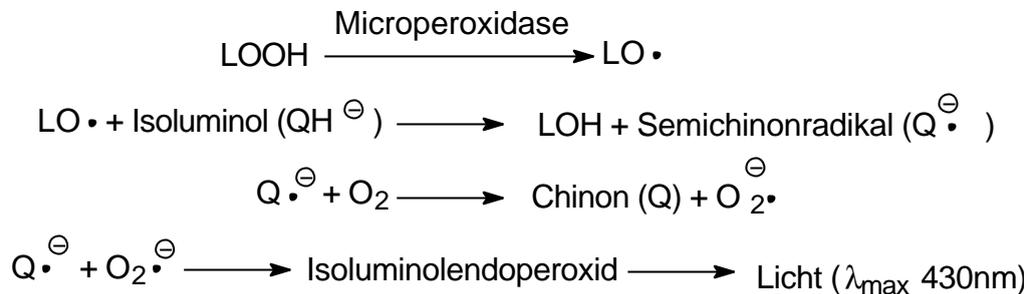
### **3.3.3 Indirekte Methoden**

Diese Verfahren werden meistens bei der Untersuchung von in vivo Systemen verwendet. Da z.B. die untersuchten Fettsäuren im untersuchten biologischen System gebunden sind, ist es nicht möglich, diese einfach mittels HPLC zu untersuchen. Deswegen muß man auf Methoden zurückgreifen, bei denen der Peroxidgehalt indirekt bestimmt wird. Dafür gibt es viele Verfahren, von denen hier nur die wichtigsten kurz besprochen werden sollen:

#### **1) HPLC-Bestimmung mit Chemilumineszenzdetektoren**

Dieses Verfahren eignet sich sehr gut für biologische Systeme, da die Quantifizierung schon auf picomolarem Level durchgeführt werden kann [56] [57]. Damit ist z.B. die Möglichkeit für die Untersuchung von menschlichem Blutplasma gewährt. Die

effektive Meßgröße ist die emittierte Lichtmenge einer chemilumineszenten Reaktion. Schematisch laufen bei dieser Bestimmung folgende Vorgänge ab:



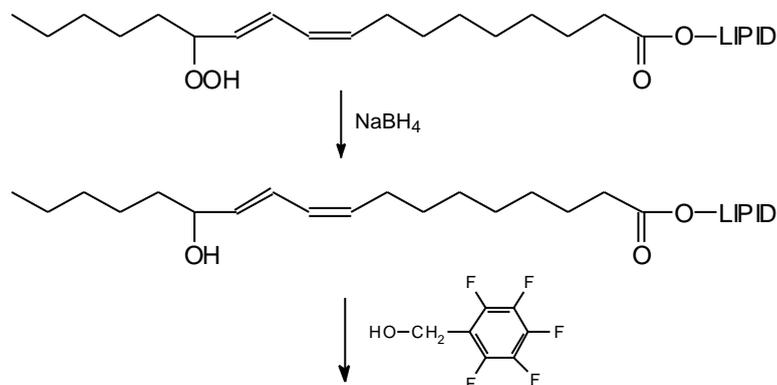
**Schema 42:** Peroxidbestimmung über Chemilumineszenz (nach [58])

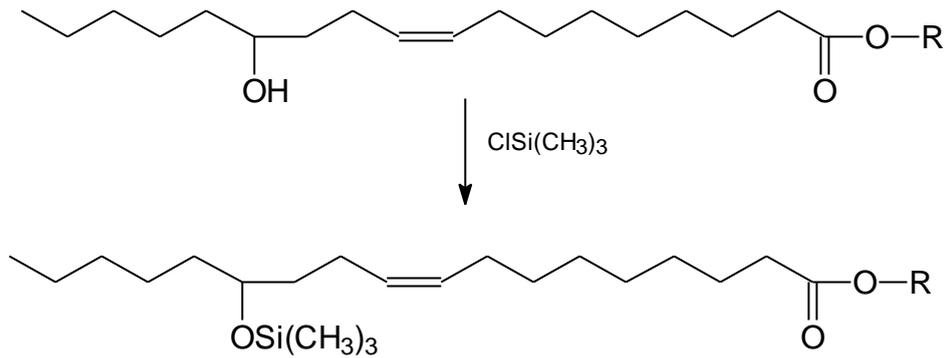
Nach Y. Yamamoto et. al. verwendet man Isoluminol, da sich dort ein besseres Signal/Rausch Verhältnis als beim Luminol einstellt [58].

Die Grenzen dieser Methode liegen bei Systemen, in denen Ascorbinsäurederivate, Endoperoxide, Aldehyde und Chinone auftreten, da dort entweder als Nebenreaktion Wasserstoffperoxid entsteht (Ascorbinsäure), welches auch über die Chemolumineszenzmethode indirekt registriert wird oder die gebildeten Peroxide nicht mit der Microperoxidase reagieren (z.B. Endoperoxide). [59]

## 2) GC/MS-Detektion

Für die quantitative Bestimmung von Peroxiden in den Fettsäuren von Phospholipiden und Triglyceriden gibt es eine von Hughes et al. vorgestellte Methode, bei der die Fettsäuren nach enzymatischer Spaltung der Esterbindungen und mehreren Reinigungsschritten quantitativ über GC/MS bestimmt wurden [60]. Eine Verfeinerung nach van Kuijk et al. dieser Methode findet man in [61]. Dort wird auch direkt angemerkt, daß sie nicht bei freien Fettsäuren biologischer Systeme anwendbar ist, da der Schlüsselschritt über eine Umesterung verläuft:



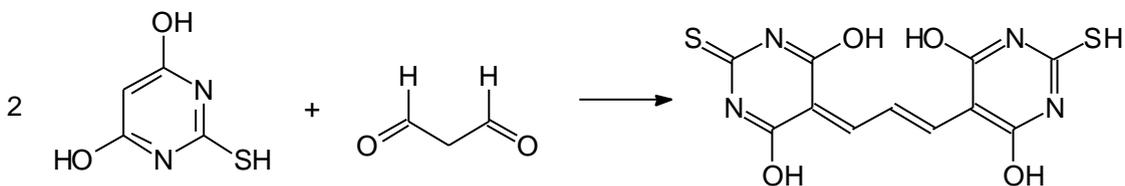


**Schema 43:** Vorbereitung eines Lipidperoxides für die GC/MS-Methode nach [61]  
(R = CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)

Hier zeigen sich deutlich die Nachteile der Methode. Zur Quantifizierung über GC/MS sind viele nachchemische Schritte nötig. Die Exaktheit dieser Methode steht und fällt mit dem quantitativen Verlauf dieser Reaktionen. Außerdem wird versucht, die Peroxidation vor der Aufarbeitung mit BHT zum Stillstand zu bringen. Dies geschieht unter der Prämisse, daß BHT in hohen Konzentrationen nicht als Prooxidans wirkt.

### **3) Bestimmung von aldehydischen Abbauprodukten mittel Thiobarbitursäure**

Diese Methode ist wahrscheinlich die gängigste zur Quantifizierung von Peroxidationen. Sie beruht darauf, daß das Hauptprodukt bei der Metabolisierung von Lipidperoxiden der Malondialdehyd ist. Dieser reagiert mit zwei Äquivalenten Thiobarbitursäure zu einem roten Farbstoff mit einem Extinktionsmaximum bei 532-535nm [62]:



**Schema 44:** Bildung des roten Thiooxonolfarbstoffes

Diese Substanz kann entweder photometrisch oder über Fluoreszenzmessungen quantitativ bestimmt werden. Der Test funktioniert selbstverständlich nur, wenn keines der möglichen Nebenprodukte in der Reaktion im Bereich des gebildeten Farbstoffes

absorbiert, oder selbst mit der Thiobarbitursäure reagieren kann. Andere Verfahren zur Bestimmung des Malondialdehydanteils sind die Direktbestimmung mittels HPLC oder die Bildung des Dinitrophenylhydrazons und anschließende photometrische Bestimmung des Produktes [62].

Bei allen diesen Methoden muß man mit indirekt erhaltenen Ergebnissen arbeiten. Außerdem verwischen auch hier die verwendeten naßchemischen Aufarbeitungsmethoden die Aussagekraft der Experimente. Deswegen sind diese Methoden nicht unumstritten, da der Malondialdehyd darüber hinaus auch als Artefakt der Analyse oder als Produkt von nicht näher geklärten Enzymreaktionen betrachtet werden kann [63].

#### **4) weitere Methoden:**

Diese sollen hier nur kurz genannt werden, nähere Informationen findet man in [64]: Redoxreaktionen mit Eisenionen, Reaktionen mit Cyclooxygenase, Bestimmung der Phospholipidhydroperoxidglutathionperoxidase (PHGPX).

### **3.3.4. Verwendete Meßmethoden und Substrate**

Von den verschiedenen Verfahren zur Messung antioxidativer Effekte, welche im letzten Kapitel besprochen wurden, erschienen die Methoden von Terao [10] und Burton und Ingold [7] am praktikabelsten und zuverlässigsten. Prinzipiell basieren alle Methoden auf folgendem allgemeinen Prinzip:

Ein beliebiges gegen Autoxidation möglichst empfindliches Substrat wird in Gegenwart von Sauerstoff und einem Radikalstarter zur Reaktion gebracht. Die entstehenden Mengen an Peroxid werden bestimmt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Gibt man nun pro- oder antioxidative Wirkstoffe hinzu, so verändert sich die Menge des entstehenden Peroxides pro Zeiteinheit. Dieser Wert ist die entscheidende Meßgröße.

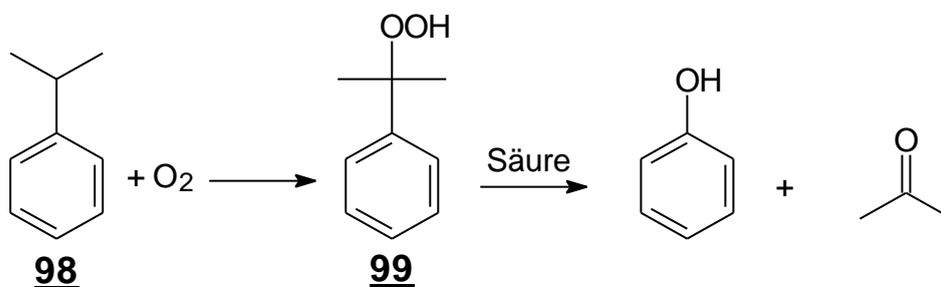
Deshalb ist es am praktischsten, ein Verfahren zu benutzen, welches die Peroxidmengen direkt und schnell quantifizieren kann. Die Methode der Wahl ist die chromatographische Untersuchung des rohen Reaktionsgemisches mittels HPLC. Die Detektion der Einzelkomponenten erfolgt zweckmäßigerweise über einen DAD. Dies kommt den zu untersuchenden Antioxidantien entgegen, da carotinoide Systeme farbig sind und somit gut über ihr UV/Vis-Spektrum nachgewiesen und quantitativ bestimmt

werden können. Die Fehlerbreiten solcher Geräte liegen gewöhnlich unter 1% und die Bestimmung der Peroxidmengen ist innerhalb weniger Minuten möglich.

Ein Teilziel dieser Dissertation war es dieses, von Terao [10] beschriebene Verfahren trotz fehlender genauer Reaktionsparameter zu reproduzieren, verifizieren und verfeinern, damit es als Standardmethode etabliert werden kann. Als Substrate für die Addition von Sauerstoff wurden Cumol und Methyllinoleat verwendet:

#### **a) Peroxidation von Cumol [65]**

Cumol besitzt hohe wirtschaftliche Bedeutung, denn es ist das Ausgangsprodukt der Hock'schen Phenolsynthese von 1944. In diesem heute noch wichtigen großtechnischen Prozeß werden aus Cumol **98** über dessen Peroxid **99** Phenol und Aceton gewonnen:



#### **Schema 45:** Hock'sche Phenolsynthese

Die Reaktion wird in Großraumreaktoren bei 90-120°C und Drücken von 0.5-07 MPa durchgeführt. Die Spaltung zu den Produkten kann sowohl in homogener, als auch in heterogener Phase mit Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Perchlorsäure durchgeführt werden.

Die Peroxidation selber verläuft autokatalytisch. Dieser Effekt wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten Messungen nicht gefunden. Dies liegt daran, daß nur ein kleiner Teil des Cumols peroxidiert wurde. Der dabei auftretende autokatalytische Effekt ist so minimal, daß er innerhalb der Grenze des systematischen Fehlers liegt.

#### **b1) Fettsäuren**

Die Fettsäuren sind ein wichtiges Modellsubstrat für die Untersuchung, da gerade diese Verbindungen in biologischen Systemen häufig auftreten und ihre

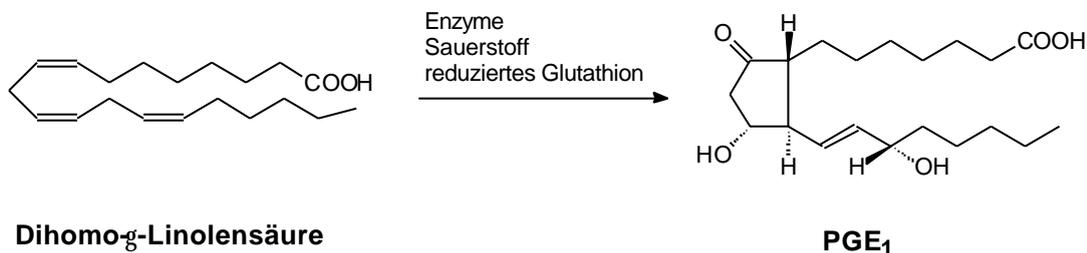
Peroxidationsprodukte unerwünschte Nebenreaktionen in diesen Systemen verursachen können.

Allgemein handelt es sich bei dieser Substanzklasse um langkettige Carbonsäuren von denen die 16-20 kettigen die höchste biologische Bedeutung haben. Diese werden dann noch einmal in verzweigt und unverzweigt bzw. gesättigt und ungesättigt unterteilt.

Die Fettsäuren treten in gesunden Organismen immer als Phospholipide oder Glyceride auf. Ungebundene Fettsäuren sind Artefakte von geschädigten Zellen und schädlich für den Organismus, da die Fettsäuren eine hohe Affinität zu Enzymen haben und sie blockieren können.

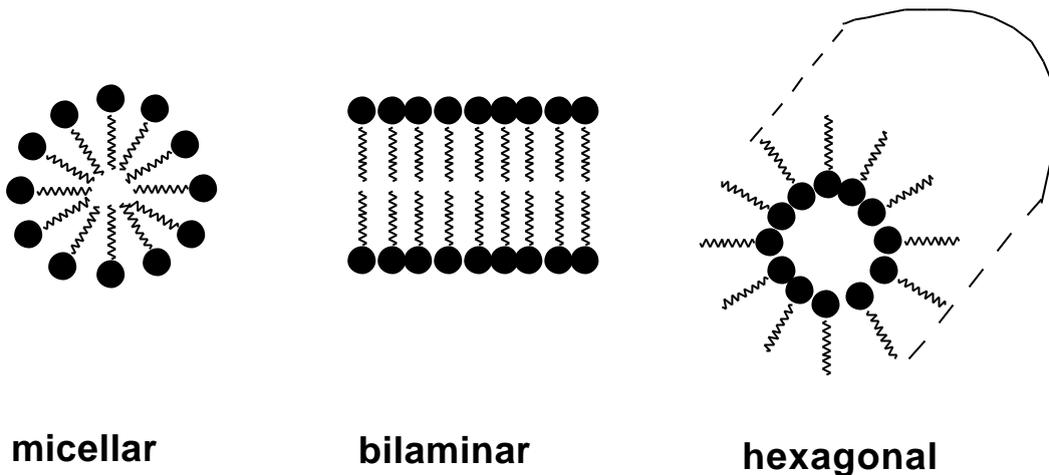
Die enorme Wichtigkeit der Fettsäuren wurde bereits 1930 von G.O. Burr und M.M. Burr nachgewiesen [66]. Sie zeigten, daß das Abschneiden der Zufuhr von bestimmten Fettsäuren durch die Nahrungskette bei Ratten zu Herz- und Gefäßkrankheiten führt. Diese Grundlagenforschung führte dann 1930 zur Entdeckung der Prostaglandine [67].

Prostaglandine sind Cyclisierungsprodukte der ungesättigten Fettsäuren. Sie besitzen enorme Bedeutung in der Regulation der Muskelstimulation und des Blutdrucks.



**Schema 46:** Bildung eines Prostaglandins (PGE<sub>1</sub>)

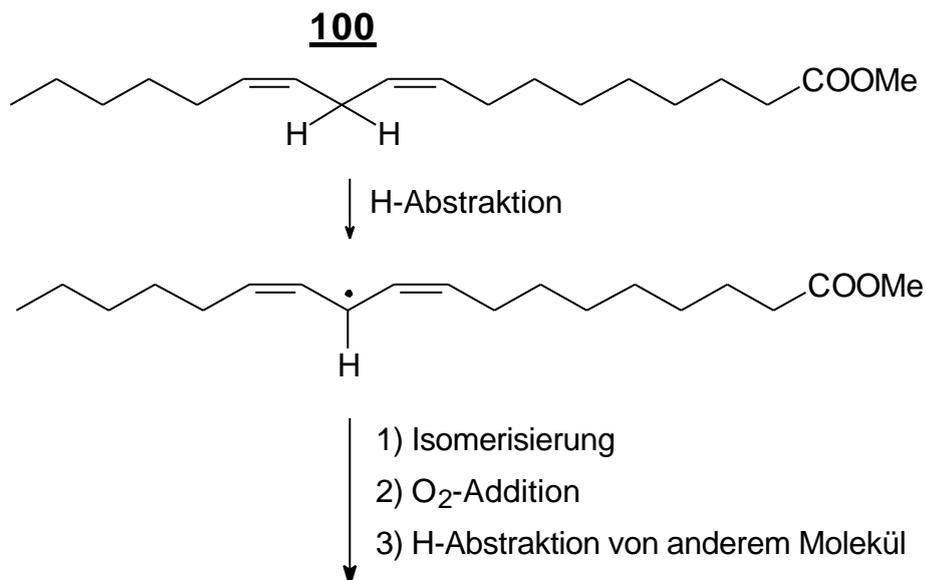
Die zweite genauso wichtige Aufgabe der Fettsäuren ist die Bildung von Biomembranen. Die Lipide sind amphiphil, sie bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette. In wässrigen Medien wird die Kette abgestoßen und die Kopfgruppe wendet sich dem Lösungsmittel zu. Darum neigen die Lipide zu Mizellenbildung. Da die langen Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide im Inneren von Mizellen keinen Platz finden, ordnen sich diese in Doppelschichten an:

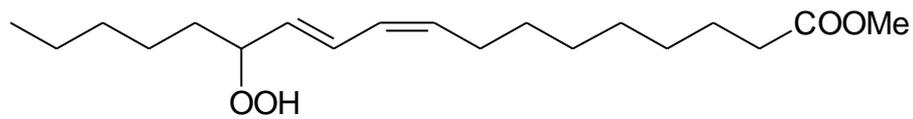
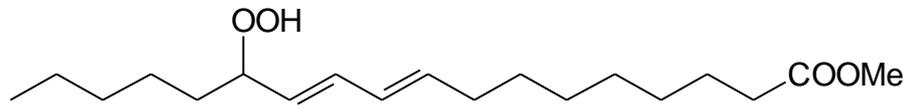
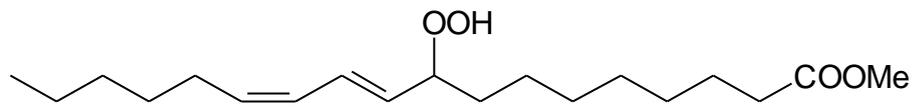
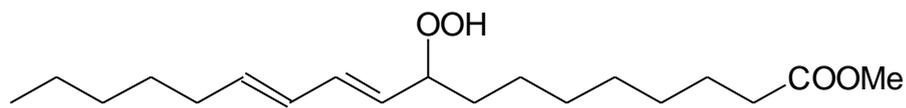


**Abbildung 30:** Anordnungen von Lipiden in Membranen [68]

Die hydrophoben Wechselwirkungen bewirken, daß die Ausbildung der Doppelschichten spontan verläuft, man spricht dabei von "Selbstorganisation". Diese Doppelschichten bilden dann Permeabilitätsbarrieren zwischen den Zellen und deren Bestandteilen. Solche Anordnungen sind Membranen.

**b2) Methyllinoleat:** Die Linolsäure ist eine der wichtigsten Fettsäuren. Die doppelt aktivierte Allylposition dieser Verbindung bedingt aber auch, daß sie sehr empfindlich gegenüber Peroxidationen ist. Mechanistisch laufen dabei folgende Prozesse für den Methylester **100** ab:



*cis-9, trans-11**trans-9, trans-11**trans-10, cis-12**trans-10, trans-12***Schema 47:** Peroxidation des Methylinoleates **100**

Gewöhnlich werden nur Wasserstoffatome der zentralen Allylposition abstrahiert, da das Molekül sehr leicht über eine Allylumlagerung ein Peroxid mit einer konjugierten Doppelbindung ausbilden kann. Die anderen möglichen Produkte spielen, wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle.[69]

Methylinoleat ist wegen der hohen Biorelevanz eine der am besten untersuchten Fettsäuren in der Lipidperoxidation und wird oft zur Untersuchung des Mechanismus der Lipidperoxidation verwendet.

### **3.4. Ausarbeitung des Meßverfahrens**

Da, wie bereits oben erwähnt, die Bestimmung der Hydroperoxide mittels HPLC die exakteste und eleganteste Methode zur Lösung der bestehenden Problematik darstellt, wurde ein Verfahren entwickelt mit dem die Messung antioxidativer Effekte zur Routine wird. Die Konzentrationen der untersuchten Systeme basieren auf den Ergebnissen von Terao [10], Burton und Ingold [7] bzw. Ruck [11].

#### **3.4.1. Substanzen, Lösungsmittel und Konzentrationen:**

Die Meßmethodik erfolgt in Anlehnung an Terao [10], wurde aber verfeinert und modifiziert.

##### **a) Methyllinoleat:**

Zur Bestimmung der Hydroperoxide des Methyllinoleates wurden drei Maßlösungen angesetzt, eine 0.1M Lösung Methyllinoleat in Hexan/Isopropanol (1:1, v:v), eine 0.1M Lösung von AMVN in Hexan und eine 5mM Lösung des entsprechenden Antioxidans in Chloroform. Hier findet man die erste Modifikation des Verfahrens von [10]. Dort wurden die Antioxidantien in Tetrahydrofuran gelöst. Diese Lösungsmittel beinhaltet jedoch zwei Schwachpunkte:

- 1) Tetrahydrofuran bildet selbst leicht Peroxide und wirkt somit auch als Anti- oder Prooxidansreagenz . Diese Reaktivität kann die beobachtete Reaktion beeinflussen.
- 2) Bestimmte Carotinoide (z.B. Actinioerythrol) lassen sich nur in halogenierten Lösungsmitteln in zufriedenstellenden Mengen lösen.

Deswegen wurde in den hier präsentierten Messungen ausschließlich Chloroform als Lösungsmittel für die Reinsubstanzen verwendet.

Die oben genannten Lösungen wurden im Verhältnis 5:0.5:1 (v:v:v) gemischt. Damit ergeben sich unter Vernachlässigung eventueller Volumenkontraktionen Konzentrationsverhältnisse von 77mM Methyllinoleat, 7.7 mM AMVN und 0.77 mM Antioxidant. Das Probenvolumen der Einzelmessungen betrug 6.5ml.

##### **b) Cumol:**

Bei dieser Meßreihe wurde reines Cumol mit einer 0.45M Lösung von AMVN in Chlorbenzol und einer Lösung des Antioxidans in Chlorbenzol mit variabler

Konzentration von 0.5mM – 5mM im Verhältnis 10:2:8 (v:v:v) gemischt. Damit ergeben sich Konzentrationsverhältnisse von 3.6M Cumol, 45mM AMVN und 0.2mM-5mM Antioxidant. Das Probenvolumen bei diesen Messungen betrug 10 bzw. 20ml.

Effekte des Probenvolumens auf die Ergebnisse wurden nicht registriert.

### **3.4.2. Geometrie und Dimensionen des Reaktionsgefäßes**

Probleme ergeben sich dadurch, daß in [10] keine genauen experimentellen Bedingungen angegeben werden. Man wird nur auf Durchführung der Experimente unter Lichtausschluß und guter Durchmischung hingewiesen. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit Reaktionsgefäße benutzt, welche nach eigenen Angaben und Berücksichtigung der Reaktionsparameter angefertigt wurden.

Die Meßmethodik zwingt dem Reaktionsgefäß folgende Parameter auf:

- 1) Zur Vermeidung von Photooxidationen sind die Gefäße komplett aus Braunglas
- 2) Das Gefäß muß groß genug sein um soviel Sauerstoff fassen zu können, daß man die Menge des benötigten Sauerstoffs als annähernd konstant angesehen werden kann
- 3) Möglichkeiten zur Probenentnahme oder Anschluß von Druckmessern oder Fremdgaszuleitungen müssen gegeben sein.
- 4) Das gesamte System muß abgeschlossen sein, um das Vermischen der eingesetzten Gasmischungen mit der Raumluft und das Verdampfen des Lösungsmittels zu vermeiden.
- 5) Die Oberfläche der Probe sollte so gewählt werden, daß zu starke Verdampfungseffekte des Lösungsmittels vermieden werden. Diese Verdampfung führt zu Konzentrationsänderungen, welche als erhöhte Peroxidbildung mißinterpretiert werden können.
- 6) Gute Durchmischung der Lösung und der Grenzfläche Gas / Lösung muß gewährleistet sein

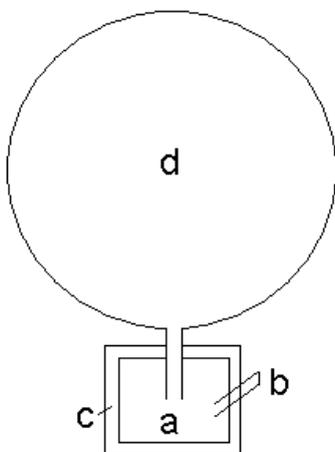
ad 2) Zur Bestimmung der notwendigen Sauerstoffmenge kann man Überschlagsrechnungen durchführen: Beim Methylinoleat verwendet man 5ml einer 0.1m Lösung, damit besitzt das Reaktionssystem  $5 \cdot 10^{-4}$ M mol reines

Methylinoleat. Setzt man das Molvolumen der verwendeten Raumluft auf 22.4 l mit einen Sauerstoffgehalt von ca. 20% an, so würde man 56 ml reine Luft benötigen um die Gesamtmenge Methylinoleat zu oxidieren. Beim Cumol verwendet man bei jeder Messung 5ml reines Cumol, was ca.  $3.5 \cdot 10^{-2}$  mol entspricht. Die hier theoretisch benötigte Luftmenge beträgt dann 4000 ml. Erste Experimente ergaben, daß der Sauerstoffverbrauch des Methylinoleates bei ca. 8% nach 5h liegt. Beim Cumol liegt dieser Wert bei ca. 3%, was ca. 120 ml entspricht. Deshalb wurden letztendlich Gefäße angefertigt, deren Volumen bei ca. 500 ml liegt, so daß es möglich ist mit beiden Substanzen in den selben Gefäßen zu messen.

ad 3,4) Zur Behebung dieser Probleme werden an das Reaktionsgefäß angebrachte Normschliffe verwendet, welche mit Septen verschlossen werden können. Damit kann man mit Hilfe einer Spritze bequem Proben ziehen, ohne das im Reaktionsgefäß bestehende Gleichgewicht grob zu stören.

ad 5) Verschiedene Vorversuche zeigten, daß es sich für die verwendeten Probenvolumina von 6.5 – 20 ml anbietet, runde Gefäße mit ca. 3 cm Durchmesser zu verwenden, kleinere Durchmesser verhindern die homogene Durchmischung der Gas / Lösungsmittelphase, größere Durchmesser führen zu Problemen bei der Probenentnahme, da der Flüssigkeitsspiegel zu niedrig ist, um Proben mit der Spritze vernünftig aufzuziehen

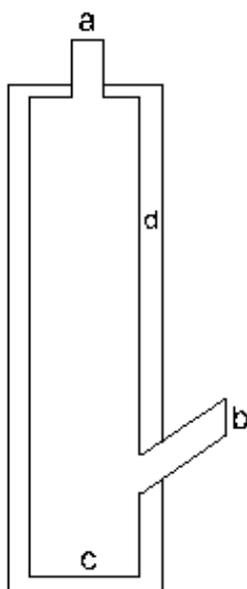
ad 6)



- a** Probenraum (Volumen ca. 30 ml)
- b** mit Septum verschlossener Ausgang zur Probenentnahme
- c** Thermostatisiermantel
- d** über zweiten Ausgang angeschlossenes Gasreservoir (optional) mit einem Volumen von 1000 ml

**Abbildung 31:** Erstes Reaktionsgefäß

Dieses Reaktionsgefäß wurde bei den ersten Testmessungen mit Methylolinoleat verwendet. Das anschließbare Gasreservoir (**d**) war dazu geplant, den nötigen Sauerstoff zu liefern, wenn Reaktionen mit Cumol durchgeführt wurden, welche wie bereits oben erwähnt mehr Sauerstoff benötigen. Leider ist es nicht möglich, Reaktionsgefäße dieser Art zu verwenden, da die Reaktion wesentlich langsamer abläuft, als nach Literatur erwartet wurde. Der Hauptgrund dafür dürfte die Verbindungsstelle zwischen Reservoir und Reaktionsgefäß sein. Es handelt sich um einen typischen "Flaschenhalseffekt": Das verdampfende Lösungsmittel wirkt dem Gas aus dem Reservoir entgegen, so daß nicht genügend Sauerstoff nachgeliefert werden kann. Es findet also nicht die notwendige homogene Durchmischung zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase statt. Diese Inhomogenität verlangsamt die Reaktion so stark, daß keine verwendbaren Ergebnisse erhalten werden können. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden folgende Reaktionsgefäße für alle Reaktionen verwendet:



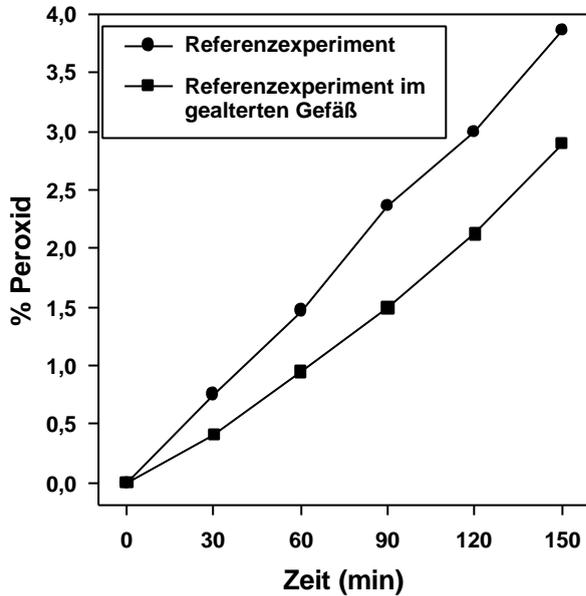
Zur Vermeidung von Photooxidationen besteht das ganze Gefäß aus Braunglas

- A** Anschluß für Pressure-Transducer oder Fremdgaszuleitung
- B** mit Septum verschlossener Ausgang zur Probenentnahme
- c** Probenraum (  $\varnothing$  ca. 4cm, Höhe ca. 40 cm, Volumen  $\approx$  500ml)
- d** Thermostatisiermantel

**Abbildung 32:** Verwendetes Reaktionsgefäß

### 3.4.3. Glaseffekte

**Alterungseffekte in den Reaktionsgefäßen**



**Abbildung 33:** Alterungseffekte

Der Begriff Referenzexperiment bezieht sich auf die Messung der uninhibierten Autoxidation von Methylinoleat. Die genauen experimentellen Bedingungen sind im Kapitel 3.4. beschrieben. Der Referenzgraph entspricht der in Kapitel 3.5.1 dargestellten Messung.

Bei den Messungen mit Methylinoleat traten unvorhergesehene Komplikationen auf. Wie üblich wurde eine Probe mit dem doppelten üblichen Volumen angesetzt und anschließend halbiert. Die beiden Fraktionen wurden in zwei separate Reaktionsgefäße eingespritzt und parallel vermessen. Bei einem dieser Gefäße betrug die gefundene Peroxidmenge nur ca. 75% der in dem anderen gemessenen. Weiterhin war dieser Graph nicht mehr linear, sondern gekrümmt. Dieser Effekt war mehrfach reproduzierbar. Aus diesem Grund wurden weitere Gefäße angefertigt und untersucht: Das verwendete Glas war Duranglas von Schott, welches aus Bor-Aluminium-Silicaten aufgebaut ist. Die Braunfärbung wird erreicht durch Tempern mit einer Paste aus Mangan und Eisenoxiden. In einigen Gefäßen fanden sich nach mehrstündigem Kochen von KOH/Isopropanol im Innenmantel herausgelöste Schwermetallionen, welche naßchemisch als Eisen und Mangan identifiziert wurden. Bei der Herstellung der Gefäße muß also die oben erwähnte Paste in den Innenmantel gelaufen sein. Da Schwermetallionen gute Peroxidzersetzer sind [70] ist es nicht verwunderlich, daß der oben erwähnte Effekt auftrat. Aber auch in Weißglasgefäßen findet man diese Inhibition. Die Gründe müssen also auch in der Beschaffenheit der Glasoberfläche liegen.

Zunächst einmal wurde als Referenz das Glasgefäß definiert, welches 7h lang einen linearen Anstieg der Peroxidkonzentration zeigt, wie in Literaturstelle [10]. Teilweise werden in manchen Reaktionsgefäßen Reaktionen beobachtet, bei denen die Peroxidkonzentration nach 5h praktisch konstant bleibt. Dieser Effekt ist nicht einsichtig, da die Reaktion über genügend Sauerstoff- und Substratmengen verfügt. Weiterhin ist die Peroxidmenge in dem Referenzgefäß das Maximum, welches unabhängig von der Behandlungsmethode erreicht wurde. Damit kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, daß die Wahl dieses Referenzgefäßes am besten dazu geeignet ist die Kinetik der Reaktion zu repräsentieren, da bei unter diesen experimentellen Bedingungen keine Inhibitionseffekte a priori vorhanden sein dürften.

Alle in dieser Arbeit benutzten Ergebnisse basieren auf Messungen, welche in Reaktionsgefäßen durchgeführt wurden, die diesem oben genannten Standard entsprechen. Zur Überprüfung des Gefäßes wurde alle 4 Wochen die Referenzreaktion durchgeführt, um verfälschte Ergebnisse, welche durch die Alterung des Glases theoretisch vorkommen können zu unterbinden. Gefäße dieser Art haben eine Lebensdauer von ca. 100 Messungen, bevor auch sie den oben erwähnten Inhibitionseffekt zeigen. Glasgefäße, welche diese Kriterien erfüllen liefern auch als einzige reproduzierbare Ergebnisse. Bei den anderen sind die Fehlerbreiten trotz identischer Vor- und Nachbehandlung wesentlich höher.

Als Referenzreaktion wird die radikalisch induzierte Oxidation des Methylinoleates verwendet. Reaktionsparameter und Auswertung findet man in den Kapiteln 3.4 und 3.5.

Zur Untersuchung der oben aufgeführten Effekte wurde ein Reaktionsgefäß mit unterschiedlichen Methoden behandelt und anschließend die Referenzreaktion darin durchgeführt:

- a) Reinigung mit dest. Wasser: Das Gefäß wurde gründlich mit dest. Wasser gespült und anschließend 6h bei 220°C getempert oder an der Luft getrocknet.
- b) Reinigung mit Aceton: analog a), aber 12h rühren
- c) Auskochen mit saurem Aceton: Das Waschaceton wird mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure angesäuert und 6h unter Rückfluß im Reaktionsgefäß gekocht, anschließend mehrmaliges Waschen mit reinem Aceton und 6h bei 220°C tempert.

- d) Tempern bei 550°C: die behandelten Gefäße wurden im Anschluß noch für 12h in einen 550°C heißen Muffelofen gelegt
- e) Oxidation mit Oleum / Perhydrol: analog c), anschließend a)
- f) Ätzen mit 0.1M Fluorwasserstofflösung: analog a), aber vor der Verwendung erfolgten mehrere gründliche Spülungen mit dest. Wasser, um die Säurespuren zu entfernen
- g) Ätzen mit Oleum/KF: analog c)
- h) Ätzen mit KOH/Isopropanol (h<sub>1</sub>) bzw. NaOH/Isopropanol (h<sub>2</sub>): analog c), Waschen erfolgt mit dest. Wasser
- i) Silanisierungen mit Chlortrimethylsilan: Das Gefäß wurde ca. 10 cm hoch mit Chlortrimethylsilan gefüllt und die Lösung 12h lang gerührt. Anschließend wurde das Chlortrimethylsilan fachgerecht entsorgt und das Gefäß 12h bei 220°C getempert.
- j) Silanisierungen mit Hexamethyldisilazan: Auf das Gefäß wurde ein Kühler aufgesetzt und das zugegebene Hexamethyldisilazan unter Zugabe von 1 Tropfen Chlortrimethylsilan 6h unter Rückfluß gekocht. Ansonsten analog i)

Die tabellarische Aufführung der durchgeführten Experimente (Tab. 3) zeigt die Ergebnisse der oben genannten Untersuchung. Die Zahlen in den Spalten 2-6 repräsentieren die Prozepte an Peroxid, welche nach der entsprechenden Minutenzahl entstanden sind. Fehlende Werte beziehen sich auf Messungen bei denen vorzeitig abgebrochen wurde, da es schon nach kürzerer Reaktionszeiten klar war, daß die Behandlungsmethode die Inhibitionseffekte der Glasoberfläche nicht beseitigen konnte. Zusätzlich muß angemerkt werden, daß manche Behandlungsmethoden keine im zufriedenstellenden Rahmen reproduzierbaren Ergebnisse liefern. Die Fehlerbreiten bei mehrfacher Ausführung dieser Messungen liegen bei bis zu 20% Abweichungen nach unten. In der Tabelle werden allgemein nur die Werte der Messungen einer Methode mit der maximalen entstandenen Peroxidmenge angegeben:

<u>Method</u>	<u>60 min</u>	<u>120 min</u>	<u>180 min</u>	<u>240 min</u>	<u>300 min</u>
<b>Referenz</b>	<b>1.469% PO</b>	<b>2.997% PO</b>	<b>4.755% PO</b>	<b>6.398% PO</b>	<b>7.956% PO</b>
a)	0.510% PO	0.690% PO	0.515% PO	1.605% PO	3.096% PO
b)	0.538% PO	1.398% PO	2.733% PO	4.155% PO	6.886% PO
b), d)	0.638% PO	1.627% PO	2.985% PO	4.755% PO	7.028% PO
c)	0.662% PO	1.791% PO	3.308% PO	5.161% PO	7.166% PO
c), d)	1.049% PO	2.552% PO	4.030% PO	6.046% PO	7.833% PO
e)	0.661% PO	1.592% PO	2.741% PO	4.073% PO	5.288% PO
f)	0.534% PO	1.447% PO	2.644% PO	4.371% PO	6.265% PO
g)	0.678% PO	1.650% PO	2.887% PO	4.254% PO	5.713% PO
h <sub>1</sub> )	0.828% PO	1.943% PO	3.130% PO	4.327% PO	-----
h <sub>2</sub> )	1.101% PO	2.317% PO	3.610% PO	5.057% PO	-----
i)	0.983% PO	2.352% PO	3.933% PO	5.809% PO	-----
j)	1.085% PO	2.563% PO	4.269% PO	6.006% PO	-----

**Tabelle 3:** Ergebnisse zu den Studien über den Einfluß des Glases des Reaktionsgefäßes (% PO = % Methylinoleathydroperoxid)

Prinzipiell kann man die verwendeten Verfahren in folgende Kategorien einteilen:

- 1) neutrale Verfahren: a), b)
- 2) acide Verfahren: c), e), f), g), i)
- 3) oxidative Verfahren: e)
- 4) alkalische Verfahren: h), j)
- 5) thermische Verfahren: d)

ad 1) a) Das neutrale Verfahren a) beschreibt die Inhibition der Reaktion durch Reaktionsrückstände, welche sich nicht mit Wasser herauslösen lassen. Selbstverständlich ist Wasser nicht dazu geeignet organische Reste zu entfernen, aber mit dieser Methode wurde versucht mögliche Schwermetallionen, welche inhibierend wirken können aus der Glasoberfläche herauszuwaschen. Wie man aber leicht sieht, erreicht man durch diese Waschungen nicht im entferntesten die Peroxidmenge, welche sich bei der Referenzreaktion bildet.

ad 1), 5) b) Waschungen mit Aceton ermöglichen es, die größte Menge an organischen Verunreinigungen zu entfernen. Dies sieht man direkt in der Tabelle. Der Inhibitionseffekt ist deutlich geringer als bei a). Trotzdem ist es nicht möglich, mit dieser Methode die Reaktionsgeschwindigkeit des Referenzgefäßes zu erreichen und reproduzieren.

Eine bessere Methode ist die Kombination von b) und d). Bei diesem Verfahren wird der Reinigungseffekt von b) mit einer praktisch vollständigen Entfernung der Restacetons aus dem Glasgewebe verknüpft. Aber auch hier liegen die Endresultate in keinem zufriedenstellenden Rahmen.

ad 2) ,5) Die beste Methode zum Erreichen des Referenzwertes ist die Behandlung der Glasoberfläche mit saurem Aceton. Die Meßwerte für dieses Verfahren liegen dimensionsmäßig denen im Referenzgefäß gemessenen am nächsten. Aber auch hier ist es nötig, das Gefäß bei sehr hohen Temperaturen auszubrennen, um möglichst alle Acetonrückstände zu entfernen.

Zur Untersuchung dieses Effektes wurde das Reaktionsgefäß nur mit verschiedenen Säuren behandelt: Ätzungen mit Fluoridlösungen brachten Verschlechterungen der Reaktivität gegenüber dem Behandeln mit Mineralsäuren. Damit liegt die Vermutung nahe, daß der Inhibitionseffekt des Glases durch die freien Hydroxylgruppen ausgelöst wird, da die oben genannten Ätzungen die Oberfläche des Glases bezüglich freier Hydroxylgruppen stark erweitert.

Bei der Behandlung mit Aceton / Salzsäure liegt es im Rahmen des Möglichen, daß zusätzlich zur Lösung der Reaktionsrückstände eine Acetalisierung der freien Hydroxylgruppen erfolgt. Diese Acetalisierung bewirkt eine Schließung der Lücken im Glasgewebe. Da aber C-O-Si-Bindungen i.a. sehr labil sind, hat man hier eine mögliche Erklärung dafür, daß nach wenigen Waschvorgängen mit Wasser oder Chloroform das Gefäß wieder Inhibition zeigt.

Daß die teilweise Behebung der Reaktionsinhibition mit diesen Methoden nicht nur ein reiner Effekt des aciden Mediums ist zeigt Methode e): Hierbei wurde mit einer der stärksten Mineralsäuren (Oleum) gearbeitet. Zwar findet man auch Inhibitionsunterdrückung, aber nicht in dem Maße wie bei Methode c) (Aceton / Säure).

Auch die Behandlung mit Chlortrimethylsilan bestärkt die oben aufgestellten Thesen. Die Reaktionsgeschwindigkeit läßt sich auch mit dieser Methode erheblich steigern. Aber auch hier ist diese Aktivierung nicht dauerhaft. Nach wenigen Waschcyclen zeigt sich wieder Inhibition. Der Grund dafür dürfte darin liegen, daß die Waschungen mit Chloroform, welches immer Spuren von Chlorwasserstoff enthält die neu gebildeten Trimethylsilylether spalten kann und somit sich wieder Inhibition durch freie Hydroxylgruppen ergibt.

ad 3) Die Behandlungsmethode mit starken Oxidationsmitteln war dazu gedacht mögliche Schwermetallspuren, welche als Inhibitoren wirken können zu entfernen. Da die Ergebnisse dieser Methode dimensionsmäßig eher den aciden Verfahren zuzuordnen sind, kann man davon ausgehen, daß die Inhibition nicht durch Schwermetallreste im Glas verursacht wird.

ad 4) Die Ätzung des Glases mit Alkalihydroxyden und Isopropanol zeigt erneut den Einfluß der Hydroxygruppen. Zwar wird auch hierbei die Inhibition teilweise aufgehoben, aber bei weitem nicht so stark, wie beim Aceton / Salzsäureverfahren c), d). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß man bei den verwendeten Glasgefäßen mit zwei Effekten zu hantieren hat, der Reinigung von organischen Resten und der Stabilität des Glasnetzes. Der Reinigungseffekt sorgt für einen Basiswert von ca. 5% Peroxidbildung nach 4h (Referenz: ca. 6%). Die Differenz gegenüber der Referenzreaktion ist die Inhibition, bedingt durch Risse und Inhomogenitäten im Gewebe des Glases.

Die Verwendung von Hexamethyldisilazan wird zwar unter den basischen Verfahren abgehandelt, aber auch die Effekte dieser Substanz hängen nicht von deren Basizität ab, sondern von ihrem Verhalten als Überkappingsreagenz für Hydroxygruppen von Glasoberflächen. Auch bei dieser Methode j), sieht man deutlich, daß Desaktivieren der Hydroxygruppen die Reaktionsinhibition verhindert. Daß die Verwendung von Hexamethyldisilazan gegenüber der Verwendung von Chlortrimethylsilan i) bessere Ergebnisse liefert ist nicht verwunderlich, da bei der Silanisierung mit Chlortrimethylsilan auf Basenzugabe verzichtet wurde, welche eine essentielle Bedingung für den quantitativen Ablauf dieser Schutzgruppenmethode ist.

ad 5) Da das Tempern bei 550°C d) nur ein komplementäres Verfahren für andere Methoden darstellt, wird an dieser Stelle auf weitere Ausführungen verzichtet.

Bei der Verwendung von Cumol wurden die in diesem Kapitel beschriebenen Effekte nicht bemerkt.

### **3.4.4. Proben- und Gefäßvorbereitungen**

**Allgemeines:** Die angesetzten Maßlösungen werden im Kühlschrank bei  $-17^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und zwei Stunden vor der Reaktion in einem dunklen Schrank zur Vermeidung von Photooxidationen bei Raumtemperatur aufgetaut. Weiterhin werden in dieser Zeit die Reaktionsgefäße mit der gewünschten Gasmischung befüllt und auf  $37^{\circ}\text{C}$  vortemperiert.

Anschließend wird die zu vermessende Probe in einem adäquat großen Kolben angemischt, mit einer Spritze aufgezogen und über das Septum in das Reaktionsgefäß injiziert. Sofort wird eine Probe von  $30\mu\text{l}$  ( $10\mu\text{l}$  Probenschleife) oder  $60\mu\text{l}$  ( $20\mu\text{l}$  Probenschleife) genommen und mittels HPLC vermessen. Der Wert dieser Messung wird auf  $t=0$  und  $\% \text{Peroxid}=0$  normiert. Zu berücksichtigen ist, daß die Reaktion einsetzt, sobald der Radikalstarter hinzugegeben wird. Deshalb beginnt die Reaktion schon bevor man die erste Messung durchführt. Die Zeit zwischen Reaktionsstart und dieser Messung liegt bei ca. 1-2 min.

Da es sich um relativ langsame Reaktionen handelt, deren Kinetik über einen Zeitraum von 5h bestimmt wird ist der Fehler durch die oben erwähnte Normierung so gering, daß er im Bereich der systematischen Fehler für dieses System liegt und somit nicht ins Gewicht fällt.

#### **a) Methyllinoleat:**

Wie bereits oben erwähnt sind die Messungen des Methyllinoleates mit unerwarteten Effekten, bedingt durch die Beschaffenheit des Glases des Reaktionsgefäßes verbunden. Werden die Gefäße mit Aceton gespült und 12-24h bei  $220^{\circ}\text{C}$  getrocknet, so erhält man bei der nächsten Messung stark inhibierte Reaktionen, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit der Referenzreaktion sinkt um ca. 20%. Das Aceton haftet so stark in dem Gewebe des Silicates, daß es selbst durch diese drastischen Bedingungen nicht entfernt werden kann. Dieser Effekt ist allgemein bekannt. So ist es bei Präzisions-NMR-Messungen auch nötig, mit Aceton gereinigte Probenröhrchen in Vakuumtrockenschränken zu behandeln. Ansonsten sieht man auch nach mehreren

Stunden Tempern in einem gewöhnlich Trockenschrank immer noch Signale, welche vom Aceton stammen.

Auch bei Spülungen mit destilliertem Wasser treten Inhibitionseffekte auf. Diese sind aber wesentlich schwächer. Die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt aber trotzdem um ca. 20%.

Um diese Effekte zu vermeiden dürfen die Reaktionsgefäße nur mit den in der Reaktion selbst verwendeten Lösungsmitteln, z.B. Chloroform, p.A. gereinigt werden. Der Trocknungsvorgang sollte mindestens 6h bei 220°C andauern.

### **b) Cumol:**

Aufgrund der hohen Mengen an Cumol wird das Reaktionssystem praktisch nicht durch die Beschaffenheit der Glasoberfläche des Gefäßes beeinflusst. Behandlungsmethoden der Glaswand, welche beim Methyllinoleat zu verschiedenen Ergebnissen in den Messungen führten, lassen die Reaktion des Cumols völlig unbeeinflusst.

Auch sind die oben aufgeführten drastischen Reinigungsbedingungen nicht nötig. Es reicht völlig aus das Reaktionsgefäß mit Aceton gründlich zu spülen und anschließend im Trockenschrank bei 220°C kurz zu trocknen. Diese 220°C sind auch nicht zwingend notwendig, optimieren aber die Arbeitszeiten.

### **3.4.5. Sonstige Reaktionsparameter**

- a) Bei allen Reaktionen stand das Reaktionsgefäß auf einem Magnetrührer. Ein Rührfisch im Probenraum mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 400 U/min sorgte für die gewünschte Durchmischung. Effekte, welche von Rührgeschwindigkeit des Magnetrührers abhängen sind ab 200 U/min nicht mehr zu bemerken. Bei geringeren Drehzahlen ist die homogene Durchmischung der Lösung und das Konstante Gleichgewicht zwischen Lösungsmittel und Gasphase nicht gewährleistet und führt zu verlangsamten Reaktionen (ca. 90% der Referenzgeschwindigkeit).
- b) Die für Cumol nach 5h erhaltenen Signalfächen bei einer Meßwellenlänge von 218 nm entsprachen nur ca. 40% derer des Methyllinoleates. Da die Auflösung des Meßverfahrens schon beim Methyllinoleat nicht eine exakte Unterscheidung der Substanzaktivitäten im Rahmen der Meßgenauigkeit zuließ, mußte teilweise die

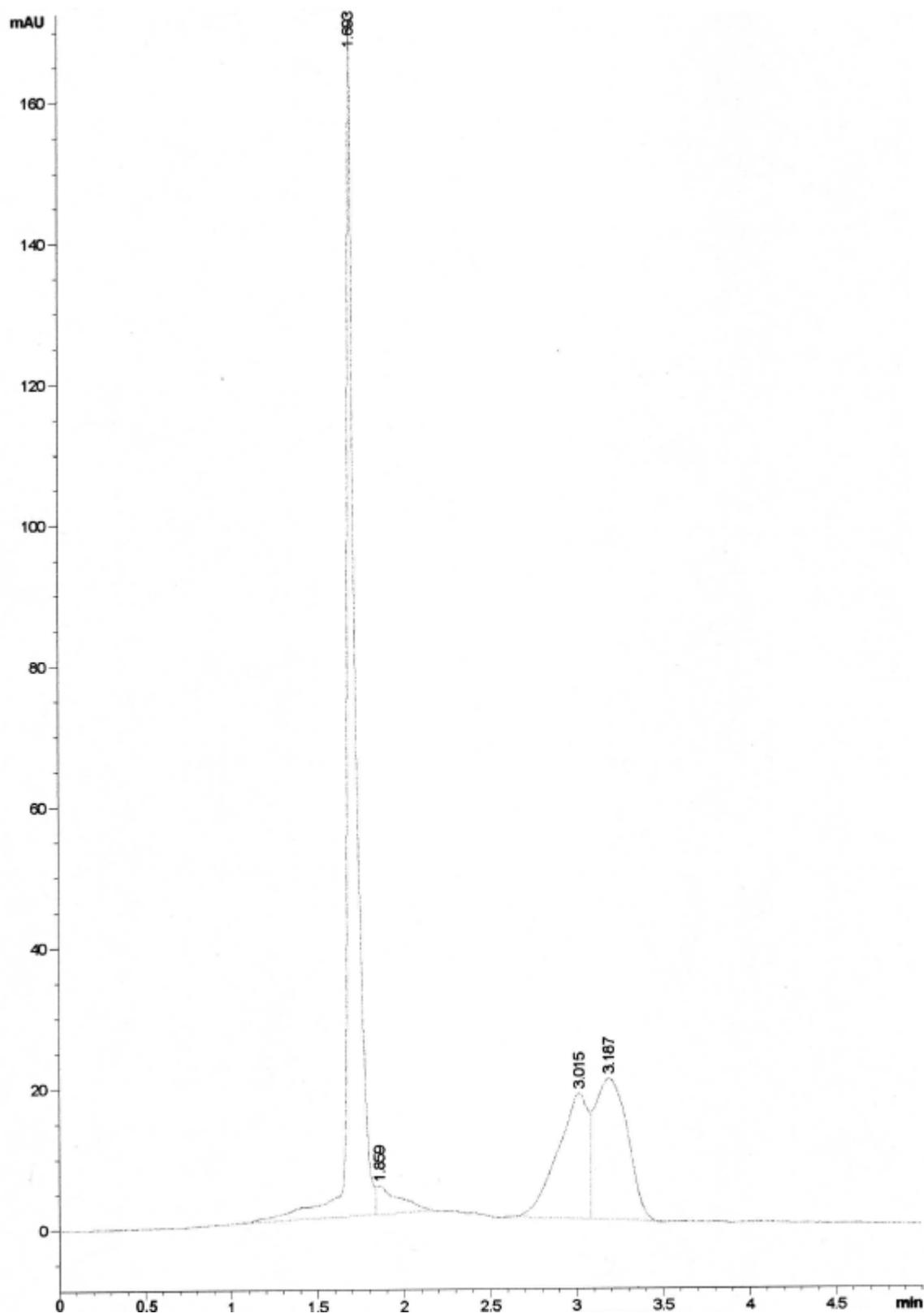
Auflösung der Chromatogramme für das Cumol erhöht werden. Deshalb wurde bei den Messungen standardmäßig statt der sonst verwendeten 10µl Probenschleife des Injektors eine 20µl Probenschleife eingebaut. Messungen bei denen dies nicht geschah, sind im Abschnitt 3.6. eindeutig gekennzeichnet. Die Auswertung dieser Messungen ist teilweise mit Schwierigkeiten verbunden, da die Absorptionsbanden von Cumol entweder so kleine Flächen im Chromatogramm ergeben, daß kleine Änderungen der Peroxidmenge im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht mehr exakt integrierbar sind (Messungen bei 254nm). Die Messungen bei 218nm führen bei höheren Peroxidmengen in Bereiche, welche den Detektor überlasten und somit auch keine exakten Ergebnisse liefern.

Die Auswertung der Messungen muß somit über eine Kombination der Auswertung der erhaltenen Flächen bei beiden Wellenlängen erfolgen. Diese Methode wird in Kapitel 3.6. beschrieben.

### **3.4.6 Auswertungsmethoden**

**a) Identifizierung der Substanzen:** Abbildung 34 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Messung mit Methyllinoleat als Substrat. Die Signale bei 1.8 min können aufgrund von Referenzmessungen dem Methyllinoleat und dem Radikalstarter (AMVN) zugeordnet werden. Eine Basislinientrennung ist unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich. Das breite Signal von ca. 2.6-3.5 min entspricht den gebildeten Peroxiden mit konjugiertem Diensystem. [71]. Astaxanthin ist in diesem Chromatogramm nicht enthalten. Seine Retentionszeit beträgt 9.8 Minuten.

Die Meßwellenlängen betragen 235nm ( $\lambda_{\max}$  der konjugierten Hydroperoxide des Methyllinoleates) und 475nm ( $\lambda_{\max}$  Astaxanthin). Bei den anderen Antioxidantien wurden entsprechen deren  $\lambda_{\max}$ -Werte verwendet.



**Abbildung 34:** Chromatogramm einer Messung im Methyllinoleatsystem

Die Chromatogramme für die Messungen mit Cumol sind ähnlich. Die Meßwellenlängen betragen 254nm und 218nm (Absorbtionsbanden von Cumol bzw.

Cumolhydroperoxid). Identifikation erfolgte über Referenzmessungen der Reinsubstanzen. In diesem Falle sind Chlorbenzol, Cumol und AMVN nicht trennbar. Weil aber die quantitative Auswertung dieser Substanzen nicht Gegenstand der Untersuchung war, wurde nicht versucht, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Basislinientrennung möglich ist.

Da die Flächen der Signale des Cumolhydroperoxids deutlich kleiner sind als beim Methyllinoleat wurde bei den Messungen mit Cumol eine doppelt so große Probenschleife (20µl) wie beim Methyllinoleat verwendet, um die Auflösung des Meßverfahrens zu verdoppeln. Damit verbunden ist eine Überladung des Detektors und der Säule, was man deutlich am Signal des reinen Cumols sieht. Da aber immer noch Basislinientrennung des entstehenden Peroxides von den übrigen Substanzen besteht, können die Peroxidgehalte problemlos bestimmt werden. Die Zerfallsprodukte des Cumolhydroperoxides (Aceton und Phenol) sind bei 4.8 min bzw. 6.5 min zu finden. Auch hier wurde die Identifizierung durch Referenzmessungen durchgeführt.

### **b) Bestimmung der Flächenprozent / %Peroxid-Korrelation für die gebildeten Peroxide:**

#### **1) Methyllinoleat:**

Da die vom Gerät ermittelten Flächenprozent der einzelnen Komponenten linear mit der Konzentration verbunden sind, ist es möglich über Eichmessungen den Peroxidgehalt in Prozent umgesetztem Methyllinoleat zu ermitteln.

Dazu wurde zunächst die Hydroperoxide mittels Säulenchromatographie isoliert [72]. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde im Gegensatz zu [72] nicht über Dünnschichtchromatographie sondern direkt über HPLC überprüft. Geeignete Fraktionen wurden vereint und das Lösungsmittel mittels einer Ölpumpe abgezogen.

Von den reinen Peroxiden wurden Maßlösungen zu jeweils 10ml in Hexan/Isopropanol =1:1 (v:v) angesetzt. Über die Einwaage kann man dann ausrechnen, wie Peroxidmenge und Flächenprozent der Chromatogramme miteinander zusammenhängen.

Unter der Prämisse, daß das Methyllinoleat einheitlich und ohne Nebenreaktionen in seine Peroxide übergeht erfolgt die Umrechnung mittels folgender Beispielrechnung:

55 mg Methyllinoleathydroperoxid (326.47g/mol) werden in 10ml Hexan/Isopropanol =1:1 (v:v) gelöst. Im Chromatogramm ergeben sich für diese Einwaage 50229.4

Flächenprozent. Die in den Experimenten verwendete Lösung ist 77mM, d.h. 0.2267g Methyllinoleat in 10 ml. Kompletter Umsatz (100%) dieser Menge führt zu 0.2514g Methyllinoleathydroperoxid. Damit entspricht die in der Eichlösung verwendete Stoffmenge (55mg) 21.88%. Daraus folgt, daß 1% Peroxid 2295.67 Flächenprozent im Chromatogramm entspricht.

Damit ist der Multiplikationsfaktor für die Umrechnung von Flächenprozent in % gebildetes Peroxid  $4.36 \cdot 10^{-4}$ .

#### **2) Cumolhydroperoxid:**

Beim Cumol wurde auf die Erstellung einer Korrelation verzichtet. Bei der Auswertung in diesem System werden nur Werte relativ zur uninhibierten Peroxidation angegeben. Da der Reinheitsgrad des verwendeten Cumols vom Hersteller mit  $\geq 99\%$  angegeben ist, kann man aus den Messungen schließen, daß die Peroxidation sich im Rahmen von 1-3% bewegt.

#### **b) Abhängigkeit der Reaktion von der Peroxidausgangskonzentration:**

In der Literatur [10] werden die Peroxide säulenchromatographisch vom Methyllinoleat abgetrennt und die Maßlösungen mit dem reinen Methyllinoleat angesetzt. Da die Substanz sehr oxidationsempfindlich ist, ist es notwendig bei dieser Verfahrensweise für jede Messung frische Maßlösungen anzusetzen und ständig die Lösungen zu entgasen und inert zu handhaben. Diese Methodik ist für ein Standardverfahren sehr umständlich und zeitaufwendig. Deswegen wurde zunächst untersucht, ob diese Prozeduren überhaupt notwendig sind.

In den ersten Experimenten wurde das vorgereinigte Methyllinoleat verwendet. Anschließend wurde Methyllinoleat, welches Peroxidgehalte von 0.05-0.25% enthielt verwendet. Die Ergebnisse waren im Rahmen der Meßgenauigkeit des Verfahrens identisch. Deswegen wurde bei allen Untersuchungen auf die säulenchromatographische Reinigung verzichtet und die Substanz so eingesetzt, wie sie geliefert wurde. (s. Reagenzienanhang).

Aufgrund der oben genannten Fakten wurde bei der Auswertung aller Messungen die Ausgangsmenge an Methyllinoleathydroperoxid auf Null skaliert und von den folgenden Meßpunkten entsprechend abgezogen.

**b) Ermittlung der Fehlerbreite:**

Zur Ermittlung der systematischen Fehlerbreiten benötigt man Meßpunkte, welche zu gleichen Zeitpunkten aufgenommen wurden. Da es gerätetechnisch nicht möglich war in exakten zeitlichen Abständen zu messen, wurde folgendes Verfahren angewendet:

Die Software der HPLC-Anlage ermöglicht es, die Einspritzzeit der Probe genau zu bestimmen. Diese Zeiten wurden gegen die Menge an Peroxid aufgetragen. Um nun einheitliche Intervalle zu erhalten wurden die einzelnen Meßpunkte auf Intervalle von 30 min linear interpoliert. Zwar zeigen die Meßkurven teilweise Krümmungen und Steigungen höherer Ordnung, aber die Mittelwerte und Standardabweichungen bleiben im Rahmen von  $\pm 5\%$  konstant, egal welche Art von Interpolation angewendet wird.

**Auswertungsbeispiel:**

t (min)	Flächen%	t (min)	% PO (lin)	% PO (log)	$\bar{x}$	s [ $\pm\%$ ]
0.000	1597.101	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34.767	1824.162	30.000	0.090	0.093	0.092	2.317
60.583	1912.279	60.000	0.171	0.176	0.174	2.040
87.950	2204.096	90.000	0.287	0.290	0.288	0.735
123.217	2801.850	120.000	0.453	0.455	0.454	0.311
161.567	3117.775	150.000	0.646	0.649	0.648	0.327
191.167	3706.022	180.000	0.924	0.922	0.923	0.153
218.083	4626.825	210.000	1.297	1.291	1.294	0.328
247.267	5614.006	240.000	1.745	1.742	1.744	0.122
275.267	6743.294	270.000	2.268	2.265	2.266	0.094
305.283	8401.561	300.000	2.876	2.868	2.872	0.197

**Tabelle 4:** Ermittlung der Fehlerbreite (PO = Peroxid; lin = linear, log = logarithmisch)

Die ersten beiden Spalten repräsentieren die unbearbeiteten Ergebnisse einer Messung von  $\beta$ -Carotin. In Spalte 4 sind die Zeitintervalle linear, in Spalte 5 logarithmisch interpoliert. Spalte 6 und 7 geben Durchschnitt und Standardabweichung für die Mittelwerte aus beiden Verfahren an. Wie man leicht sieht, liegen diese Werte nach 90 Minuten noch unterhalb der Meßgenauigkeit (1%) des HPLC-Gerätes. Somit kann man die lineare Interpolation als Auswertungsverfahren gut vertreten.

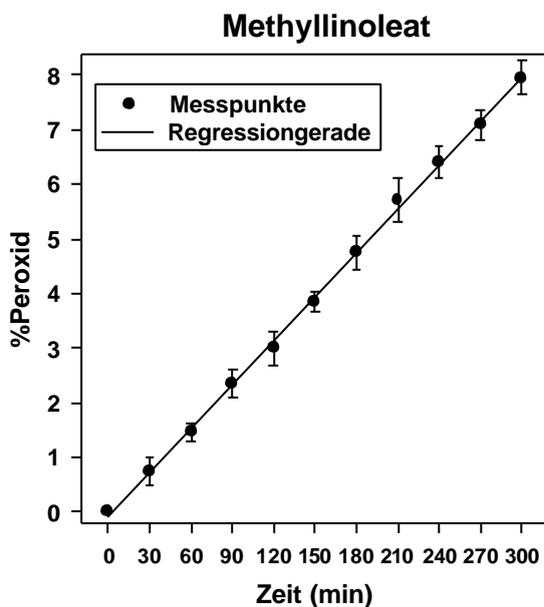
### 3.5. Graphen und Interpretationen der Einzelmessungen

Nach der Besprechung des Referenzexperimentes mit Methyllinoleat werden zunächst  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Tocopherol und Astaxanthin wegen ihrer enormen Bedeutung behandelt. Die übrigen Substanzen werden willkürlich in die Klassen Kohlenwasserstoffe, Ketocarotinoide, bicyclische-Carotinoide und Stickstoffcarotinoide eingeteilt. Weiterhin werden die Experimente noch nach Substratgruppen (Methyllinoleat und Cumol) unterteilt.

Spezielle Auftragungen, wie Derivatigraphen oder für den Abbau der Antioxidantien sind für die Fälle, in denen diese Werte apparativ meßbar waren, angegeben.

Um eine qualitative Einordnung der Substanzen zu erreichen wurde die Menge des gebildeten Hydroperoxides des Methyllinoleates ohne Zusatz potentieller Antioxidantien nach 5h als Vergleichswert definiert. Jede Substanz, deren Zugabe zur Unterschreitung dieses Vergleichswertes führt wird als antioxidativ definiert, alle anderen als prooxidativ (s. S. 82)

#### 3.5.1. Referenzmessungen am Methyllinoleat



**Abbildung 35:** Uninhibierte Bildung der Hydroperoxide des Methyllinoleates

Lineare Regression:

Steigung: : 0.0267

Ordinatenabschnitt : -0.0757

Regressionskoeffizient: 0.9991

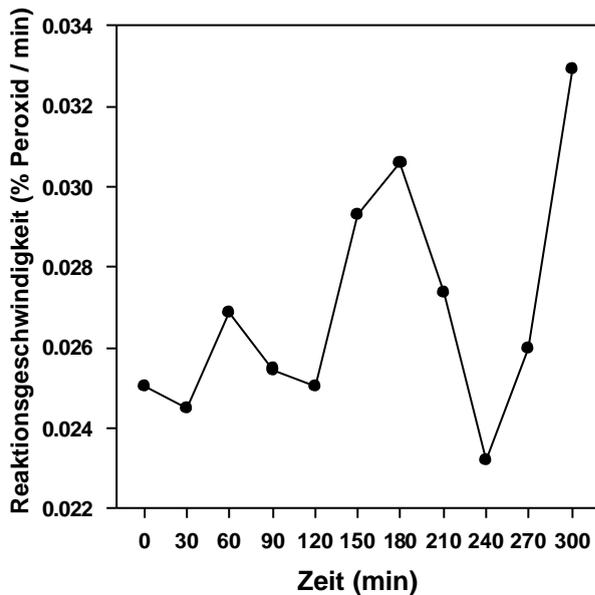
**% Methyllinoleathydroperoxid  
nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %**

Zur Ermittlung eines Referenzgraphens wurde die Peroxidbildung des reinen Methyllinoleates ohne Zugabe von Antioxidantien verfolgt. In diesem Falle wurde statt

einer Lösung des Antioxidans in Chloroform nur die entsprechende Menge reines Chloroform dem Reaktionsgemisch hinzugefügt.

Wie man dem Graphen entnehmen kann, verläuft die uninhibierte Bildung des Methylinoleathydroperoxides quasi linear. Dies bedeutet, daß die Reaktion keinen autokatalytischen bzw. kettenverzweigenden Verlauf hat, da die Reaktionsgeschwindigkeit, welche durch die Steigung repräsentiert wird, konstant ist. Eine Reaktionsbeschleunigung würde eine kontinuierliche Erhöhung der Steigung zur Folge haben, was zu Funktion höherer, führen würde.

Da in dieser Arbeit sowohl antioxidative, als auch potentielle prooxidative Effekte untersucht wurden, ist es nötig Derivatigraphen von den Ergebnissen der einzelnen Messungen anzufertigen:



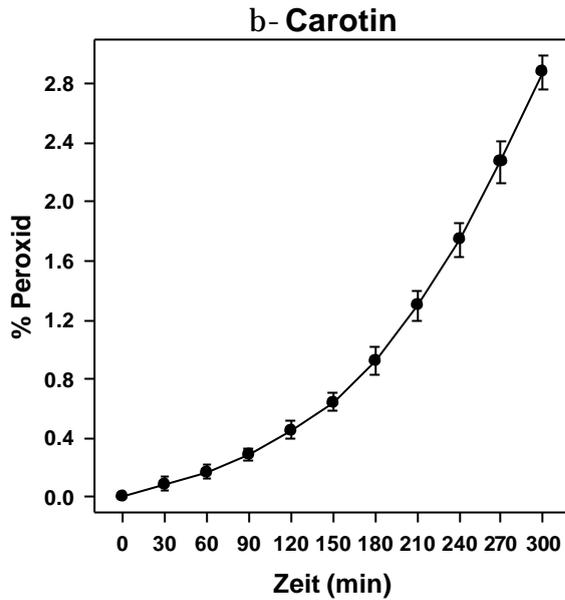
**Abbildung 36:** Derivatigraph der uninhibierten Autooxidation von Methylinoleat

durchschnittliche Reaktionsgeschwindigkeit :

$0.0268 \pm 0.003$  % Methylinoleathydroperoxid / min

Da die Auftragung der Peroxidbildung/min gegen die Zeit Reaktionsgeschwindigkeiten repräsentieren, kann man hier die Reaktionsbeschleunigungen erkennen. Diese Graphen werden zur Untersuchung von krypto-prooxidativen Effekten benötigt: Die eingesetzten Substanzen wirken gewöhnlich als Antioxidantien, welche die Bildung der Peroxide entweder durch Kettenabbrüche unterbinden oder als schneller ablaufende Konkurrenzreaktionen verzögern. Es ist aber möglich, daß die zugesetzten Antioxidantien Produkte bilden, welche die Referenzreaktion beschleunigen. So erhält man Graphen bei denen in einem gewissen Anfangsintervall weniger Peroxid gebildet





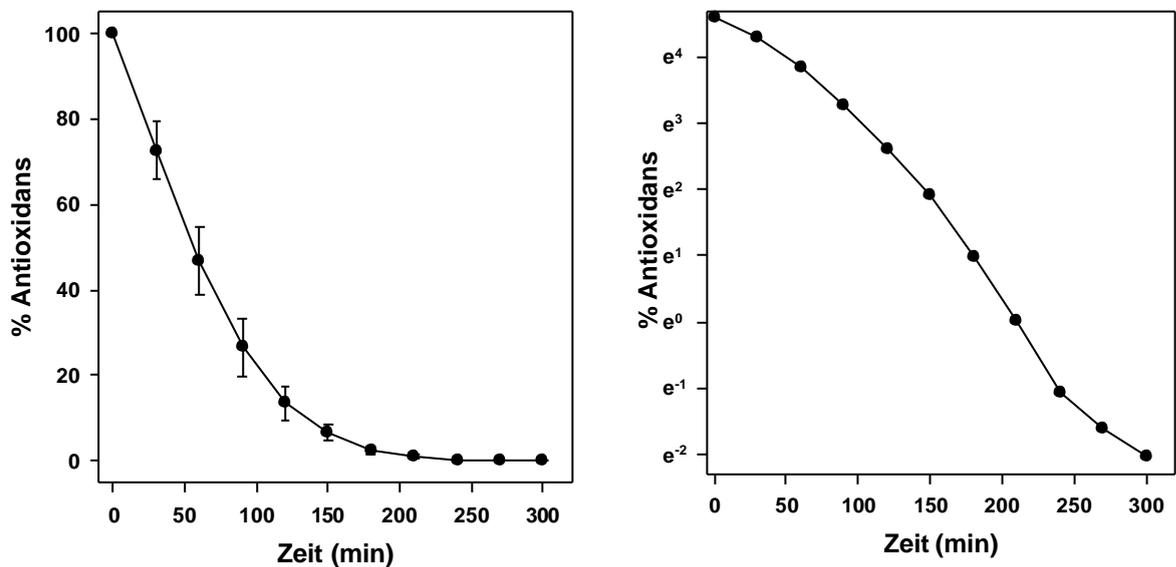
**Abbildung 38:** Unterdrückung der Peroxidbildung von Methyl-  
linoleat durch  $\beta$ -Carotin

**% Methyl-  
linoleathydroperoxid  
nach 5h : 2.88 ± 0.12 %**

**Referenzexperiment:**

**% Methyl-  
linoleathydroperoxid  
nach 5h : 7.96 ± 0.30 %**

Für die Erklärung dieses Effektes wird bei der Auswertung noch ein zusätzlicher Graph zur Hilfe genommen. Dieser besteht aus einer Auftragung des Abbaus des  $\beta$ -Carotins während der Reaktion gegen die Zeit:



**Abbildung 39:** Lineare (links) und logarithmische (rechts) Auftragung des Abbaus von  $\beta$ -Carotin im Reaktionssystem

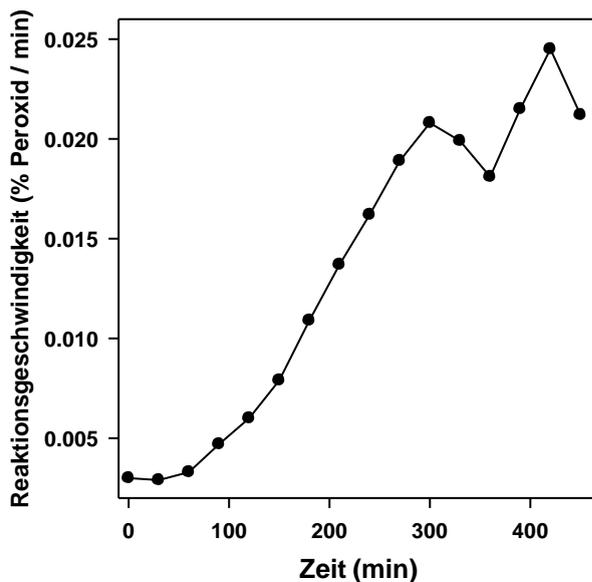
Der Kurvenverlauf der linearen Auftragung läßt auf einen Prozeß erster Ordnung schließen, da der Abbau des  $\beta$ -Carotins einen logarithmischen Verlauf zeigt. Die entsprechende logarithmische Auftragung zeigt jedoch, daß der Abbau nicht durch eine simple Reaktion pseudo-erster Ordnung zu beschreiben ist. Wäre dies der Fall ergäbe die logarithmische Auftragung eine Gerade. Wie man aber direkt Abb. 39 entnehmen kann ist die Meßkurve immer noch gekrümmt. Dies bedeutete, daß der Abbau des Antioxidans einer Kinetik höherer Ordnung gehorcht. Dies ist nicht zwangsläufig immer der Fall. Besonders bei sehr hohen Konzentrationen an Antioxidans kann es zu vollkommen andere Effekten (z.B. "Plateaubildungen", s. Kapitel 3.6.3.4.) kommen.

Weiterhin ist deutlich zu sehen, daß nach 150 Minuten die Konzentration des  $\beta$ -Carotins auf 6.7 % der Ausgangskonzentration abgefallen ist. Man befindet sich dann in einem Bereich in dem die Konzentration des Antioxidans nicht mehr ausreicht, das Substrat genügend zu schützen oder daß Abbauprodukte als Katalysatoren für die Peroxidbildung wirken. Damit wäre die einsetzende erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit zu erklären. Es ist deutlich zu erkennen, daß der antioxidative Effekt nicht nur an das Vorhandensein des Antioxidans, sondern auch an dessen relative Konzentration gegenüber dem zu schützenden Substrat gekoppelt ist.

Auch die Derivativauftragung der Peroxidbildung bestätigt diese Thesen. Der entsprechende Graph (Abb. 40) repräsentiert die Reaktionsbeschleunigung. Wie man deutlich sieht, bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb der ersten 60 min annähernd konstant. In dem Intervall von 60-150 Minuten ist ein deutlicher linearer Anstieg zu erkennen. Ab einer Reaktionszeit von 150 Minuten findet man einen weiteren annähernd linearen Ast, welcher aber eine deutlich höhere Steigung besitzt als der vorhergehende. Die Zunahme der Peroxidmenge bleibt also in kleineren Intervallen linear und folgt damit keiner Kinetik höherer Ordnung. Dies ist auch ein erster Hinweis darauf, daß die Abbauprodukte des  $\beta$ -Carotins nicht zwingend selber Antioxidantien sein müssen. In diesem Falle würde die Reaktionsbeschleunigung mit der Zeit sinken, da sich die Zahl der Abbauprodukt erhöht. Ob die Abbauprodukte als Prooxidantien zu sehen sind, ist schwer zu beantworten. Die Bildung des Peroxids im Referenzexperiment ist linear. Würden die Abbauprodukte als Prooxidantien wirken, würde man nicht die oben beschriebenen Linearitäten in Abb. 40 beobachten. Es ist zwar theoretisch möglich, daß sich die antioxidativen und prooxidative Effekt

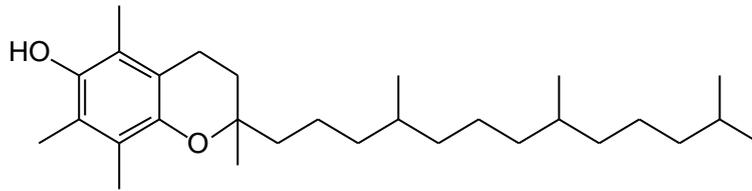
gegenseitig so kompensieren, daß man der beobachtetet Effekt dadurch eine scheinbare Linearität erhält, dies ist aber mit dem gewählten Meßverfahren nicht verifizierbar. [Anm.: Die beobachteten Linearitäten sind, wie bereits erwähnt, keine durch die lineare Interpolation bedingten systematischen Fehler. Auch bei logarithmischer Interpolation kann man diesen Effekt deutlich erkennen. S. dazu auch Kapitel 3.4.6.]

Zur genaueren Untersuchung dieser Befunde wurde die Reaktionszeit von 300 auf 450 Minuten verlängert: Wie deutlich in Abb. 40 zu erkennen ist beginnt ab ca. 300 Minuten die Reaktionsbeschleunigung sehr stark zu streuen. Diese korreliert mit dem Zeitpunkt an dem praktisch alles  $\beta$ -Carotin verbraucht sein dürfte. Also sieht man, daß der antioxidative Effekt zwingend mit dem Vorhandensein des  $\beta$ -Carotins gekoppelt ist. Der Graph geht in einen dem Referenzexperiment ähnlichen über. Die Werte liegen in dem Intervall, welches sich für das Referenzexperiment ergab (0.021-0.033 % Peroxid/min). Damit wäre gezeigt, daß kein prooxidativer Effekt in diesem System festzustellen ist. Darüber hinaus sieht man, daß die antioxidativen Effekte der potentiellen Nebenprodukte keinen Einfluß auf den globalen antioxidativen Effekt ausüben. Zwar sind die Werte der Beschleunigung am unteren Rand des Referenzexperimentes, die starke Streuung entzieht aber jeder Diskussion die Grundlage.

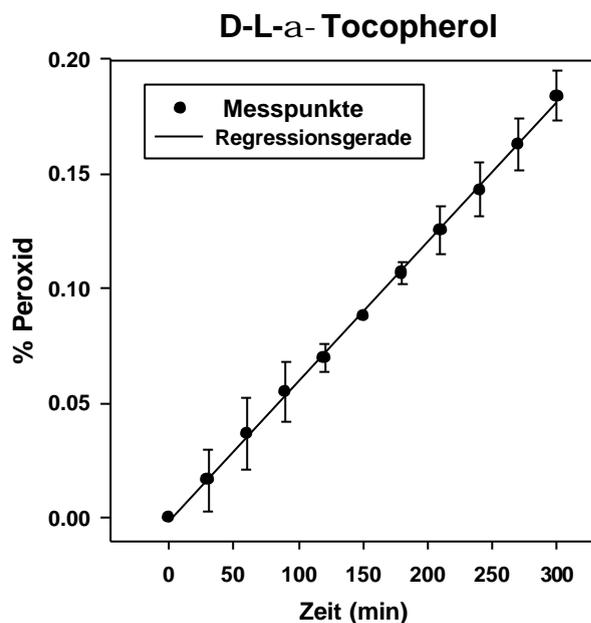


**Abbildung 40:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin

### 3.5.3 D-L- $\alpha$ -Tocopherol



**Abbildung 41:** D-L- $\alpha$ -Tocopherol **30**



**Abbildung 42:** Antioxidative

Wirkung von D-L- $\alpha$ -Tocopherol

Lineare Regression:

Steigung: : 6.07e-4

Ordinatenabschnitt : -1.48e-3

Regressionskoeffizient : 0.999

**% Methyllinoleathydroperoxid**

**nach 5h : 0.18 ± 0.01 %**

**Referenzexperiment:**

% Methyllinoleathydroperoxid

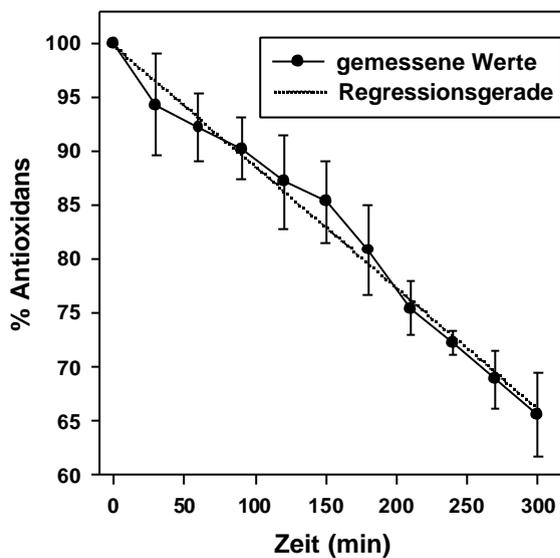
nach 5h : 7.96 % ± 0.30 %

Wie man dem obigen Meßgraphen für direkt entnehmen kann, ist  $\alpha$ -Tocopherol ein hervorragendes Antioxidans, welches um Größenordnungen dem  $\beta$ -Carotin (2.88 % Methyllinoleathydroperoxid nach 5h) überlegen ist. Dies ist nicht verwunderlich, da  $\alpha$ -Tocopherol als das beste natürliche Antioxidans gilt und einen grundsätzlich anderen Wirkungsmechanismus besitzt als die untersuchten Polyene (s. dazu auch S. 20).

Die Peroxidbildung verläuft vollkommen linear, d.h. der antioxidative Effekt bleibt während des gesamten Meßintervalls fast konstant. Man sieht keine besonders ausgeprägten Inhibitionsperioden oder autokatalysebedingte Beschleunigungsintervalle.

Der Abbau des  $\alpha$ -Tocopherols verläuft wesentlich langsamer als bei den Carotinoiden. Nach drei Stunden sind noch 65.6 % der Substanz vorhanden (Abb. 43). Dies bedeutet, daß der antioxidative Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol wahrscheinlich nicht nur darin besteht,

daß diese Substanz im Reaktionssystem als Alternative stärker als das Substrat angegriffen wird, sondern daß es sich um eine kettenbrechende Spezies, bzw. eine Spezies, welche Kettenverzweigungen unterdrückt, handelt. Im anderen Fall müßte der Abbau wesentlich schneller erfolgen. Das  $\alpha$ -Tocopherol beweist somit in beeindruckender Weise, daß die antioxidative Reaktivität nicht zwingend mit dem ständigen Abfangen von Radikalen und damit verbundenen Abbau der antioxidativen Substanz verknüpft ist.



**Abbildung 43:** Abbau des D-L- $\alpha$ -Tocopherols im Reaktionssystem

Lineare Regression:

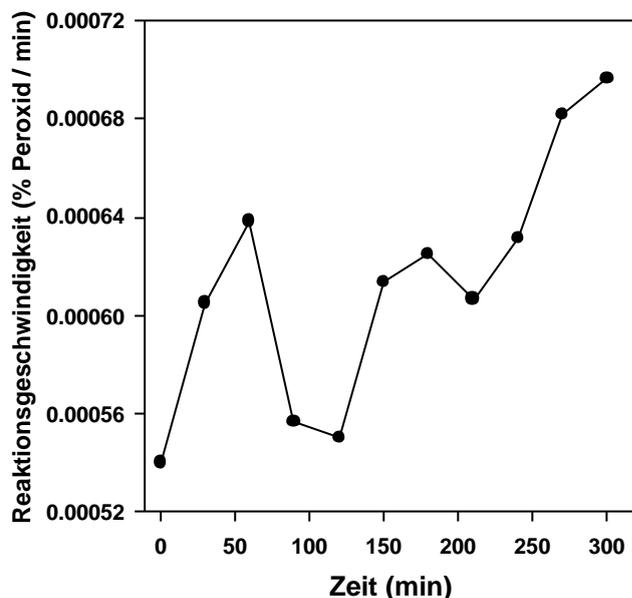
Steigung: : -0.112

Ordinatenabschnitt : -99.91

Regressionskoeffizient : 0.988

Zur genaueren Untersuchung der oben diskutierten Überlegungen werden die Graphen für den Abbau des  $\alpha$ -Tocopherols und der Derivatigraph der Peroxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol diskutiert: Wie man deutlich sieht verläuft der Abbau annähernd linear. Dies läßt darauf schließen, daß es sich um keinen autokatalytischen bzw. kettenverzweigenden Prozeß handelt.  $\alpha$ -Tocopherol wird langsam aber stetig verbraucht.

Im Derivatigraphen beginnt die Reaktionsgeschwindigkeit erst konkret nach ca. 240 Minuten anzusteigen, vorher liegt sie stark streuend im Intervall von  $5.4 \cdot 10^{-4}$  % Peroxid/min bis  $6.3 \cdot 10^{-4}$  % Peroxid/min. Bis zu diesem Punkt findet man in allen Graphen keine Hinweise auf Autokatalysereaktionen.



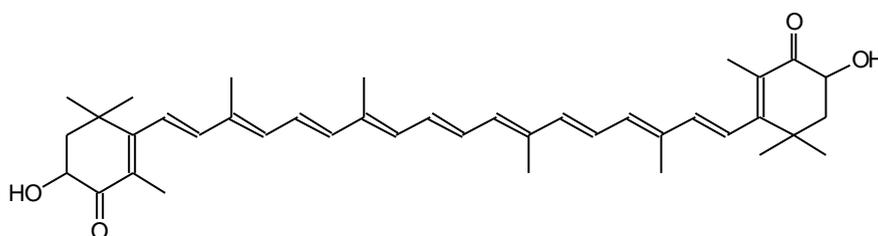
**Abbildung 44:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von D-L- $\alpha$ -Tocopherol

Der Anstieg im Graphen kann auf zwei Arten interpretiert werden:

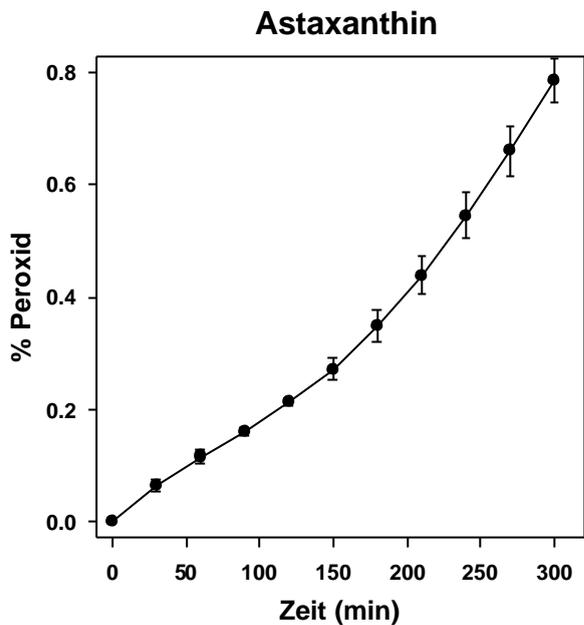
- Die verringerte Menge an  $\alpha$ -Tocopherol senkt die Stoßwahrscheinlichkeit dieser Substanz mit den abzufangenden Radikalen soweit ab, daß von diesem Zeitpunkt an der Aufbau des Peroxids als alternativer Reaktionspfad immer wahrscheinlicher wird.
- Die Abbauprodukte des  $\alpha$ -Tocopherols wirken als Katalysatoren der Peroxidbildung und nach 240 Minuten überschreitet ihre Konzentration die Mindestgrenze für das Einsetzen einer Katalyse. Konkrete Aussagen über Mechanismus a) oder b) sind auf Grund des vorliegenden Datenmaterials nicht möglich.

Weitere wichtige Erkenntnisse über die Wirksamkeit von  $\alpha$ -Tocopherol werden bei den entsprechenden Messungen im Cumolsystem (Kapitel 3.6.4.1.-3.6.4.3) diskutiert.

### 3.5.4. Astaxanthin



**Abbildung 45:** Struktur von Astaxanthin 4



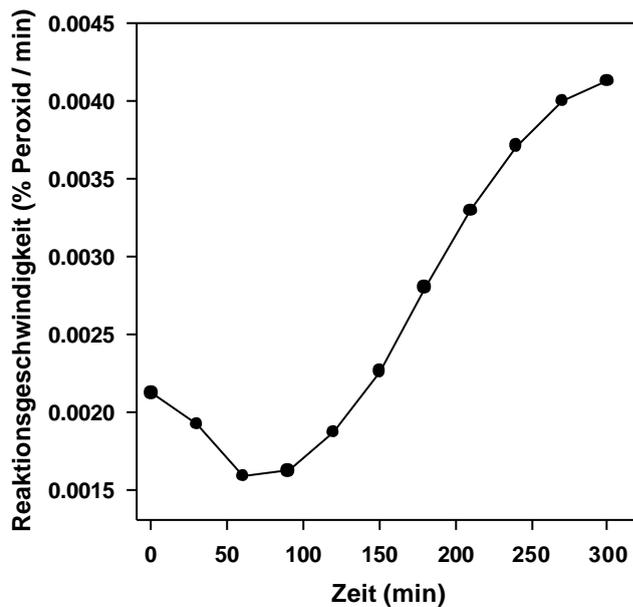
**Abbildung 46:** Unterdrückung der Peroxidbildung von Methyl-  
linoleat durch Astaxanthin

**% Methyl-  
linoleathydroperoxid  
nach 5h :  $0.79 \pm 0.04\%$**

**Referenzexperiment:**

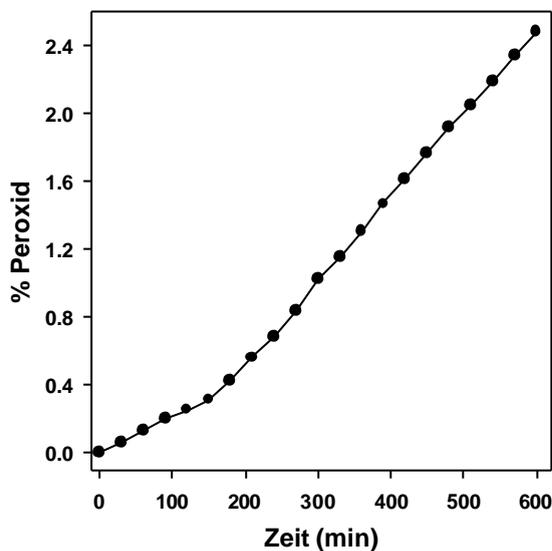
% Methyl-  
linoleathydroperoxid  
nach 5h :  $7.96 \pm 0.30 \%$

Die Messungen bestätigen die in der Literatur [10] und [21] erhaltenen Ergebnisse. Astaxanthin ist ein wesentlich besseres Antioxidans als  $\beta$ -Carotin. Es entstehen nur 36% der Peroxidmenge, welche in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin gebildet wird. Der Peroxidgehalt nach 5 Stunden beträgt nur 10% des Wertes, welcher im Referenzexperiment ohne Zugabe von Astaxanthin erreicht wird.



**Abbildung 47:** Derivat-  
graph der Peroxidbildung  
von Methyl-  
linoleat in  
Gegenwart von Asta-  
xanthin

Der Verlauf des Derivatigraphens der Peroxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin zeigt einen zunächst ungewöhnlich scheinenden Verlauf. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt nicht stetig zu oder bleibt über den Anfangsbereich annähernd konstant, wie z.B. beim  $\beta$ -Carotin, sondern sinkt erst einmal ab und steigt dann wieder nach Durchlauf eines Minimums zwischen 50 und 100 Minuten wieder an. Weiterhin scheint die Geschwindigkeit nach 5 Stunden an einem Maximum angekommen zu sein, welches ca. nur 10-15% der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes entspricht. Zur Verifizierung dieser Beobachtung wurde die Reaktionszeit verdoppelt:



**Abbildung 48:** Unterdrückung der Peroxidbildung von Methyl-*linoleat* durch Astaxanthin über ein Zeitintervall von 10 Stunden

Schon mit bloßen Auge ist erkennbar, daß sich dieser Meßgraph aus zwei Bereichen zusammensetzt, von 0-210 und von 210-600 Minuten. Für beide Bereiche wurden lineare Regressionen durchgeführt. Die Ergebnisse lauten:

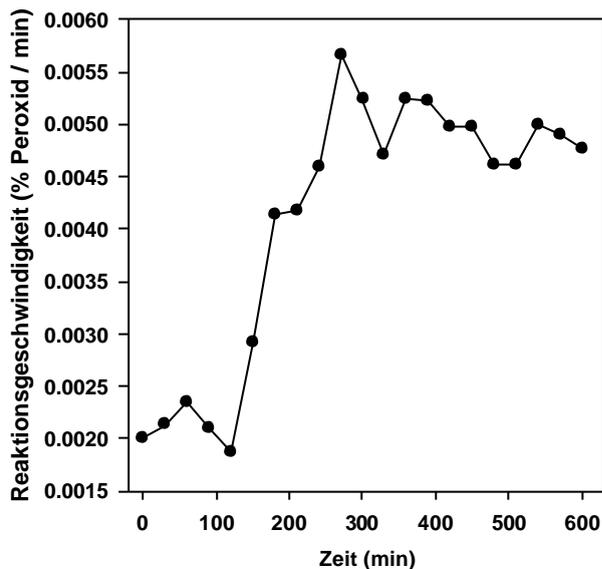
a) 0-210 min: Y-Achsenabschnitt:  $7.89 \cdot 10^{-3}$ , Steigung:  $2.29 \cdot 10^{-3}$ ,  $r^2$ : 0.9897

b) 210-600 min: Y-Achsenabschnitt:  $0.49 \cdot 10^{-3}$ , Steigung:  $4.98 \cdot 10^{-3}$ ,  $r^2$ : 0.9995

Der Korrelationskoeffizient für den Bereich a) läßt vermuten, daß dieses Intervall keinen linearen Verlauf aufzeigt. Der Beweis dafür läßt sich über den Derivatigraphen führen. Dort ist deutlich zu erkennen, daß nach einer kurzen Inhibitionsperiode die Reaktionsgeschwindigkeit stetig ansteigt, bis sie bei 240 Minuten ein Maximum durchläuft.

Anders liegen die Verhältnisse in Abschnitt b): Der Korrelationskoeffizient ist zufriedenstellend hoch, so daß man von Linearität sprechen kann. Weiterhin zeigen die

Meßwerte für die Geschwindigkeit ab 240 Minuten eine Streuung, welche im Rahmen des systematischen Fehlers liegt. Das bedeutet, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb der Fehlergrenzen des Experimentes nicht mehr ändert und somit in diesem Intervall keine Reaktionsbeschleunigung mehr vorliegt. Dies korreliert mit der beobachteten Linearität im Meßgraphen.



**Abbildung 49:** Derivatigraph der Astaxanthin Langzeitmessung

Der Graph für den Abbau des Astaxanthins (Abb. 50) zeigt, daß diese Substanz wesentlich langsamer abgebaut wird als  $\beta$ -Carotin. Während beim  $\beta$ -Carotin nach 5 Stunden nur noch 0.17% der Ausgangsmenge übrig sind, so sind es beim Astaxanthin 14.6%:

Dieses Ergebnis zeigt, daß der antioxidative Effekt einer Substanz nicht proportional mit deren Verbrauch verbunden ist. Wäre dies der Fall, müßte Astaxanthin wesentlich schneller abgebaut werden, als  $\beta$ -Carotin. Vielmehr bestätigt sich die triviale These, daß die Antioxidativität damit zusammenhängt, daß das Antioxidans in möglichst hoher Konzentration über einen möglichst langen Zeitraum im Reaktionsgefäß anwesend sein muß.

Der langsamere Abbau des Astaxanthins kann mehrere Gründe haben:

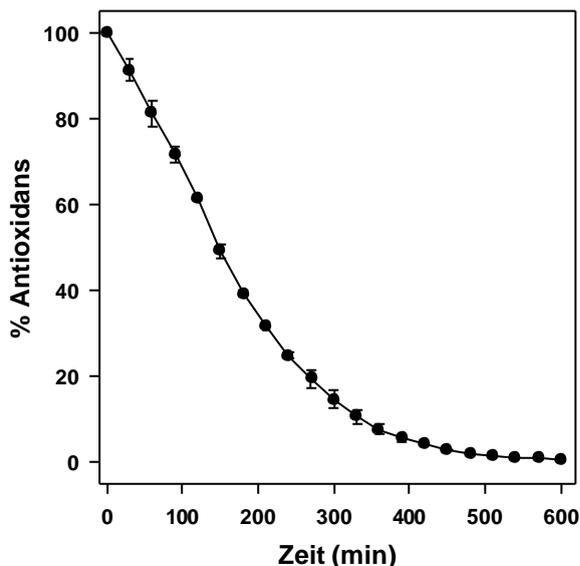
a) Astaxanthin reagiert wesentlich langsamer mit Sauerstoff: Gegen diese Aussage spricht, daß eine Absenkung der Reaktivität des Antioxidans die Reaktions-

wahrscheinlichkeit des Sauerstoffs mit dem Substrat erhöht. Somit wäre der antioxidative Effekt von Astaxanthin wesentlich geringer als beim  $\beta$ -Carotin.

b) Die primären Reaktionsprodukte von Sauerstoff und Astaxanthin sind keine Träger der Kettenreaktion. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die oben beobachteten Effekte. Die Kettenreaktion wird verlangsamt, was in einer verlangsamteten Bildung des Peroxides und einem verlangsamteten Abbau des Astaxanthins resultiert.

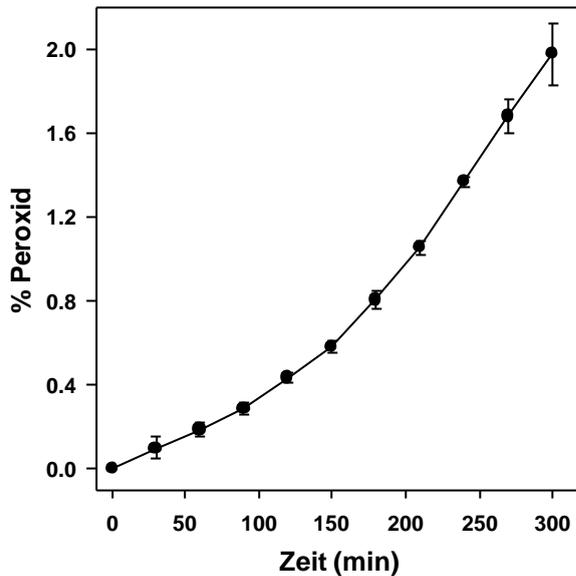
c) Die Abbauprodukte des Astaxanthins sind reaktiver als Astaxanthin selbst: In diesem Fall reagiert zunächst das Astaxanthin zu einem Zwischenprodukt, welches selber als Kettenbrecher wirkt, indem es mit Sauerstoff schneller reagiert, als das Astaxanthin.

Unter den experimentellen Bedingungen war es nicht möglich, Abbauprodukte des Astaxanthins zu isolieren. Deswegen ist es auch nicht möglich, eine Unterscheidung der imaginären Routen b) und c) vorzunehmen.



**Abbildung 50:** Abbau von Astaxanthin im Reaktionssystem

Zum Vergleich der Reaktivität von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin wurde ein weiteres Experiment durchgeführt: Nach Terao [10] beträgt die Anfangsgeschwindigkeit des Abbaus von  $\beta$ -Carotin im Reaktionssystem  $2.5 \mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$ , für Astaxanthin  $1.4 \mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$ . Damit liegt die Abbaugeschwindigkeit des Astaxanthins bei 56% von der des  $\beta$ -Carotins. Im folgenden Experiment wurden deshalb nur 56% der gewöhnlich verwendeten Astaxanthinkonzentration verwendet:



**Abbildung 51:** Unterdrückung der Peroxidbildung von Methyl-oleat durch Astaxanthin mit 56% der gewöhnlich verwendeten Konzentration

**% Methyl-oleathydroperoxid nach 5h :  $1.98 \pm 0.15\%$**

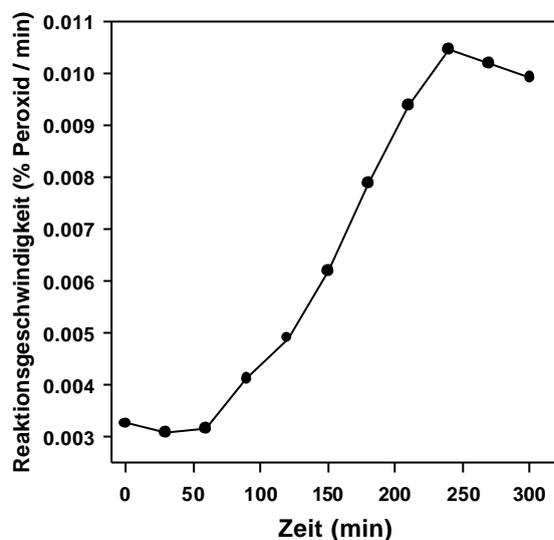
**Referenzexperiment:**

% Methyl-oleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.3 \%$

Der Graph zeigt ganz deutlich, daß eine Verringerung der Konzentration auf den Faktor der relativen Abbauraten von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin keine Deckung in den Meßgraphen erzeugt. Beim Astaxanthin erhält man  $1.98 \pm 0.15\%$  Methyl-oleathydroperoxid nach 5 Stunden, beim  $\beta$ -Carotin liegt der entsprechende Wert bei  $2.88 \pm 0.12 \%$ . Damit zeigt sich noch einmal deutlich, daß kein einfacher Zusammenhang zwischen den Abbaukonstanten der Antioxidantien und deren Wirkungsgrad besteht.

Ein interessanter Effekt zeigt sich bei der Betrachtung des Derivatigraphens:

Die Verringerung der Ausgangskonzentration des Astaxanthins auf 56% des ursprünglichen Wertes bewirkt keine Verschiebung des Zeitpunktes an dem die Reaktion keiner Beschleunigung mehr unterliegt. Damit wäre gezeigt, daß die Anwesenheit von geringen Mengen von Astaxanthin und dessen Reaktionsprodukten die Reaktionsgeschwindigkeit auch abbremst. Bemerkenswert ist auch, daß bei der Verwendung von nur 56% Astaxanthin gegenüber dem Referenzexperiment die Reaktionsgeschwindigkeit sich bei  $0.01 \%$  Peroxid/min einpendelt. Dies entspricht dem doppelten Wert des Experimentes mit 100% Astaxanthin. Im Rahmen des systematische Fehlers kann also gesagt werden, daß eine Halbierung der Antioxidansmenge in einer Verdopplung der Endgeschwindigkeit resultiert.

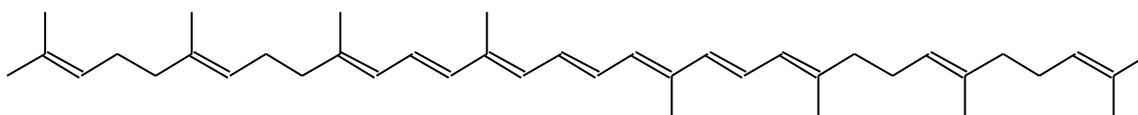


**Abbildung 52:** Derivatigraph der Methyllinoleatperoxidbildung in Gegenwart von 56% Astaxanthin

### 3.5.5. Kohlenwasserstoffe

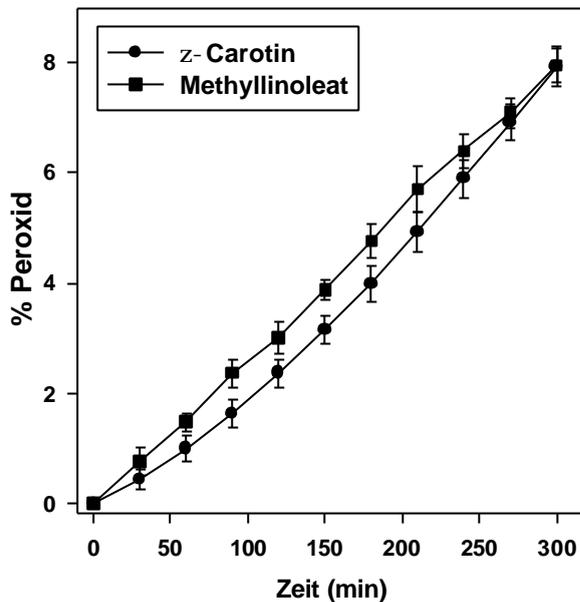
Bei der Meßmethodik mit Methyllinoleat wurden folgende Lycopinderivate untersucht: Tetrathydrolycopin ( $\zeta$ -Carotin) **101**, 13-E,15(Z,E)-Phytoen **102** und 13-Z,15(Z,E)-Phytoen **103**. Aufgrund der extremen strukturellen Ähnlichkeiten dieser Verbindungen werden diese in den Unterpunkten 3.5.5.1-3.5.5.3 einzeln besprochen und im Kapitel 3.7.4.2. noch einmal untereinander verglichen.

#### 3.5.5.1 Tetrahydrolycopin ( $\zeta$ -Carotin)



**Abbildung 53:** Tetrahydrolycopin ( $\zeta$ -Carotin) **101**

Als erstes sei erwähnt, daß die antioxidativen Eigenschaften dieser Substanz mit Abstand die schlechtesten aller untersuchten Verbindungen sind. Die Meßwerte nach fünf Stunden sind im Rahmen der Meßgenauigkeit des Experimentes nicht mehr von denen des Methyllinoleates ohne Zugabe von Antioxidans unterscheidbar. In dem Zeitintervall von 0-240 Minuten sind deutlich antioxidative Effekte zu erkennen: Die Peroxidbildung in Gegenwart von  $\zeta$ -Carotin **101** ist in diesem Zeitintervall geringer als diejenige im Referenzexperiment mit reinem Methyllinoleat.



**Abbildung 54:** Antioxidative Wirkung von  $\zeta$ -Carotin **101** verglichen mit der Peroxidbildung des Methylinoleates ohne Zugabe von Antioxidantien

**% Methylinoleathydroperoxid**

nach 5h :  $7.94 \pm 0.40$  %

**Referenzexperiment:**

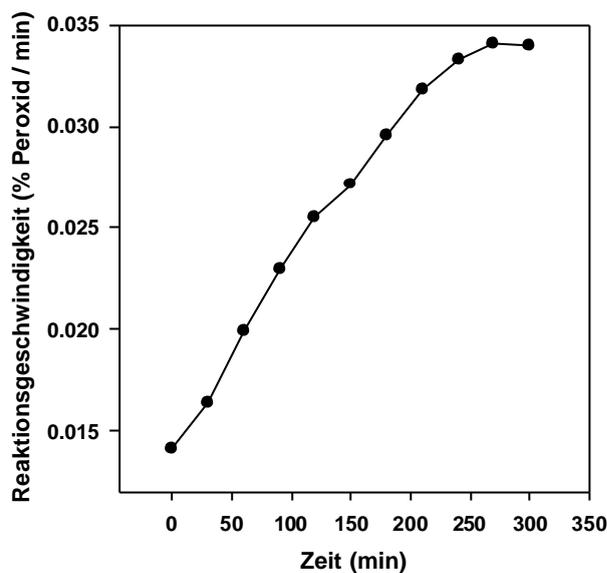
% Methylinoleathydroperoxid

nach 5h :  $7.96 \pm 0.30$  %

$\zeta$ -Carotin **101** ist aber auch eine Verbindung, welche krypto-prooxidative Effekte im Methylinoleatsystem zeigt: Analog zur Definition dieses Begriffes (s. S. 82) sieht man im Graphen zwar antioxidative Effekte, diese werden aber bei längeren Reaktionszeiten von prooxidativen Effekten überkompensiert, so daß sich der Graph von  $\zeta$ -Carotin **101** mit dem von Methylinoleat schneidet.

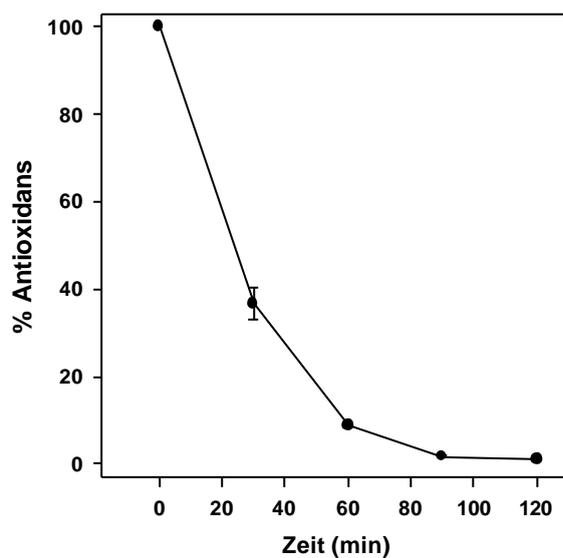
Beim Referenzexperiment schwankte die Geschwindigkeit der Peroxidbildung im Intervall zwischen 0.0221 und 0.033 % Peroxid pro Minute hin und her. Beim  $\zeta$ -Carotin **101** ist dieses Intervall wesentlich enger zu ziehen. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt konsequent an, bis sie nach ca. 240 Minuten einen Grenzwert von 0.033 - 0.034 % Peroxid /min erreicht. Diese erhebliche Verkleinerung der Streuung der Meßwerte läßt darauf schließen, daß beim  $\zeta$ -Carotin **101** Effekte zu berücksichtigen sind, welche dazu führen, daß die Untergrenze des für Methylinoleat ermittelten Geschwindigkeitsintervalls weit überschritten wird.

$\zeta$ -Carotin **101** bzw. dessen Abbauprodukte beschleunigen also die Reaktion bis an die Obergrenze des für Methylinoleat ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitsintervalls und halten diese Geschwindigkeit. Dies entspricht einem minimalen, aber vorhandenem prooxidativen Effekt.



**Abbildung 55:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl- linoleat in Gegenwart von  $\zeta$ -Carotin **101**

Die schlechten antioxidativen Eigenschaften des  $\zeta$ -Carotins **101** zeigen sich auch im Graphen für den Abbau der Substanz im Reaktionssystem: Nach 60 Minuten sind über 90% des  $\zeta$ -Carotins **101** verbraucht. Somit ist  $\zeta$ -Carotin **101** mit Abstand auch das instabilste aller im Methyl- linoleatsystem untersuchten Antioxidantien:

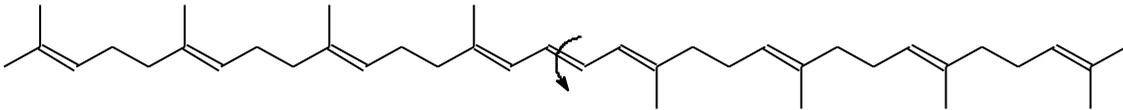


**Abbildung 56:** Abbau von  $\zeta$ -Carotin **101** im Reaktionssystem

Dieses Ergebnis zeichnet schon ab, daß Instabilität des Antioxidans nicht zwingend gute antioxidative Eigenschaften bedeutet. Diese Instabilität, welche man auch als

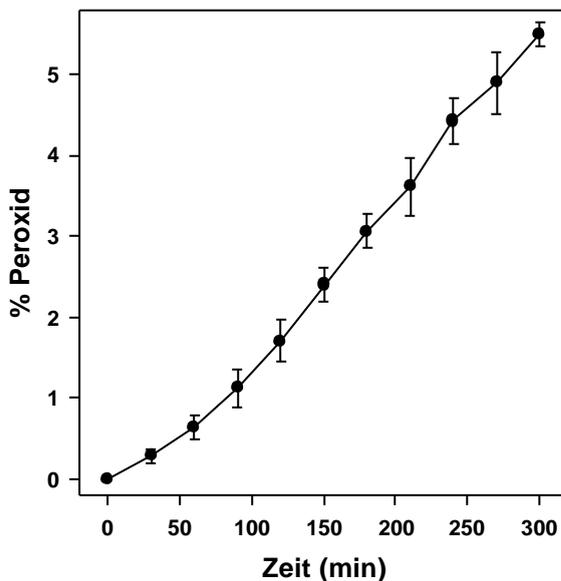
Reaktivität gegenüber Sauerstoff interpretieren kann, bedingt eine Konkurrenzreaktion zur Peroxidbildung am Substrat, kann aber auch, wie beim  $\zeta$ -Carotin **101**, neue Reaktionspfade öffnen, welche dann zu prooxidativen Effekten führen können. Genauere Diskussionen zu dieser Problemstellung werden in Kapitel 3.7.4 abgehandelt.

### 3.5.5.2. 13-*E*,15(*Z,E*)-Phytoen



**Abbildung 57:** 13-*E*,15(*Z,E*)-Phytoen (13-E-P) **102**

Der antioxidative Effekt von 13-*E*,15(*Z,E*)-Phytoen **102**, welches im weiteren als 13-E-P bezeichnet wird, ist zwar wesentlich besser als der von  $\zeta$ -Carotin **101**, aber gleichzeitig immer noch schlechter als der, welcher bei den übrigen Antioxidantien gefunden wurde. Dies ist nicht erstaunlich, da diese Verbindung nur drei Doppelbindungen im konjugierten Polyensystem enthält. Weiterhin hat sich die Zahl der möglichen Abstraktionspositionen, welche zu Allysystemen führen, um acht erhöht.



**Abbildung 58:** Antioxidative Wirkung von 13-*E*,15(*Z,E*)-Phytoen **102**

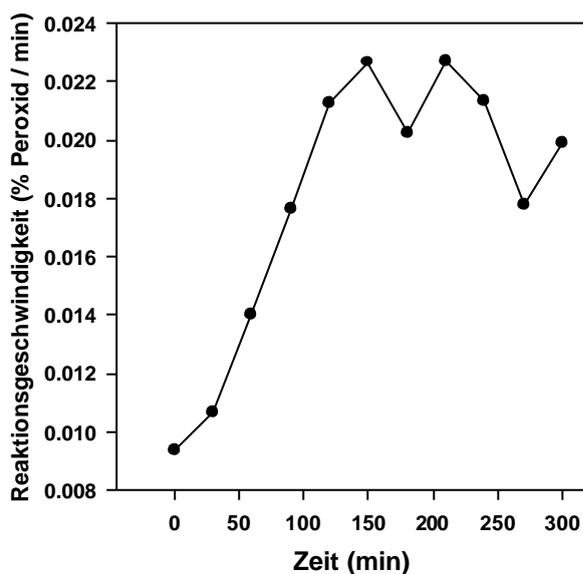
% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $5.50 \pm 0.15$  %

**Referenzexperiment:**

% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.30$  %

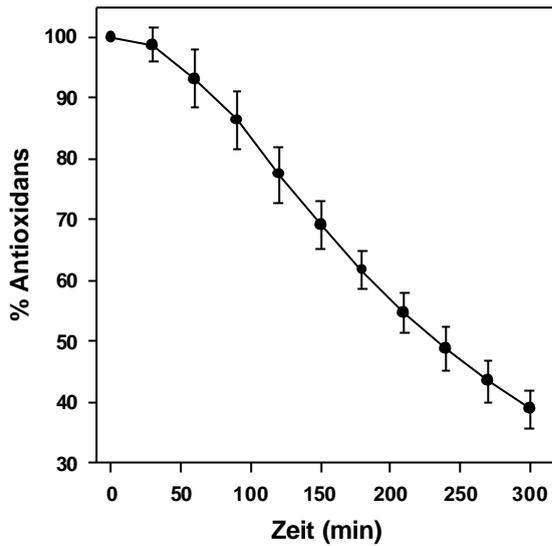
Dem Derivatigraphen kann man direkt entnehmen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nach 120 Minuten die Untergrenze des Reaktionsgeschwindigkeitsintervalls des

Referenzexperimentes erreicht. Auch hier sieht man ab diesem Zeitpunkt eine Streuung in den Meßwerten, welche aber immer noch im Rahmen der Standardabweichung der Experimente liegt. Da der Verlauf des Meßgraphens im Referenzexperiment Linearität aufwies, ist es erlaubt zu sagen, daß der Verlauf der Peroxidbildung beim 13-E-P nach ca. 120 Minuten ebenfalls in eine lineare Funktion übergeht. Die Ergebnisse der linearen Regression für das Intervall von 120-300 Minuten sind: Y-Achsenabschnitt: 0.773, Steigung: 0.021 und Korrelationskoeffizient: 0.997. Verglichen mit der Steigung des Referenzexperimentes von 0.026 kann man immer noch von einem antioxidativen Effekt sprechen. Zwar liegen die Meßwerte immer noch in dem Intervall, welches für ein System ohne Zusatz von Antioxidantien ermittelt wurde, aber nur im unteren Drittel.



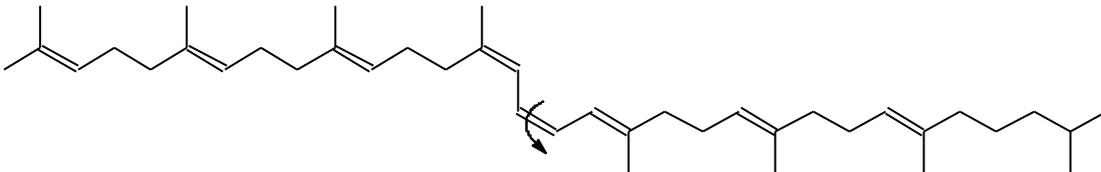
**Abbildung 59:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl- linoleat in Gegenwart von 13-E,15(Z,E)-Phytoen 102

Wenn man den Graphen für den Abbau des 13-E-P betrachtet, sieht man, daß er sehr viel langsamer verläuft als bei den anderen carotinoiden Antioxidantien. Nach 120 min sind noch 77% der Ausgangskonzentration von 13-E-P vorhanden. Daraus kann man schließen, daß 13-E-P zwar eine Konkurrenzreaktion zur Peroxidbildung des Methyl- linoleates anbietet, die Reaktionsgeschwindigkeit aber relativ zum Referenz- experiment nicht schnell genug ist, um einen deutlich wirksamen Schutz gegen die Peroxidation des Substrates zu bewirken.

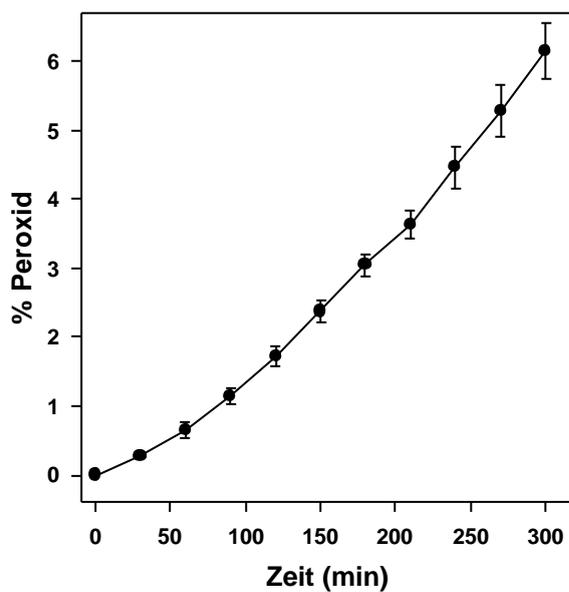


**Abbildung 60:** Abbau des 13-*E*,15(*Z,E*)-Phytoens 102 im Reaktionssystem

### 3.5.5.3 13-*Z*,15(*Z,E*)-Phytoen



**Abbildung 61:** 13-*Z*,15(*Z,E*)-Phytoen (13-*Z*-P) 103

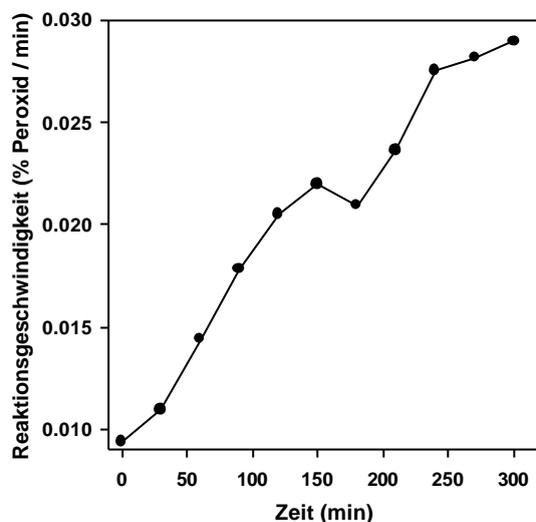


**Abbildung 62:** Antioxidative Wirkung von 13-*Z*,15(*Z,E*)-Phytoen 103

% Methylinoleathydroperoxid  
nach 5h :  $6.15 \pm 0.39$  %

**Referenzexperiment:**

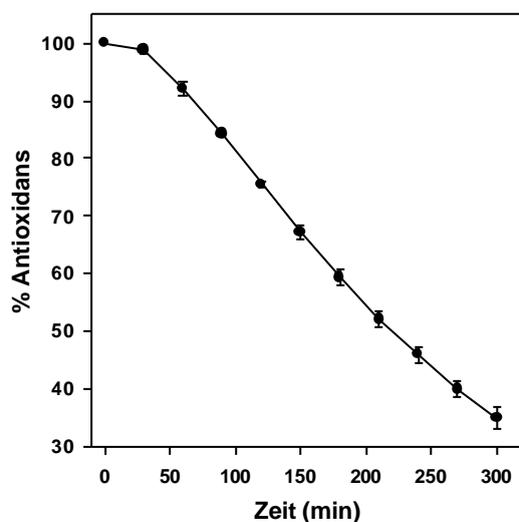
% Methylinoleathydroperoxid  
nach 5h :  $7.96 \pm 0.30$  %



**Abbildung 63:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl- linoleat in Gegenwart von 13-Z,15(Z,E)-Phytoen **103**

Die antioxidative Wirkung des 13-Z-P **103** ist schlechter als die des 13-E-P **102**. Der Derivatigraph durchläuft zwar ein lokales Minimum bei 180 Minuten, steigt dann aber konsequent in den oberen Bereich des Geschwindigkeitsintervalls der Referenzreaktion an. Der Verlauf des Graphen, läßt weiterhin vermuten, daß es bei noch längeren Reaktionszeiten zu krypto-prooxidativen Effekten kommt. Aussagen darüber lassen sich aufgrund der zu kurzen Reaktionszeit jedoch nicht treffen.

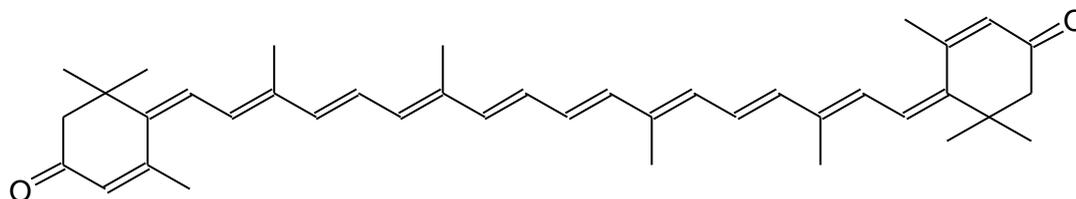
Der Verlauf des Graphens für den Abbau des 13-Z-P **103** zeigt ähnliche Werte wie beim 13-E-P **102**. Auch hier sieht man nur einen sehr langsamen Abbau der Substanz:



**Abbildung 64:** Abbau des 13-Z,15(Z,E)-Phytoens **103** im Reaktionssystem

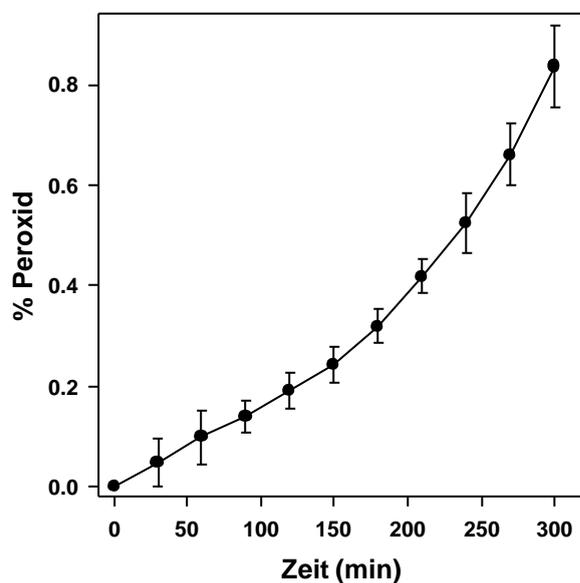
### 3.5.6. Ketocarotinoide

#### 3.5.6.1 Rhodoxanthin



**Abbildung 65:** Rhodoxanthin **104**

Rhodoxanthin **104** ist das einzige Retrocarotinoid der untersuchten Verbindungen. Man kann das  $\pi$ -System dieser Verbindung mit einem vinylog verlängerten Canthaxanthin beschreiben. Da der Unterschied zwischen Astaxanthin und Canthaxanthin nur in den Hydroxylgruppen an den Positionen 3 und 3' im Ring besteht und die antioxidativen Effekte von Astaxanthin und Canthaxanthin im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch sind [10, 11], ist es möglich Rhodoxanthin **104** und Astaxanthin auch direkt miteinander zu vergleichen.



**Abbildung 66:** Antioxidative Wirkung von Rhodoxanthin **104**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $0.84 \pm 0.08\%$**

**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.30\%$**

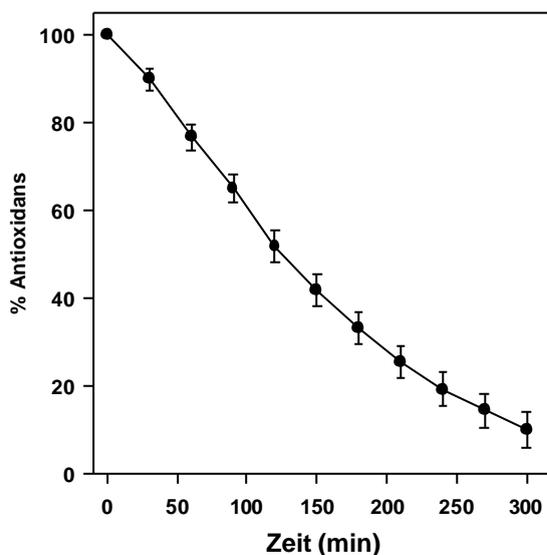
**Astaxanthin:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $0.79 \pm 0.04\%$**

Wie man dem Graphen direkt entnehmen kann, kann im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Unterscheidung zwischen Astaxanthin und Rhodoxanthin **104** vorgenommen werden. Dieses Ergebnis läßt zwei möglich Interpretationen zu:

- 1) Bei Polyensystemen der Länge von Astaxanthin bewirkt die Verlängerung des  $\pi$ -Systems um eine Doppelbindung keinen nennenswerten Effekt.
- 2) Es ist auch möglich, daß der antioxidative Effekt durch die Verlängerung des Polyensystems verstärkt, aber durch die Retrostruktur des Rhodoxanthins wieder kompensiert wird.

Auch der Graph für den Abbau des Rhodoxanthins **104** zeigt ähnliche Ergebnisse wie beim Astaxanthin. Während nach 5h noch  $10.2 \pm 4.1$  % Rhodoxanthin **104** der Ausgangsmenge erhalten sind, liegt dieser Wert für Astaxanthin bei  $14.6 \pm 2.0$  %. Aufgrund der hohen Fehlerbreite ist keine exakte Differenzierung der beiden Substanzen möglich. Die Wirkungsdauer auf das Reaktionssystem kann also bei beiden Verbindungen als identisch angesehen werden. Also zeigt sich auch hier, daß die Verlängerung des  $\pi$ -Systems bzw. die Retrostruktur keinen merkwürdigen Einfluß auf den Abbau des Antioxidans ausübt.



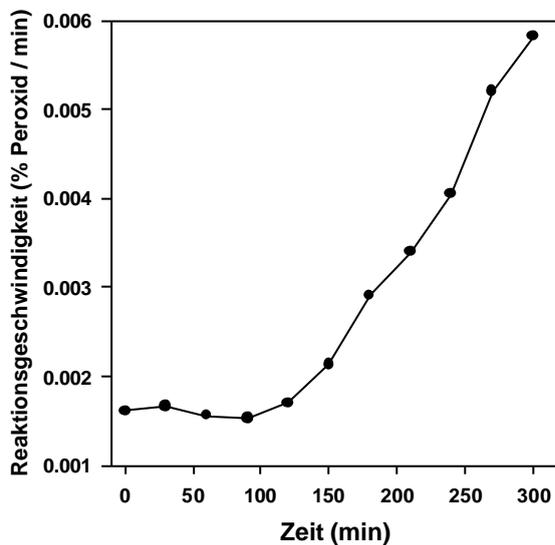
**Abbildung 67:** Abbau des Rhodoxanthins **104** im Reaktionssystem

Anders liegen die Verhältnisse beim Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung des Peroxides (Abb. 68):

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Peroxidbildung beim Astaxanthin beträgt  $0.0021$  %Peroxid/min und fällt innerhalb von 60 Minuten auf einen Wert von  $0.0016$  %Peroxid/min. Beim Rhodoxanthin ist der Starwert  $0.0016$  %Peroxid/min, dafür fällt er aber innerhalb von 90 Minuten nur auf

0.0015 %Peroxid/min. Nach 240 Minuten beginnt die Reaktionsgeschwindigkeit beim Astaxanthin stetig abzunehmen und liegt bei 5h bei 0.0041 %Peroxid/min. Eine Langzeitmessung zeigte, daß dieser Wert sich zwischen 6 und 10 Stunden bei 0.005 %Peroxid/min einpendelt.

Beim Rhodoxanthin **104** wird diese Equilibrierung nicht beobachtet. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt stetig an und beträgt nach 5 h 0.0058 %Peroxid/min. Diese Ergebnisse zeigen also, daß Rhodoxanthin **104** relativ zu Astaxanthin schlechtere Eigenschaften als Antioxidans aufweist, da es zwar auch die Peroxidbildung unterdrückt, aber gleichzeitig ein stetiges Ansteigen der Reaktionsgeschwindigkeit bedingt.



**Abbildung 68:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl-  
linoleat in Gegenwart von  
Rhodoxanthin **104**

Die aus der Interpretation der Meßgraphen formulierten Hypothesen lassen folgende Aussagen zu:

- a) Planarisierungen des  $\pi$ -Systems durch die Einführung einer Retrostruktur bzw. Verlängerungen der Polyenkette um eine Doppelbindung bedingen nicht zwangsweise positive Auswirkungen auf den antioxidativen Effekt eines Carotinoids.
- b) Betrachtet man den Graphen für die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidbildung, kann man sogar sagen, daß es bedenklich ist, die oben genannten Modifikationen vorzunehmen, da durch diese die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidbildung von Rhodoxanthin **104** gegenüber Astaxanthin ansteigt. Diese Beobachtungen lassen darauf

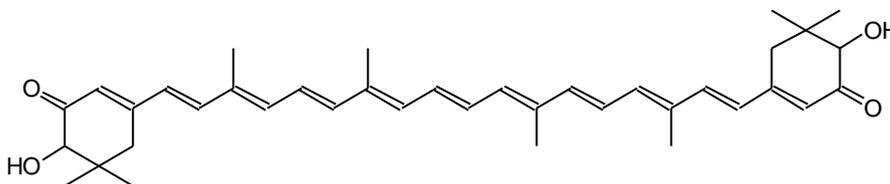
schließen, daß die Abbauprodukte des Rhodoxanthins **104** krypto-prooxidative Effekte relativ zum Astaxanthin verursachen:

a) Der Abbau des Rhodoxanthins **104** ist vergleichbar mit Astaxanthin. Deswegen kann man sagen, daß diese Reaktion über ähnliche Wege wie beim Astaxanthin erfolgt und der Einfluß der Reaktionsintermediate auf diese Prozesse annähernd gleich sein müßte.

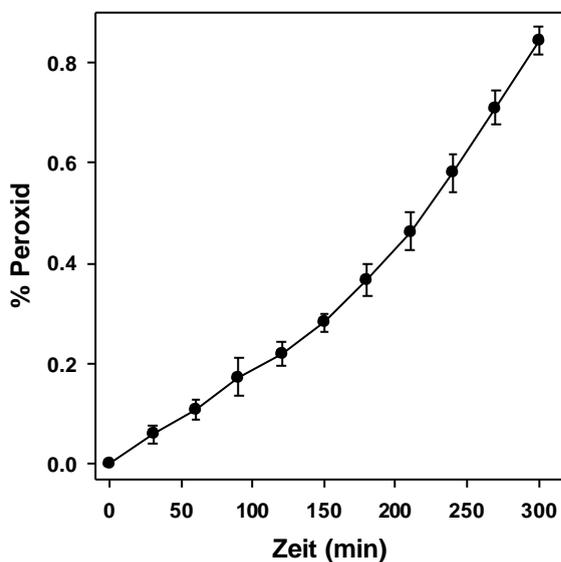
b) Auch die Peroxidbildung im Reaktionsintervall von 0-5 h ist annähernd identisch.

Der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten kann deswegen nur in der Natur der Abbauprodukte liegen, welche beim Rhodoxanthin **104** einer höhere Affinität zum Methylinoleat besitzen als beim Astaxanthin.

### 3.5.6.2. Isonorastaxanthin



**Abbildung 69:** Struktur von Isonorastaxanthin **105**



**Abbildung 70:** Antioxidative Wirkung von Isonorastaxanthin

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $0.84 \pm 0.03$  %**

**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.30$  %**

**Astaxanthin:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $0.79 \pm 0.04$  %**

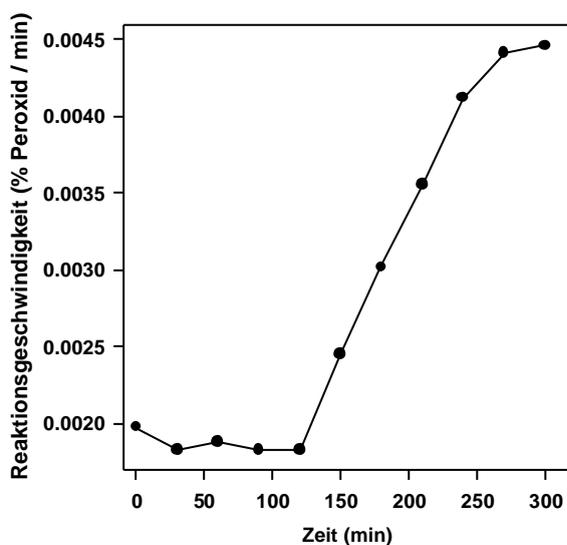
Zur Diskussion der antioxidativen Eigenschaften soll zunächst auf die strukturellen Unterschiede zur Vergleichssubstanz Astaxanthin eingegangen werden: Beim Isonorastaxanthin **105** ist das Polyensystem vollkommen planar. Durch das Fehlen der einzelnen Methylgruppe am Ring wird die Verdrillung zwischen Ring und Kette

komplett aufgehoben. Die Verschiebung der geminalen Methylgruppen bewirkt die Einführung einer allylständigen Methylengruppe in dieser Substanz.

Wie man beim Actinioerythrol **111** (S.124) eindrucksvoll sieht, kann eine Planarisierung des  $\pi$ -Systems zu einem dramatischen Zuwachs der antioxidativen Eigenschaften einer Substanz führen. Methylengruppen, wie sie z.B. beim  $\beta$ -Carotin vorhanden sind, sind dagegen wahrscheinlich Inhibitoren dieses Effektes. (s. dazu 3.7.9.) Beim Isonorastaxanthin **105** bedingt die strukturelle Modifikation gegenüber dem Astaxanthin also zwei Effekte, welche in verschiedene Richtungen bezüglich der Antioxidativität wirken.

Wie man dem Meßgraphen entnehmen kann liegt die antioxidative Wirkung des Isonorastaxanthins im gleichen Bereich wie beim Astaxanthin selbst. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß die beiden oben angesprochenen Effekte sich in diesem Fall kompensieren oder keinen Einfluß auf die antioxidativen Eigenschaften haben.

Ähnliche Ergebnisse erhält man für die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit. Zwar nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidbildung in Gegenwart von Isonorastaxanthin in den ersten 90 min nicht so dramatisch ab, wie beim Astaxanthin, die Endgeschwindigkeit nach 5h liegt trotzdem bei beiden Verbindungen im selben Bereich. Weiterhin sieht man beim Isonorastaxanthin auch die schon beim Astaxanthin beobachtete Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit, welche sich durch ein Abknicken des Graphens bei ca. 240 Minuten bemerkbar macht.

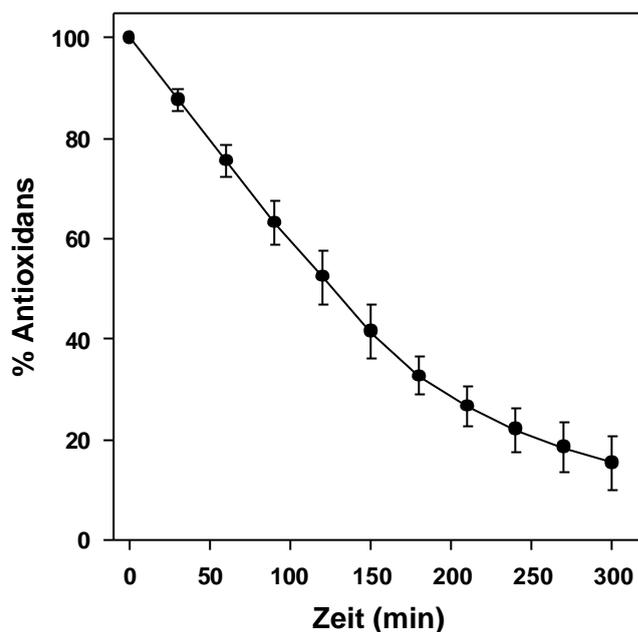


**Abbildung 71:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von Isonorastaxanthin **105**

**Reaktionsgeschwindigkeit nach**

**5h:**  $4,5 \cdot 10^{-3}$  %Peroxid/min  
(Astaxanthin:  $4,1 \cdot 10^{-3}$ )

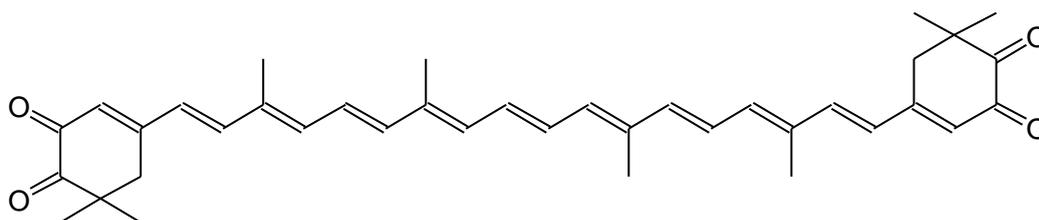
Auch der Abbau des reinen Isonorastaxanthins zeigt dieselben Ergebnisse wie beim Astaxanthin:



**Abbildung 72:** Abbau des Isonorastaxanthins **105** im Reaktionssystem

Diese Ergebnisse sind somit nicht direkt verwendbar für das Aufstellen einer Struktur/Reaktivitätsbeziehung bezüglich des antioxidativen Effektes von Carotinoiden.

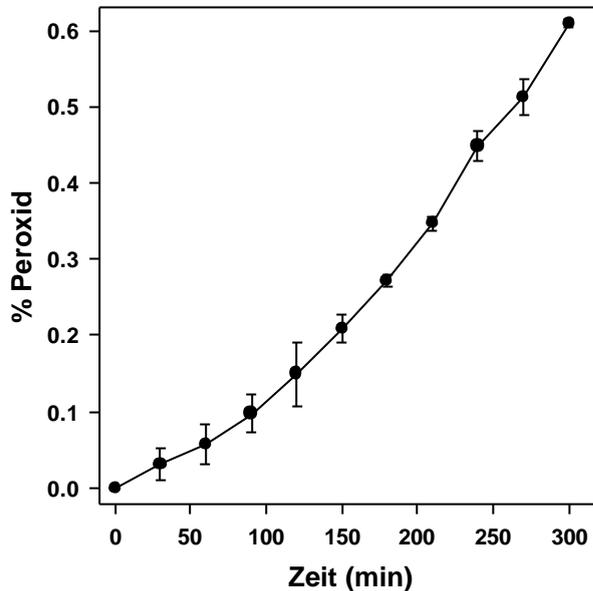
### **3.5.6.3 Isonorastazin**



**Abbildung 73:** Struktur von Isonorastazin **106**

Isonorastazin **106** ist die an beiden Hydroxygruppen oxidierte Form des Isonorastaxanthins. Für die strukturellen Unterschiede zum Astaxanthin gelten sonst dieselben Regeln wie beim Isonorastaxanthin **105**. Diese Substanz zeigt einen deutlich besseren antioxidativen Effekt als Astaxanthin und Isonorastaxanthin. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da die zum Polyensystem konjugierten Carbonylgruppen auch zu den

terminalen Carbonylgruppen konjugiert sind, eine Konjugation des gesamten Systems im klassischen Sinne aber nicht vorhanden ist.



**Abbildung 74:** Antioxidative

Wirkung von Isonorastazin **106**

% Methylinoleathydroperoxid

nach 5h :  $0.61 \pm 0.01$  %

**Referenzexperiment:**

% Methylinoleathydroperoxid

nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %

**Astaxanthin:**

% Methylinoleathydroperoxid

nach 5h :  $0.79 \pm 0.04$  %

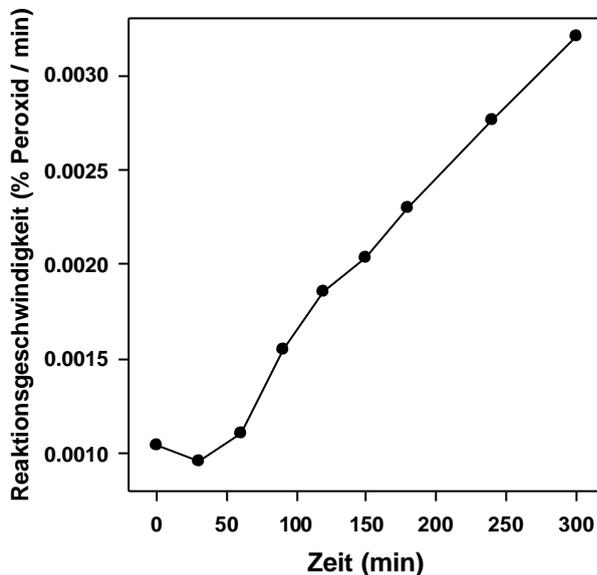
Betrachtet man acyloinische Carotinoide wie z.B. Astaxanthin, Isonorastaxanthin **105** oder Actinioerythrol **111**, so liegt die Vermutung nahe, daß deren hervorragende antioxidative Eigenschaften teilweise durch die Hydroxygruppe hervorgerufen werden. Dieser sekundäre Alkohol ist sehr leicht zu oxidieren. Damit hätte man ein potentiell zweistufiges Antioxidans vorliegen, welches nach der ersten Oxidation der Hydroxygruppe in ein stabiles 1,2-Diketon übergeht, welches selber ein gutes Antioxidans ist. Gegen diese Theorie sprechen zwei experimentelle Beobachtungen:

1) Astaxanthin und Canthaxanthin besitzen nach Terao [10] und Ruck [11] annähernd identische antioxidative Eigenschaften. Wäre der Einfluß der Hydroxygruppe so stark wie oben erwähnt, müßte Astaxanthin deutlich bessere Effekte als Canthaxanthin zeigen.

2) Isonorastazin **106** ist ein wesentlich besseres Antioxidans als Isonorastaxanthin **105**. Nach der oben aufgestellten Hypothese wäre diese Eigenschaft genau umgekehrt.

Interessant ist der Derivatigraph. Während beim Astaxanthin nach 5 Stunden die Maximalgeschwindigkeit erreicht ist, steigt der Graph für Isonorastazin **106** immer noch an, befindet sich aber immer noch unterhalb der Reaktionsgeschwindigkeit von

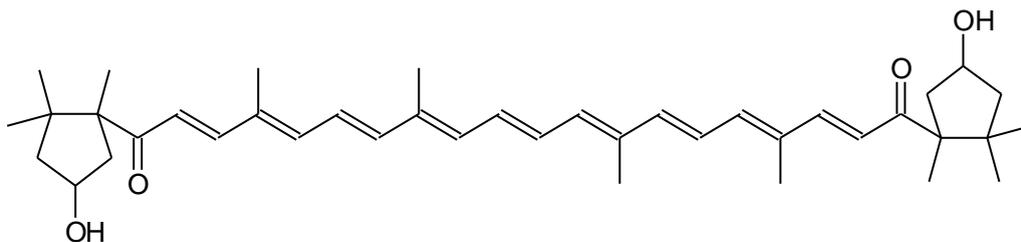
Astaxanthin Dies bedeutet, daß Isonorastazin 106 die Reaktionsgeschwindigkeit selbst absenkt.



**Abbildung 75:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von Isonorastazin 106

Für den Abbau der Reinsubstanz existieren keine Messergebnisse, da das Isonorastazin 106 unter den experimentellen Bedingungen nicht auf der HPLC-Anlage eluiert werden konnte.

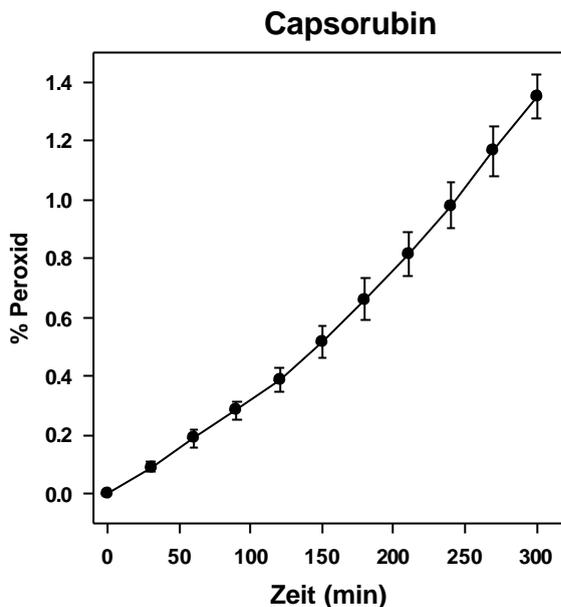
### 3.5.6.4 Capsorubin



**Abbildung 76:** Struktur von Capsorubin 95

Die strukturelle Besonderheit des Capsorubins 95 ist, daß die cyclischen Endgruppen, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Verbindungen, keine Doppelbindungen aus der Konjugation mehr enthalten.

Das Polyensystem kann als mit Sauerstoff überkappter  $\beta$ -Carotin- oder als um zwei Doppelbindungen verkürzter Astaxanthinchromophor aufgefaßt werden. Diese Behandlung der Verbindung korreliert sehr gut mit den Ergebnissen:



**Abbildung 77:** Antioxidative Wirkung von Capsorubin 95

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $1.35 \pm 0.08$  %**

**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %**

Die Aktivität des Capsorubins 95 liegt zwischen der von Astaxanthin und  $\beta$ -Carotin mit deutlicher Nähe zum Astaxanthin: Wie erwartet ist die Aktivität des verkürzten Polyensystems niedriger als beim Astaxanthin (0.56 Prozentpunkte), da die Stabilisierung radikalischer Intermediate des Astaxanthins herabgesetzt wird. Auch der Verlauf des Graphens weist deutliche Ähnlichkeit mit Astaxanthin auf. Man findet auch beim Capsorubin 95 zwei lineare Bereiche für welche lineare Regressionen durchgeführt wurden:

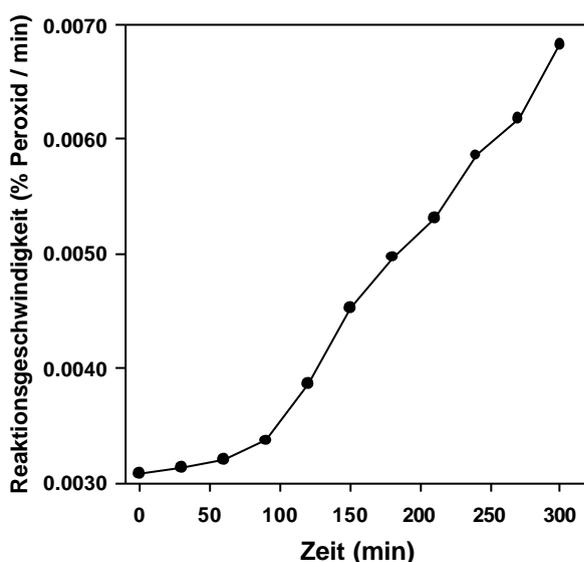
Der erste Bereich geht von 0-120 min (Y-Achsenabschnitt:  $-3.44 \cdot 10^{-3}$ , Steigung:  $3.25 \cdot 10^{-3}$ ,  $r^2$ : 0.9994) der zweite von 120-420 min (Y-Achsenabschnitt:  $-0.339 \cdot 10^{-3}$ , Steigung:  $5.57 \cdot 10^{-3}$ ,  $r^2$ : 0.997). [Anm.: Aus Übersichtsgründen ist der Graph nur bis 300 min dargestellt]

Die gebildete Peroxidmenge ist um 1.53 Prozentpunkte gegenüber  $\beta$ -Carotin abgesenkt. Damit zeigt sich in drastischer Weise der positive Einfluß auf den antioxidativen Effekt, wenn man zwei gleich lange Polyensysteme vergleicht, deren Enden Kohlenstoffatome oder Sauerstoffatome tragen. Also sieht man auch hier wieder, daß der Einfluß von Carbonylgruppen auf den antioxidativen Effekt höher anzusetzen ist, als die Polykettenlänge. Diese Interpretation gilt aber nur, wenn

a) die unkonjugierten Endgruppen des Capsorubins 95 keinen Einfluß auf den beobachteten Effekt ausüben und

b) die Methylen- und Methylgruppen des  $\beta$ -Carotins bezüglich der antioxidativen Eigenschaften inert sind.

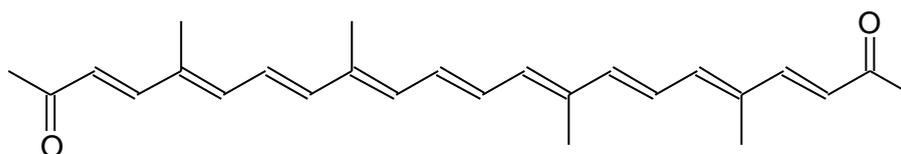
Der Derivatigraph des Capsorubins 95 verläuft anders beim Astaxanthin. Während dort nach ca. 240 Minuten eine Endgeschwindigkeit erreicht ist, steigt der Derivatigraph des Capsorubin 95 weiter stetig an. Ähnliche Effekte wurden bereits beim Isonorastazin 106 und Rhodoxanthin 104 beobachtet und dort abgehandelt.



**Abbildung 78:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von Capsorubin 95

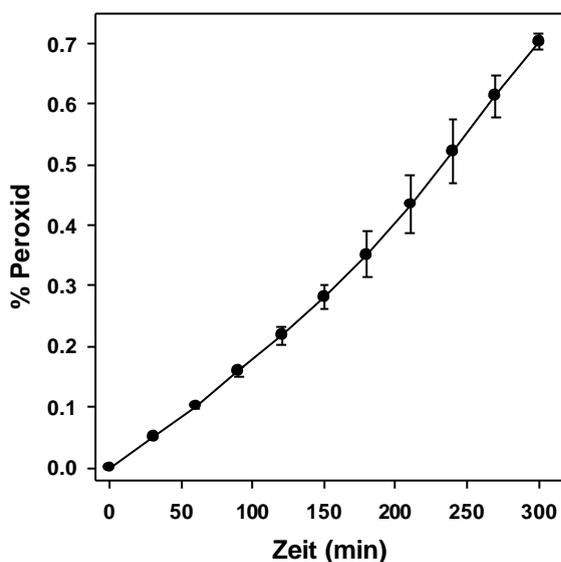
Interessant wäre eine Auftragung des Abbaus des Capsorubins 95 gegen die Zeit. Dieser Abbau ließ sich aber nicht unter den gegebenen Meßbedingungen verfolgen. Der einzige Hinweis auf den Abbau des Capsorubins 95 ist die Zeit, nach welcher die Reaktionslösung vollständig entfärbt war. Die mit bloßem Auge beobachteten Zeiten liegen bei ca. 230 Min (Astaxanthin), 170 min (Capsorubin 95) und 120 min ( $\beta$ -Carotin). Damit korreliert dieser nur grob ermittelte Wert mit den Aussagen, welche in diesem Kapitel über Capsorubin 95 getroffen wurden.

### 3.5.6.5 C<sub>26</sub>-Diketon



**Abbildung 79:** C<sub>26</sub>-Diketon 96

Die Synthese und Untersuchung dieser Verbindung entsprang der Idee, daß der Chromophor des Capsorubins nicht in Konjugation zu den cyclischen Endgruppen steht und somit der antioxidative Effekt des Capsorubin unabhängig von diesen Gruppen sein sollte. Da die Synthese des Capsorubins sehr aufwendig ist, wurde versucht, durch die Synthese von **96** eine Substanz zu erhalten, welche die guten antioxidativen Eigenschaften der Mutterverbindung enthält, aber synthetisch wesentlich leichter zugänglich ist. Die Meßergebnisse für diese Verbindung sind jedoch erstaunlich:



**Abbildung 80:** Antioxidative Wirkung des C<sub>26</sub>-Diketons **96**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 0.70 ± 0.01 %**

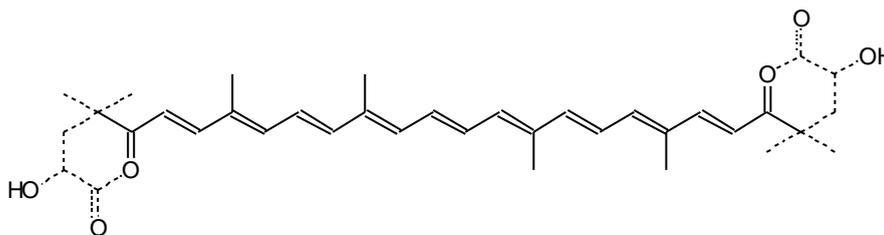
**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 7.96 ± 0.3 %**

**Capsorubin:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 1.35 ± 0.08%**

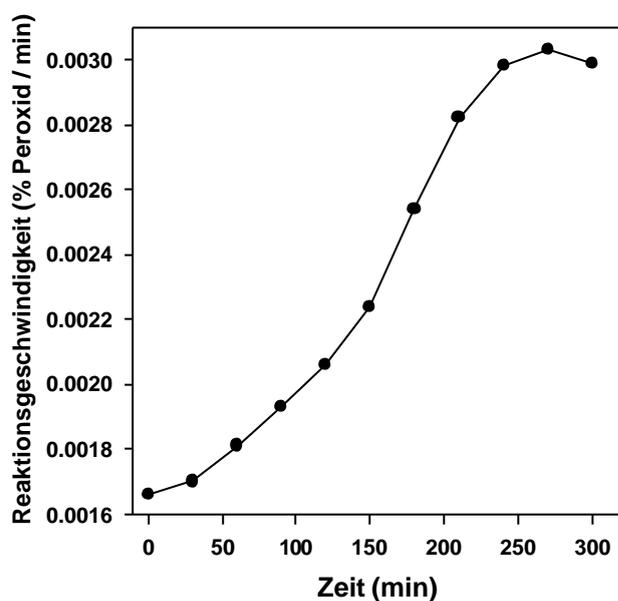
Das Diketon **96** halbiert fast die Peroxidmenge, welche unter identischen Bedingungen in Gegenwart von Capsorubin **95** entsteht. Weiterhin liegen die ermittelten Werte unter denen, welche beim Astaxanthin beobachtet wurden. Dies ist nicht direkt einsichtig, wenn man die Strukturen von Astaxanthin und der Verbindung **96** direkt miteinander vergleicht:



**Abbildung 81:** Strukturkorrelation Astaxanthin und C<sub>26</sub> Diketon **96**

Nach den gängigen Theorien über den Zusammenhang zwischen Polyenkettlänge und antioxidativer Wirksamkeit müßte **96** genauso wie Capsorubin **95** in seiner Wirksamkeit dem Astaxanthin unterlegen sein, da es zwei Doppelbindungen weniger besitzt.

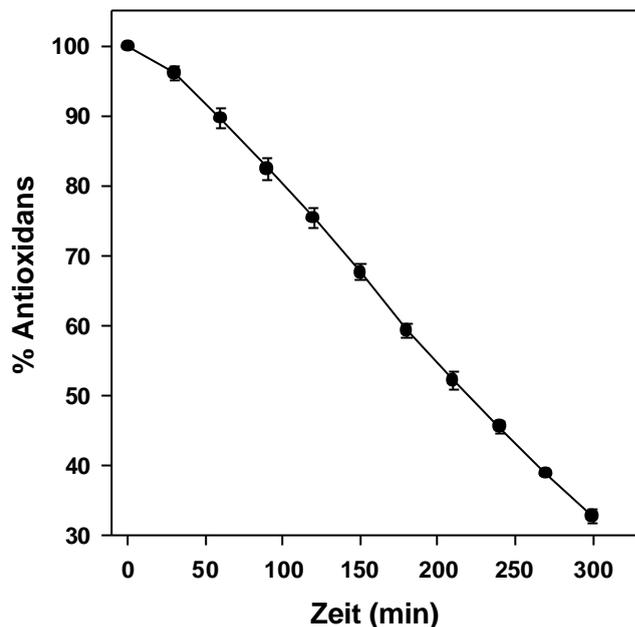
Aber auch im Derivatigraphen sieht man, daß die Endgeschwindigkeit der Peroxidbildung nach 5 Stunden unterhalb der für Astaxanthin ermittelten liegt. Dies deutet auch auf die höhere Wirksamkeit der Verbindung **96** hin. Der Graph selber weist annähernd denselben Verlauf auf, der schon beim Astaxanthin beobachtet wurde.



**Abbildung 82:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyllinoleat in Gegenwart des C<sub>26</sub>-Diketons **96**

Während beim Capsorubin **95** die Meßergebnisse von den Zahlenwerten und Verläufen der Graphen sich im Grenzbereich zwischen Astaxanthin und  $\beta$ -Carotin befanden, zeigen die Kurven für das C<sub>26</sub>-Diketon **96** keine Ähnlichkeit mehr mit  $\beta$ -Carotin. Aber auch die Ähnlichkeit zum Astaxanthin ist stark herabgesetzt. Dies sieht man im Graphen für den Abbau der Verbindung während der Reaktion (Abb. 83).

Der Abbau des C<sub>26</sub>-Diketons **96** verläuft annähernd linear, während beim Astaxanthin der Abbau eher einem logarithmischen Zeitgesetz folgt (s. Abb. 55):



**Abbildung 83:** Abbau des C<sub>26</sub>-Diketon **96** im Reaktionssystem

Die Ergebnisse, welche beim C<sub>26</sub>-Diketon **96** erhalten wurden, lassen also folgende Schlußfolgerungen zu:

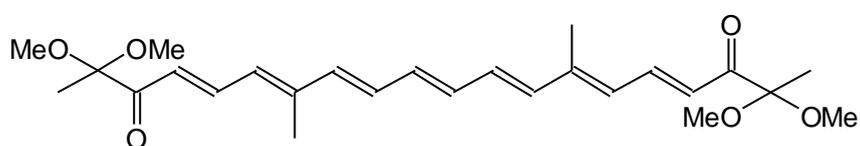
Es ist möglich, daß nichtkonjugierte Molekülteile in den Mechanismus eingreifen können. Der Vergleich von Capsorubin **95** und dem C<sub>26</sub>-Diketon **96** gibt ganz deutliche Hinweise darauf: Der Ring des Capsorubins **95**, welcher in einer ersten Vermutung unwichtig für den antioxidativen Effekt schien, kann theoretisch in der untersuchten Reaktion als Co- bzw. Prooxidative Komponente wirken.

Man muß aber weiterhin berücksichtigen, daß im Capsorubin **95** ein quartäres Kohlenstoffatom direkt an die Ketogruppe gebunden ist. In der Modellverbindung **96** ist es ein primäres Kohlenstoffatom. Beim Astaxanthin befindet sich ein tertiäres Kohlenstoffatom an der nichtpolyenischen Seite der Ketogruppe. Die Hydroxygruppe hat keinen nennenswerten Einfluß auf den antioxidativen Effekt. Dies sieht man in den Arbeiten von Ruck [11] und Terao [10]. Damit liegt die Vermutung nahe, daß das tertiäre Kohlenstoffatom neben der Carbonylgruppe ungünstiger für den antioxidativen Effekt ist, als ein primäres. Zur Verifizierung dieser These wurde ein weiteres Derivat des Capsorubins synthetisiert. Bei dieser Verbindung liegen statt der terminalen Methylgruppen tert.-Butylgruppen vor. Die Struktur dieser Verbindung entspricht eher

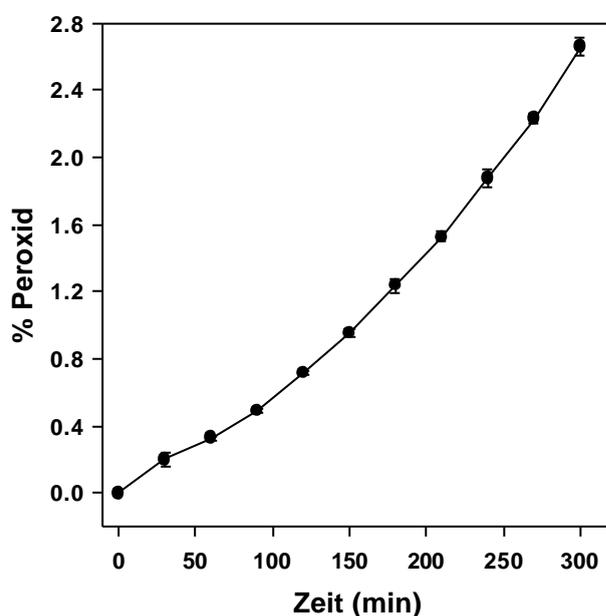
der Struktur des Capsorubin. Meßergebnisse und vergleichende Diskussionen zu den Eigenschaften dieser Verbindung **97** befinden sich in Kapitel 3.6.8.

Das C<sub>26</sub>-Diketon **96** ist eine Schlüsselverbindung für die Aufklärung der Wirkungsmechanismen polyenischer Antioxidantien. Während in der Reihe  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Isonorastazin **106** die Ergebnisse darauf hindeuten, daß die entscheidenden Faktoren Planarität des  $\pi$ -Systems und Art der terminalen Atom sind, bringt das C<sub>26</sub>-Diketon **96** neue Komponenten in die Diskussion ein.

### 3.5.6.6 C<sub>22</sub>-Diketo-Diketal



**Abbildung 84:** C<sub>22</sub>-Diketo-Diketal **107**



**Abbildung 85:** Antioxidative Wirkung von C<sub>22</sub>-Diketo-Diketal

%Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 2.66 ± 0.06 %

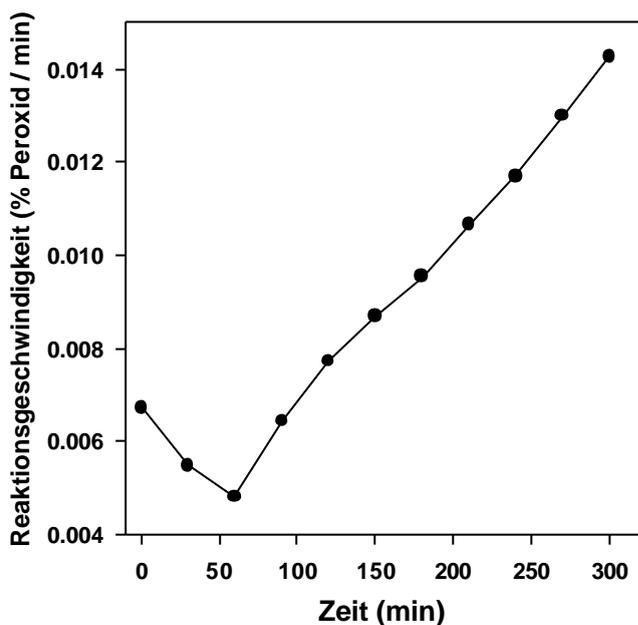
**Referenzexperiment:**

% Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 7.96 ± 0.30 %

Zur Diskussion der Eigenschaften dieser Verbindung ist es am sinnvollsten sie auf Grund ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit mit dem C<sub>26</sub>-Diketon **96** zu vergleichen: Das Polyensystem selbst ist um zwei Doppelbindungen verkürzt. Anzahl und Stellung

der Methylgruppen in der Kette haben sich geändert. Die  $\alpha$ -Allylposition des C<sub>26</sub>-Diketons **96** ist durch die Acetalgruppen blockiert.

Diese Strukturmodifikationen senken die antioxidative Fähigkeit dieser Verbindung stark herab. Zwar liegt die Peroxidmenge immer noch unterhalb von  $\beta$ -Carotin, aber bei weitem nicht in dem Wirksamkeitsbereich, welchen Ketocarotinoide bis jetzt aufwiesen.



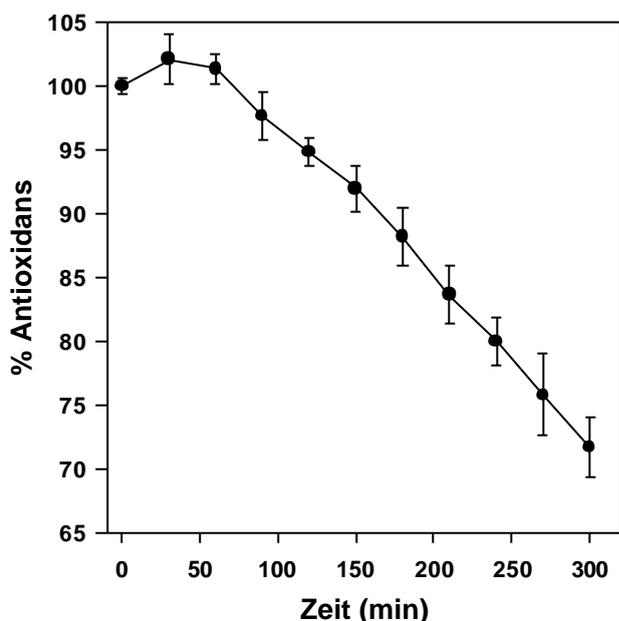
**Abbildung 86:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart des C<sub>22</sub>-Diketone-Diketals **107**

Auch der Derivatigraph ähnelt eher den Graphen für  $\beta$ -Carotin und die untersuchten Lycopinderivate. Zwar sieht man, ähnlich wie beim Astaxanthin, daß die Reaktionsgeschwindigkeit zuerst abfällt und nach Durchlauf eines Minimums wieder ansteigt, der Endwert nach 5 Stunden ist aber um den Faktor 5-10 schneller als bei allen anderen Ketocarotinoiden. Dies bedeutet, daß der Einbau einer Ketogruppe in das Molekül nicht zwangsläufig eine stark erhöhte antioxidative Wirksamkeit zur Folge hat. Zur Erklärung dieses Befundes stehen wieder zwei Möglichkeiten zur Auswahl: a) Erhöhung von potentieller Krypto-Prooxidativität und b) Verringerung der Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen und entsprechenden Intermediaten.

Als erstes sei erwähnt, daß die Blockierung der zwei terminalen Ketogruppen durch Acetale natürlich die Reaktivität gegenüber Sauerstoff erhöht. Ähnlich wie bei Ethern, welche sehr leicht Peroxide bilden können, sind die Methoxygruppen hier als potentielle Peroxidbildner anzusehen. Diese Funktionalität kann natürlich als Cooxidans für eine

Kettenreaktion angesehen werden. Die Peroxidbildung an dieser Stelle würde zu einer Verbindung führen, welche praktisch das identische Absorptionsmaximum haben müßte, wie die Ausgangsverbindung. Während der gesamten Messung wurde aber eine solche Spezies nicht beobachtet. Es ist aber zu berücksichtigen, daß eine cooxidative Spezies auch in katalytischen Mengen in die Peroxidbildung eingreifen kann, in so geringen Mengen, welche mittels HPLC nicht eindeutig detektierbar sind. Auch ist zu berücksichtigen, daß der unwahrscheinliche Fall vorliegt, daß das peroxidierte C<sub>22</sub>-Diketo-Diketol **107** genau so eluiert wird, wie die reine Verbindung.

Die beste Erklärung für die relativ schlechten antioxidativen Eigenschaften der hier untersuchte Verbindung bietet aber der Graph für den Abbau der Reinsubstanz:



**Abbildung 87:** Abbau des C<sub>22</sub>-Diketo-Diketals **107** im Reaktionssystem

Die Reaktivität der Substanz gegenüber Sauerstoff ist sehr gering. Während bei allen anderen polyenischen Verbindungen die Substanz nach 5 Stunden mindestens zu 65% verbraucht war, sind hier nach 5 Stunden noch 72% erhalten! Auch hier zeigt sich wieder, daß kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Abbaugeschwindigkeit des Antioxidans und der antioxidativen Wirksamkeit besteht. [Anmerkung: Ein ähnliches Verhalten weist das  $\alpha$ -Tocopherol auf, dort spielen aber andere Wirkungsmechanismen, welche in Kapitel 3.7.7. diskutiert werden, eine entscheidende Rolle].

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die unerwartet schlechten antioxidativen Eigenschaften dieser Verbindung in Zusammenhang mit ihrer relativen Reaktionsträgheit gegenüber Sauerstoff stehen. Dies ist einsichtig, wenn man überlegt, daß das Polyensystem gegenüber dem C<sub>26</sub>-Diketon **96** um 2 Doppelbindungen und gegenüber den natürlichen Ketocarotinoiden um 4 Doppelbindungen verkürzt ist.

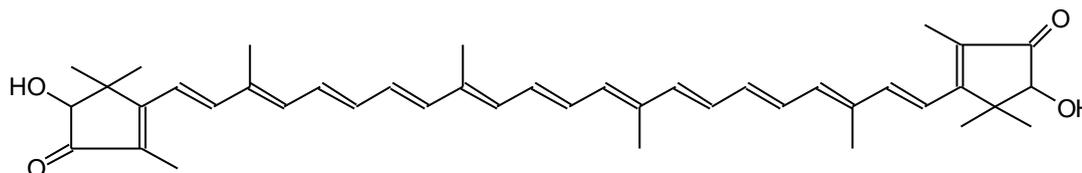
Potentielle Antioxidativität bei Polyenen wird a priori durch drei Faktoren bestimmt: die Möglichkeit zur a) Addition von Sauerstoff, b) Elektronentransferreaktionen und c) Abstraktionsreaktionen. Die Literatur [15] zeigt zwar, daß Additionen von Triplett-Sauerstoff möglich sind, dazu muß aber das Polyensystem hinreichend lang sein. Die dazu durchgeführten Rechnungen, in denen Additionen dieser Art als prinzipiell möglich eingestuft wurden, bezogen sich auf  $\beta$ -Carotin-Synthons, also Moleküle mit vier Doppelbindungen mehr als bei dem hier untersuchten Ketal. Weiterhin steigt mit Verkürzung der konjugierten Polyenkette das Redoxpotential. Damit zeigt sich, daß das C<sub>22</sub>-Diketo-Diketal immer inreaktiver gegenüber Additionsreaktionen von Sauerstoff wird. Damit erhöht sich natürlich auch die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidation des Methylinoleates, was einen abgeschwächten antioxidativen Effekt von **107**, zur Folge hat. [Man muß im Rahmen dieser Diskussion aber auch immer berücksichtigen, daß auch der unwahrscheinliche Fall vorliegen kann, daß das Peroxid des C<sub>22</sub>-Diketo-Diketals **107** genauso wie die Substanz selbst eluiert wird und somit der Abbau der Reinsubstanz scheinbar langsamer verläuft, als es in Wirklichkeit der Fall ist.]

Die Zahl und Stellung der Methylgruppen senkt gleichzeitig die Tendenz von **107** durch Wasserstoffabstraktion als Antioxidans wirken zu können: Bei **107** gibt es nur noch zwei allylische Methylgruppen, damit ist die statistische Abstraktionswahrscheinlichkeit automatisch herabgesetzt. Diese können nach der Abstraktion Allylradikale bilden, welche nur über zwei carbonische Doppelbindungen und eine Ketogruppe mesomeriestabilisiert sind. Beim C<sub>26</sub>-Diketon **96** verläuft diese Stabilisierung über 6 bzw. 8 Doppelbindungen zuzüglich der entsprechenden Ketogruppen. Es zeigt sich also, daß bei **107** eine Wasserstoffabstraktion im Molekül immer unwahrscheinlicher wird. Diese Alternativroute, welche bei genügend langer Konjugation zur Hauptroute werden kann und somit die Abstraktion von Wasserstoff am Methylinoleat vollständig unterdrückt, wird durch die Verringerung der Zahl der konjugierten Doppelbindung stark zurückgedrängt. Es muß aber noch bemerkt werden, daß die Verlängerung der

Konjugation von Doppelbindungen an potentiellen Abstraktionspositionen nicht unbedingt vorteilhaft für den antioxidativen Effekt sein muß. Mögliche Hinweise auf diese Theorie finden sich bei den Verbindungen **108**, **109** und  $\beta$ -Carotin.

Weiterhin fehlen **107** die an der Ketogruppe stehenden Methylgruppen des  $C_{26}$ -Diketons **96**, deren Einfluß nicht eindeutig geklärt ist.

### 3.5.6.7. AE533

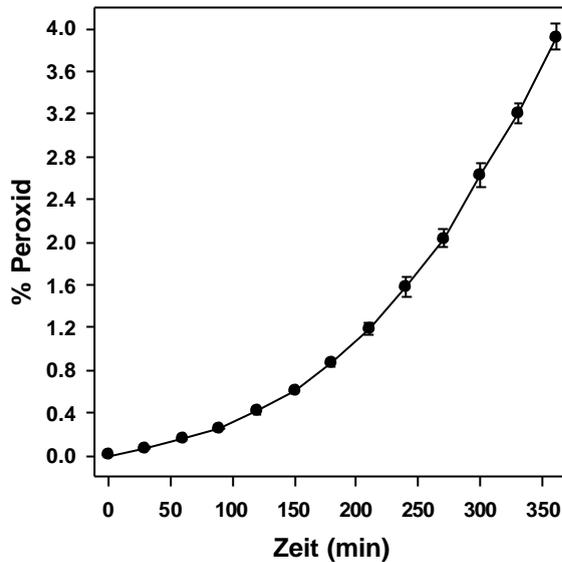


**Abbildung 88:** AE533 **108**

Verbindung **108** ist ein polykettenverlängertes Derivat des Actinioerythrols **111**. Während Actinioerythrol von allen im Methyllinoleatsystem untersuchten Polyenen die besten antioxidativen Eigenschaften hat (s. 3.5.6.10.), kann man **108** nur im mittelmäßigen Wirksamkeitsbereich von  $\beta$ -Carotin ansiedeln.

Hier zeigt sich deutlich, daß die Polykettenlänge nur in gewissen Intervallen modifizierbar ist. Während beim  $C_{26}$ -Diketon **96** eine Verkürzung der Kettenlänge keinen großen Einfluß auf die Wirksamkeit der Verbindung relativ zu Astaxanthin zeigte, beweist **108**, daß eine Verlängerung der Polykette nicht zwangsläufig die antioxidative Wirksamkeit erhöht. Dies ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Kettenverlängerung bei Carotinoiden deren Stabilität beträchtlich herabsetzt [72]. Die Reaktivität gegenüber Sauerstoff wird zwar erhöht, aber die dadurch verringerte Lebensdauer wirkt sich negativ auf den antioxidativen Effekt aus. Für das Design neuartiger Antioxidantien bedeutet dies, daß kettenverlängernde Modifikationen nicht in Betracht gezogen werden müssen, da diese keine bestehenden Effekte verbessern, sondern verschlechtern können.

Erwähnenswert ist auch, daß in der Natur nur sehr wenige Carotinoide auftreten, deren Polyensystem länger ist als beim  $\beta$ -Carotin. Diese deutet darauf hin, daß die Funktionalität der konjugierten Kette an einem Grenzwert angelangt ist. Alle nötigen Eigenschaften sind durch das bestehende System abgedeckt. Verlängerungen können das evolutionsbedingte, ausgependelte Struktur-Reaktivitätssystem zum Einsturz bringen.



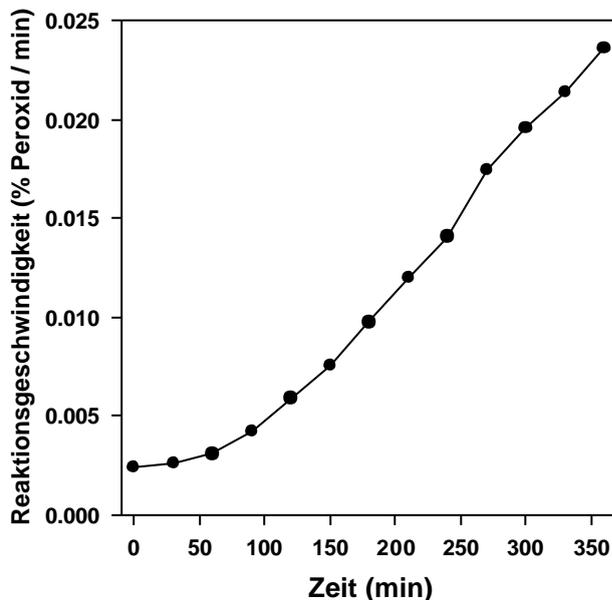
**Abbildung 89:** Antioxidative Wirkung von AE533 **108**

% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $2.64 \pm 0.11$  %

**Referenzexperiment:**

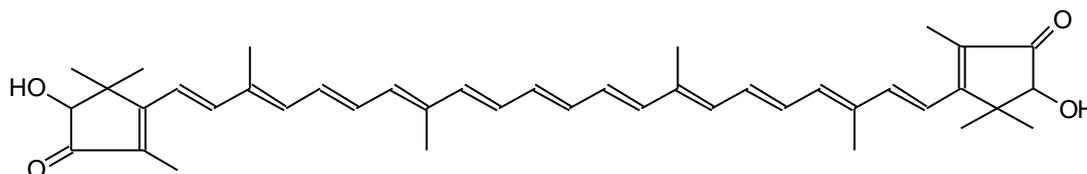
% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.30$  %

Der Derivatigraph der Peroxidbildung unterstreicht noch einmal dieses Ergebnis. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt stetig an und erreicht nach drei Stunden die Untergrenze der Referenzreaktion. Deutlich verringerte Reaktionsgeschwindigkeiten sind nur in den ersten 60 Minuten zu verzeichnen.



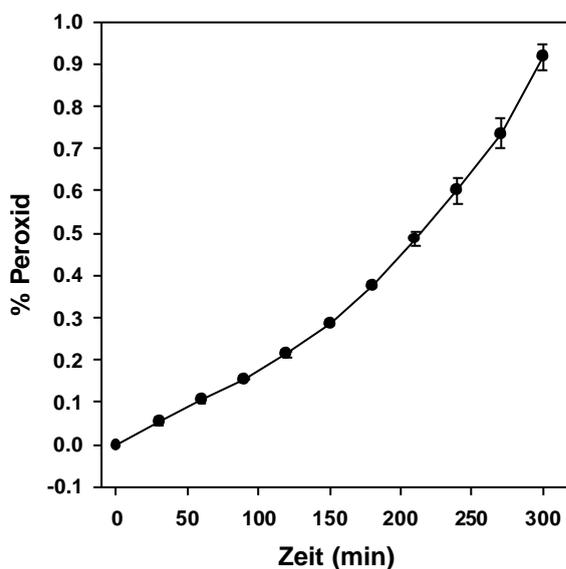
**Abbildung 90:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von AE533 **108**

Es war nicht möglich Graphen für den Abbau der Reinsubstanz zu ermitteln, da unter den gegebenen HPLC-Bedingungen die Substanz nicht sauber eluiert wurde.

**3.5.6.8 AE531****Abbildung 91:** AE531 **109**

Diese Verbindung unterscheidet sich von **108** nur durch die Stellung der Methylgruppen in der Polyenkette. Der antioxidative Effekt von **109** liegt aber im Bereich von Astaxanthin. Zwar wird die hohe Wirksamkeit der Mutterverbindung Actinioerythrol immer noch nicht erreicht, aber trotzdem liegt sie deutlich über der von **108**. Hier bestätigt sich der bei der Diskussion des C<sub>22</sub>-Diketo-Diketals **107** geäußerte Verdacht, daß die Methylgruppenstellung entscheidenden Einfluß auf die Antioxidativität hat.

Diese Ergebnisse geben gleichzeitig auch die Richtlinien für die Synthese von kettenverlängerten Carotinoiden an: Eine Verlängerung der Kette führt zu Instabilitäten im Molekül. Diese können durch geschickte Wahl der Methylgruppenstellungen wieder teilweise kompensiert werden.

**Abbildung 92:** Antioxidative Wirkung von AE531 **109**

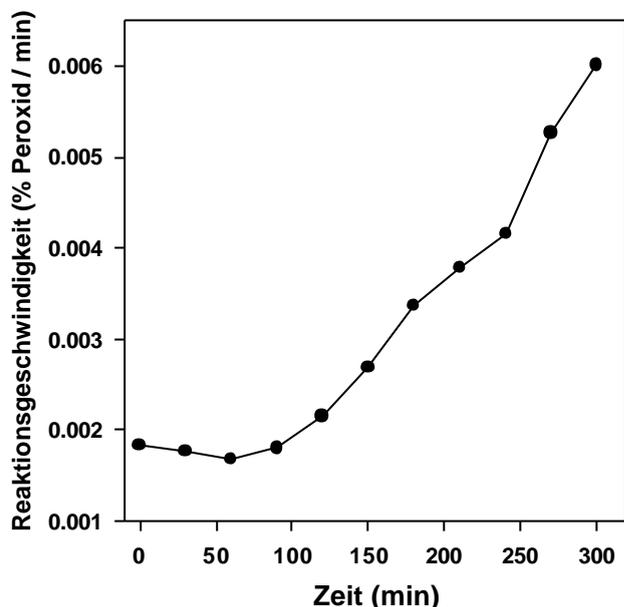
**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :** 0.92 ± 0.03 %

**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :** 7.96 ± 0.3 %

Der Derivatigraph zeigt einen ähnlichen Verlauf wie beim Astaxanthin. Beide durchlaufen ein Minimum und sind nach 5 Stunden noch nicht bei der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes angekommen. Die Reaktionsgeschwindigkeit von **109** ist

entsprechend schneller, was in der schlechteren antioxidativen Wirkung zum Ausdruck kommt.

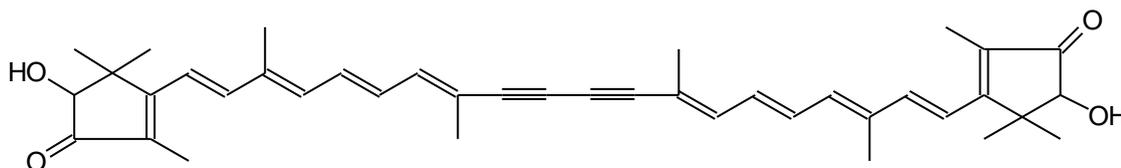


**Abbildung 93:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl-linoleat in Gegenwart von AE531 **109**

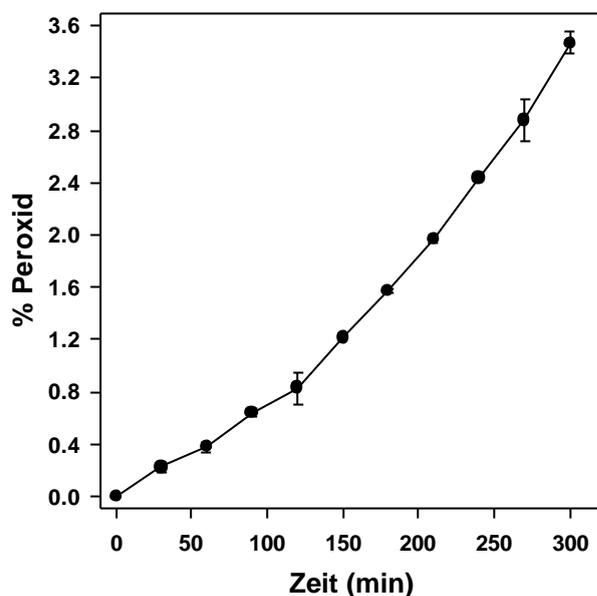
Auch bei **109** war es nicht möglich einen Graphen für den Abbau der Reinsubstanz zu erhalten. Die einzige Aussage, welche man treffen kann, ist daß bei **108** die Lösung nach ca. 100 Minuten vollständig entfärbt war, während dies bei **109** erst nach ca. 200 Minuten geschehen war. Dies zeigt, daß **109** stabiler gegen den Einfluß von Sauerstoff ist als **108**. Bei diesen Verbindungen zeigt sich also wieder eine Korrelation zwischen Stabilität und antioxidativer Eigenschaft.

Da die Verbindungen **108-111**, strukturell sehr ähnlich sind, sich aber in Ihren Effekten sehr stark unterscheiden, ist es nötig diese einer separaten, vergleichenden Diskussion zu unterwerfen. Diese wird in Kapitel 3.7.8. durchgeführt.

### **3.5.6.9 AE467**



**Abbildung 94:** AE467 **110**



**Abbildung 95:** Antioxidative Wirkung von AE 467 **110**

%Methylinoleathydroperoxid nach 5h :

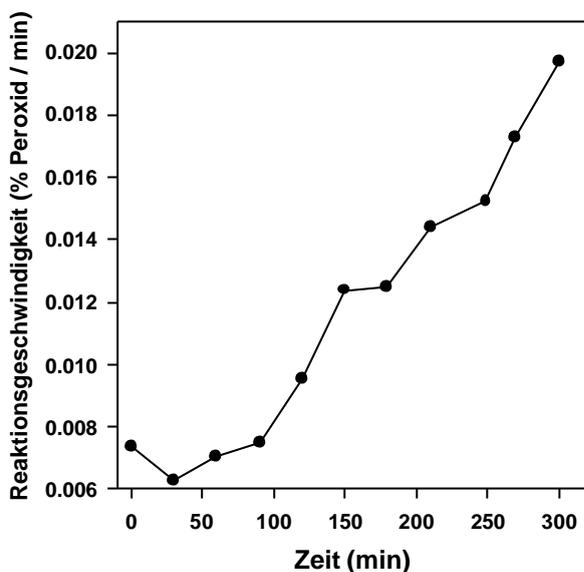
$3.47 \pm 0.08 \%$

**Referenzexperiment:**

% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.30 \%$

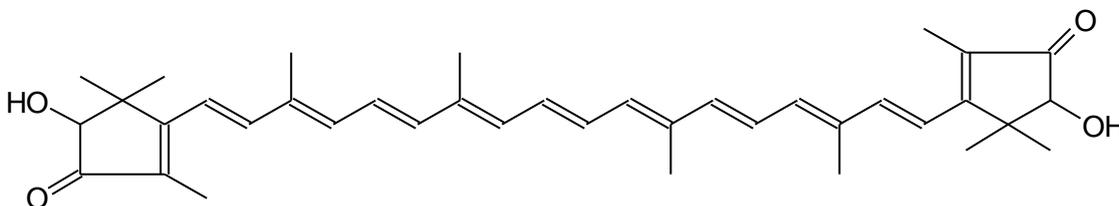
Diese Verbindung ist die einzige aller untersuchten, welche Dreifachbindungen besitzt. Die Stellung der Methylgruppen ist ähnlich wie bei Verbindung **109** und die Anzahl der Mehrfachbindungen in der Polyenkette ist eins höher als beim Actinioerythrol **111**. Die antioxidativen Eigenschaften zeigen, daß die strukturellen Modifikationen den ansonsten guten antioxidativen Effekt der Ketocarotinoide vollständig unterdrücken. Verbindung **110** besitzt nur einen Wirkungsgrad, welcher etwas schlechter als  $\beta$ -Carotin ist. Auch der Derivatigraph zeigt, daß nach 5 Stunden der Bereich der Geschwindigkeit der Peroxidbildung des Referenzexperimentes erreicht ist (Abb. 96).

Das entscheidende Strukturelement für diese Ergebnisse dürfte durch die Dreifachbindungen bedingt sein. Diese können die Kette so stark linearisieren, daß die Methylgruppen den Angriff des Sauerstoffs in der Kette nicht mehr ausreichend abschirmen können. Diese sterische Entlastung des Angriffes kann dazu führen, daß die Wahrscheinlichkeit eines Angriffes in der Kette wahrscheinlicher wird. Weiterhin sind Dreifachbindungen Orte sehr hoher Elektronendichte. Die elektrophilen Radikale haben eine sehr viel höhere Tendenz diese Bindungen anzugreifen, als es bei den übrigen Polyensystemen der Fall ist. Daß **110** trotzdem noch ein relativ gutes Antioxidans ist, kann nur mit dem Vorhandensein der Actinioerythrolendgruppe erklärt werden.



**Abbildung 96:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl-  
linoleat in Gegenwart von  
AE467 **110**

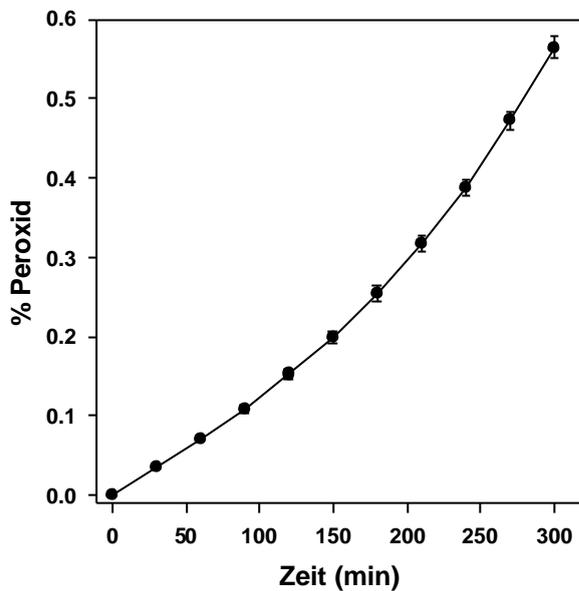
### 3.5.6.10 Actinioerythrol



**Abbildung 97:** Struktur von Actinioerythrol **111**

Actinioerythrol besitzt von allen untersuchten natürlich vorkommenden Carotinoiden das höchste antioxidative Potential. Vergleicht man Actinioerythrol strukturell mit Astaxanthin, so unterscheiden sich diese Verbindungen nur durch das Fehlen von jeweils einer Methylen-*einheit* in der cyclischen Endgruppen des Actinioerythrols. Diese Modifikation bewirkt, daß die Verdrillung zwischen Ring und Kette praktisch vollständig aufgehoben wird und das  $\pi$ -System komplett planarisiert wird. Diese Planarisierung kann aber nicht der einzige Grund für die extrem gute Wirksamkeit des Actinioerythrols sein. Betrachtet man Isonorastaxantin, so liegt dort auch eine Planarisierung des  $\pi$ -Systems vor. Trotzdem ist diese Verbindung von ihrer Wirkung her etwas schlechter als das Astaxanthin selbst. Dabei ist aber zu beachten, daß im

Isonorastaxanthin eine allylische Methylengruppe vorliegt, welche einen direkten Vergleich erschwert. Genauere Diskussionen zu diesem Problem findet man unter Punkt 3.5.6.2 bei der Diskussion des Isonorastaxanthins.



**Abbildung 98:** Antioxidative Wirkung von Actinioerythrol

**111**

%

**Methylinoleathydroperoxid**

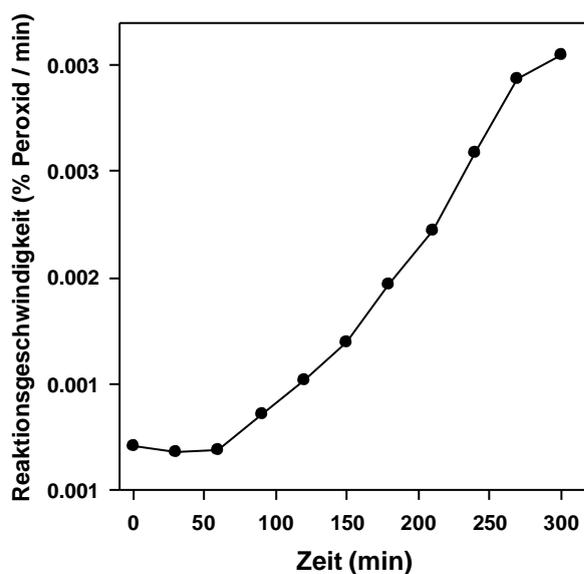
**nach 5h :  $0.56 \pm 0.01$  %**

**Referenzexperiment:**

% Methylinoleathydroperoxid

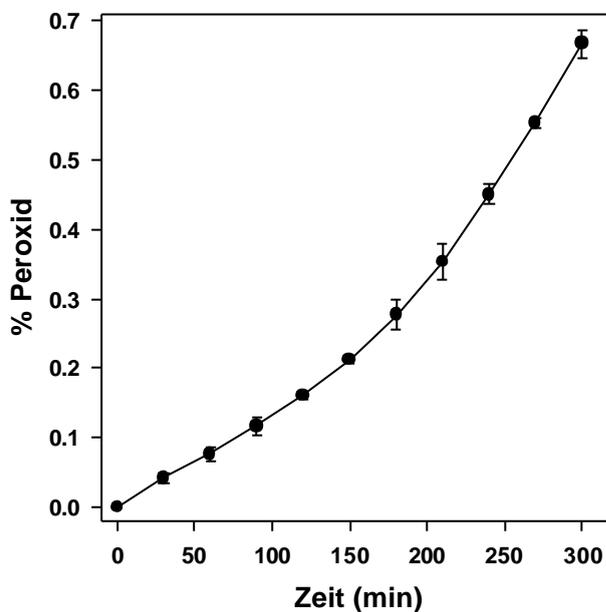
nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %

Der Derivatigraph zeigt, ähnlich wie beim Isonorastazin zunächst einen kleinen Abfall, um dann langsam aber stetig wieder anzusteigen: Die nach 5 Stunden erreichte Reaktionsgeschwindigkeit beträgt nur ein siebtel von der des Referenzexperimentes.



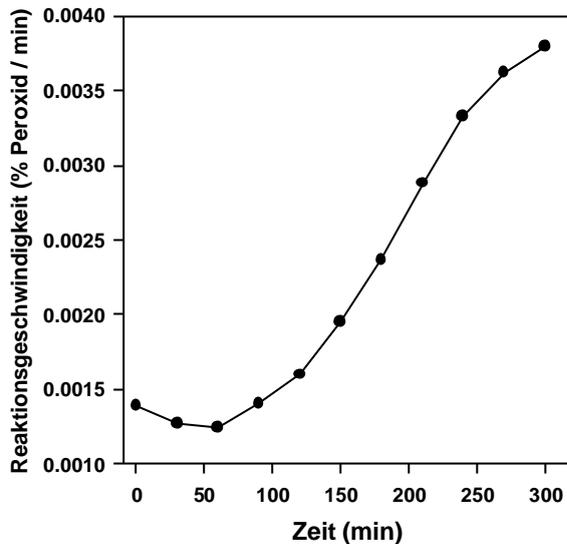
**Abbildung 99:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von Actinioerythrol **111**

Für den Abbau der Reinsubstanz wurden in hier vorgelegten Messungen keine Daten aufgenommen. Vorexperimente zeigten, daß der Abbau des Actinioerythrol **111** ohne Gegenwart von Methylinoleat logarithmisch verläuft. Eine Linearisierung der Auftragung der Menge Actinioerythrol **111** gegen die Zeit ergab eine Steigung von  $1.0\mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$ . Die Abbaukonstante für Astaxanthin wurde von Terao [10] mit  $1.4\mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$  angegeben. Aufgrund der Verkleinerung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde ein Experiment mit Actinioerythrol **111** gemacht, in dem nur 70% der üblichen Peroxidmenge verwendet wurden ( $1.0/1.4 = 0.71$ ). (Ein ähnlich naives Modell wurde bereits beim Vergleich von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin herangezogen.)



**Abbildung 100:** Antioxidative Wirkung von Actinioerythrol **111** bei 70% der normalen Konzentration

Während sich beim Astaxanthin die Menge des gebildeten Peroxides um den Faktor 2.5 erhöhte, beträgt dieser Faktor beim Actinioerythrol **111** nur 1.2. Damit wäre gezeigt, daß kein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration des Antioxidans und seiner Wirksamkeit besteht, ansonsten würde bei den verringerten Konzentration bei Astaxanthin weniger und bei Actinioerythrol **111** mehr Peroxid gebildet. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß gewisse Grenzkonzentrationen benötigt werden, um starke antioxidative Effekte auszulösen. Kleine Variationen der Antioxidansmengen in diesen Bereichen verringern die Wirksamkeit nur schwach, größere Variationen verschlechtern die Eigenschaften in nicht-linearen Dimensionen.



**Abbildung 101:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl-linoleat in Gegenwart von 70% Actinioerythrol **111** gegenüber der sonst verwendeten Konzentration

Der Vergleich des Derivatigraphens dieser Messung mit der Messung bei der Standardkonzentration bringt ein interessantes Ergebnis: In dem Intervall, in welchem beide Derivatigraphen stark anzusteigen beginnen (150-300 min) wird der Quotient aus den Reaktionsgeschwindigkeiten der Experimente mit reduzierter Konzentration und den Experimenten mit der standardmäßig verwendeten Konzentration gebildet. Beim Actinioerythrol **111** ergibt sich ein Faktor von  $1.24 \pm 0.06$ . Dieselbe Rechnung wird für Astaxanthin durchgeführt. Dort ergibt sich ein Faktor von  $2.67 \pm 0.16$ . Diese Faktoren sind im Rahmen des systematischen Fehlers identisch mit den Faktoren für die Vergrößerung der gebildeten Peroxidmengen nach 5 Stunden (s.o.) gegenüber den Experimenten mit der gewöhnlich verwendeten Konzentration. Daraus lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

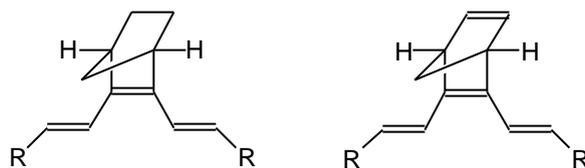
Die Erhöhung der Menge des polyenischen Antioxidans bewirkt zunächst eine Parallelverschiebung des Einsetzens der Peroxidbildung hin zu höheren Zeiten, hat aber auch gleichzeitig einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die relativen Parallelverschiebungen liegen bei den strukturell ähnlichen Carotinoiden, die einem autokatalytischen Abbau unterworfen sind, im Bereich der Unterschiede in den Lebensdauern dieser Verbindungen. Zu Zeitpunkten, wenn die Carotinoidkonzentration gewisse Grenzwerte unterschreitet (meist bei 30-40% der Ausgangskonzentration) steigt die Reaktionsgeschwindigkeit stark an. Die Experimente mit variablen Konzentrationen zeigen zusätzlich, daß die Geschwindigkeit im Steigungsbereich des Graphens von der

Basiskonzentration abhängig ist. In diesem Bereich müssen, wie bereits erwähnt, die Abbauprodukte den antioxidativen Effekt steuern.

Die Tatsache, daß sich die Mengen der gebildeten Peroxide und die Reaktionsgeschwindigkeiten in gleicher Weise durch die Variation der Antioxidanskonzentration ändern, weisen stark darauf hin, daß die zeitliche Parallelverschiebung des Einsetzens der Peroxidbildung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Entscheidend ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Steigungsbereich!

### **3.5.7 Carotinoide mit Z-fixierten zentralen Doppelbindungen**

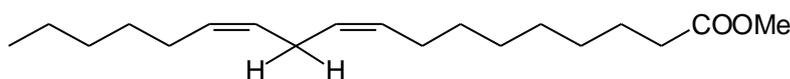
Die folgenden sechs Verbindungen werden paarweise besprochen. Die entscheidenden Strukturelemente sind die durch einen [2.2.1]-Bicyclus fixierten zentralen Doppelbindungen:



**Abbildung 102:** Zentralbausteine der Verbindung **112-117**

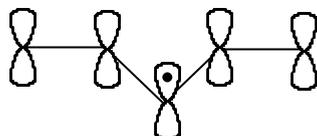
Die Ergebnisse der Messungen geben Aufschluß über mehrere Faktoren:

- 1) Einfluß von Z-Doppelbindungen im Molekül
- 2) Die in Abb. 102 eingezeichneten Wasserstoffatome besitzen, thermodynamisch betrachtet, eine potentiell höhere Abstraktionstendenz als die Wasserstoffatome in allen bislang untersuchten Verbindungen, da sie sich an tertiären Kohlenstoffatomen befinden. Besonders in den unhydrierten Verbindungen **113**, **115** und **117** ist diese Tendenz durch die exocyclische Doppelbindung noch einmal erhöht. Dieses Strukturelement ähnelt dem Methylinooleat, wo sich die potentiell am leichtesten abstrahierbaren Wasserstoffatome aber nur an einem sekundären Kohlenstoffatom befinden:



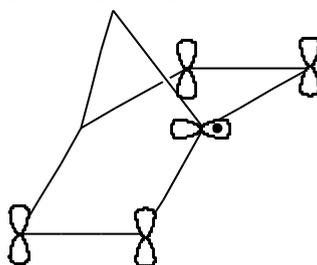
**Abbildung 103:** Methylinooleat mit expliziter Kennzeichnung der acidesten Wasserstoffatome

Bezüglich der Abstraktion müssen aber noch zusätzlich die Orbitalstellungen an den Methylengruppen berücksichtigt werden: Abstrahiert man im Methyllinoleat ein Proton, so ergibt sich folgende Stellung der p-Orbitale:



**Abbildung 104:** Geometrische Lage der p-Orbitale im Methyllinoleat (ohne Berücksichtigung von Koeffizientengröße und Vorzeichen) nach Abstraktion des Wasserstoffatoms der zentralen Methylengruppe

Bei den bicyclischen Verbindungen liegt folgende Geometrie zu Grunde:



**Abbildung 105:** Geometrische Lage der p-Orbitale in einem [2.2.1]-Bicyclus (ohne Berücksichtigung von Koeffizientengröße und Vorzeichen) nach Abstraktion eines Brückenkopfwasserstoffatoms

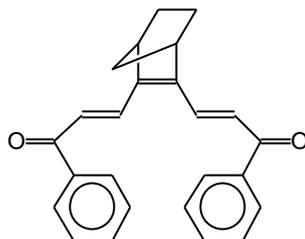
Beim Methyllinoleat ist eine sehr gute Geometrie für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vorhanden. Zur Ausbildung einer Mesomeriestabilisierung muß das  $\sigma$ -Gerüst nicht verdrillt werden. Die p-Orbitale stehen so günstig, daß eine direkte Überlappung möglich ist.

Bei den Bicyclen ist das Orbital in dem sich das freie Elektron befindet um ca.  $90^\circ$  gegenüber den p-Orbitalen verdrillt. Dadurch ist die Überlappung und die damit verbundene Ausbildung einer Mesomerie gestört. Damit wird die Abstraktionstendenz an den Brückenkopfwasserstoffatomen wieder abgesenkt.

Durch diesen Sachverhalt ist es unmöglich eine exakte Voraussage zu treffen, ob die Abstraktion von Wasserstoffen im Methyllinoleat oder in den bicyclischen Verbindungen leichter von statten geht.

### 3) Einfluß der homokonjugierten, exocyclischen Doppelbindung

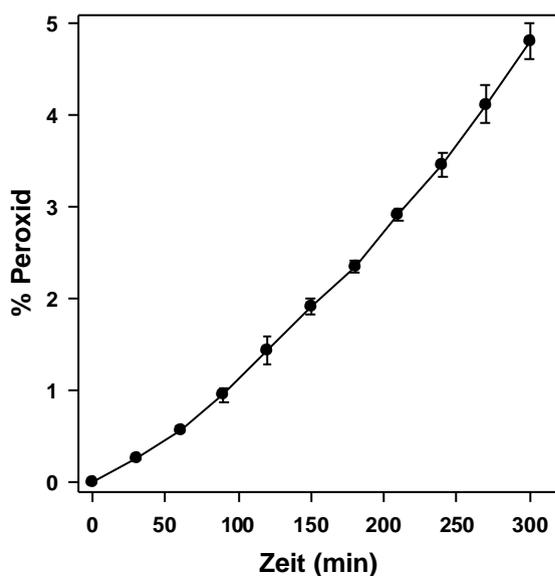
### 3.5.7.1 HDBH



**Abbildung 106:** Struktur von HDBH **112**

**112** hat, abgesehen von den Phythoenen, das kürzeste  $\pi$ -System aller untersuchten Verbindungen. Erzeugt man ein Radikal in der Polyenkette, so kann das freie Elektronen sich nur innerhalb des Polyensystems delokalisieren. Bei keiner der im klassischen Sinne formulierbaren Grenzformeln befindet sich das Elektron in den aromatischen Ringen. Daraus ist zu schließen, daß diese praktisch keinen Einfluß auf die Radikalstabilisierung haben dürften.

Diese Überlegungen decken sich auch mit den Ergebnissen. **112** ist ein schlechtes Antioxidans. Zwar ist ein antioxidativer Effekt zu verzeichnen, aber die gebildete Peroxidmengen in Gegenwart von **112** ist fast doppelt so hoch wie beim  $\beta$ -Carotin ( $2.88 \pm 0.12$  %Peroxid nach 5h), welches nur im mittelmäßigen Wirkungsbereich angesiedelt wurde.



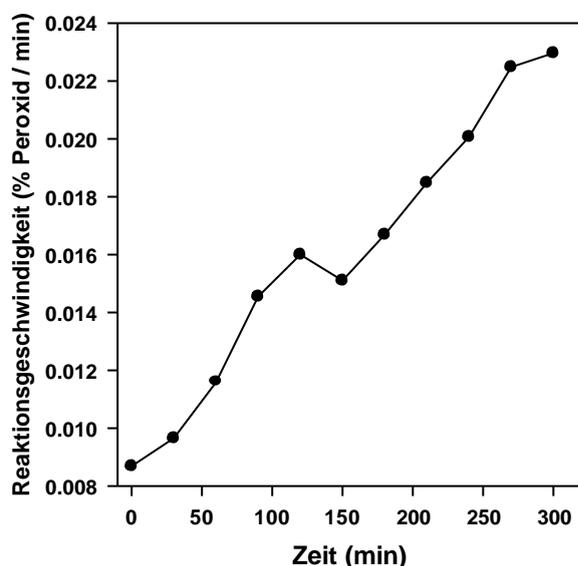
**Abbildung 107:** Antioxidative Wirkung von HDBH **112**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $4.82 \pm 0.20$  %**

**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :  $7.96 \pm 0.30$  %**

Der Derivatigraph unterstreicht noch einmal dieses Ergebnis. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt langsam aber stetig an und liegt nach vier Stunden im Bereich des Referenzexperimentes.



**Abbildung 108:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von HDBH 112

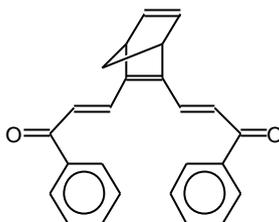
Diese Befunde sind nicht erstaunlich, da bereits bewiesen wurde, daß das Polyensystem eine gewisse Mindestlänge besitzen muß, um überhaupt antioxidative Wirksamkeit zu zeigen. Dies zeigte sich bereits beim Phythoen, welches nur drei konjugierte Doppelbindungen aufwies. 112 ist von seinem Wirkungsgrad etwas besser als das 13-E,15(Z,E)-Phythoen 102 ( $5.5 \pm 0.1$  % Peroxid nach 5h). Dies kann man mit der Erweiterung des Polyensystems um zwei Carbonylgruppen erklären.

Bis jetzt wurde aber gezeigt, daß diese Erweiterung den antioxidativen Effekt dramatisch erhöht (s. z.B.  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin). Deswegen ist es nicht direkt einsichtig, daß Zugabe von 112 die Wirksamkeit nur um ca. 20 % gegenüber Phythoen erhöht. Entweder reicht die Länge der Polyenkette einfach noch nicht aus, um wirklich gute antioxidative Aktivität auszulösen oder der angeschlossene Bicyclus eröffnet Reaktionspfade, welche diese Aktivität abschwächen. Nähere Aufschlüsse zu dieser Problematik zeigen sich bei der Untersuchung der Schwesterverbindung 113.

Außergewöhnlich ist das "Abbauverhalten" von 112: Während der gesamten Reaktion blieb die Menge an zugesetztem 112 praktisch konstant. Dieser Effekt wurde auch nur bei dieser Verbindung beobachtet.

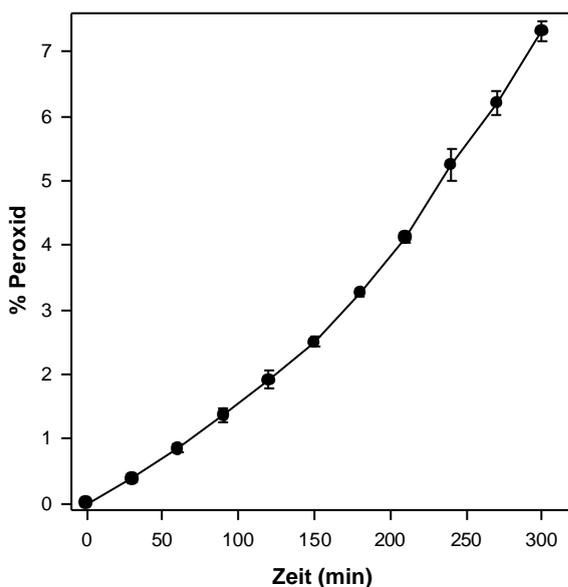
Dies kann bedeuten, daß **112** wieder regeneriert wird oder schon in Spuren die Autoxidation des Methylinoleates unterdrückt. Es ist aber nicht möglich, eine zufriedenstellende Erklärung für diesen Effekt auf der Basis des vorhandenen Datenmaterials zu erstellen.

### 3.5.7.2 221DBH



**Abbildung 109:** Struktur von 221DBH **113**

**113** ist ein Derivat von **112**. In dieser Verbindung befindet sich noch eine weitere, nicht im klassischen Sinne konjugierte, Doppelbindung im Norboradiengerüst. Diese strukturelle Modifikation hat eine dramatische Auswirkung auf den antioxidativen Effekt von **113**. Die gebildete Peroxidmenge nach 5 Stunden steigt gegenüber **112** von 4.82% auf 7.32% an. Dieser Wert liegt fast im Bereich des Referenzexperimentes. Dies bedeutet, daß **113** praktisch keine antioxidative Wirkung besitzt:



**Abbildung 110:** Antioxidative Wirkung von 221DBH **113**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 7.32 ± 0.15 %**

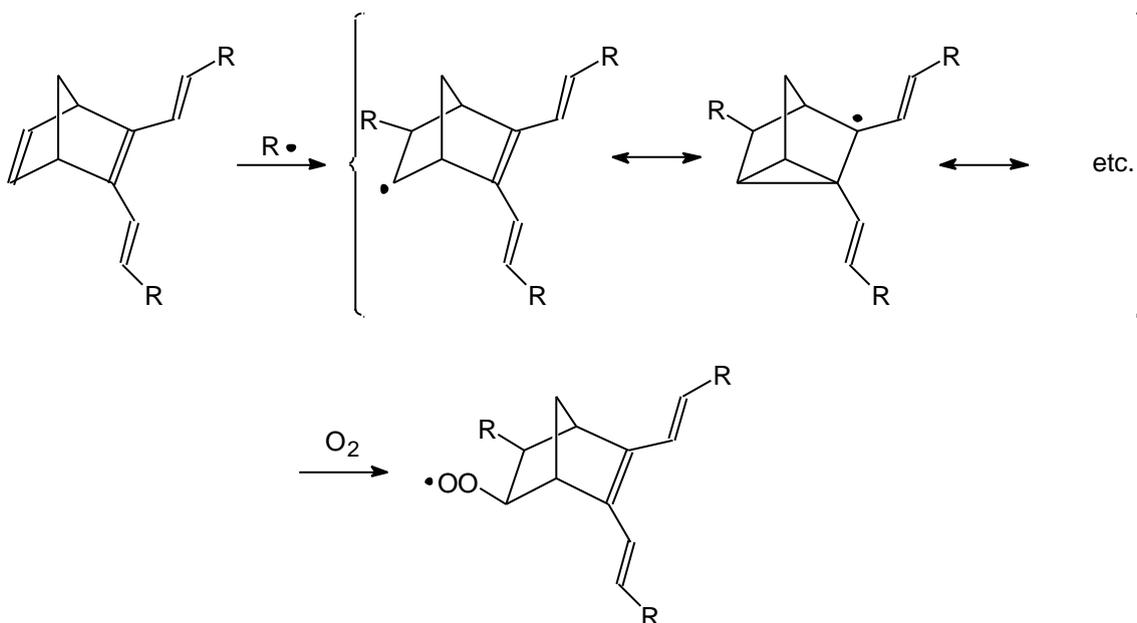
**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h : 7.96 ± 0.3 %**

Spektroskopisch bewirkt das Norbornadiensystem eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums durch HOMO-Konjugation [73]. Dies ist aber keine Verlängerung des Polyensystems im klassischen Sinne. Ein in der Polyenkette erzeugtes Radikal kann nicht mit herkömmlichen Grenzformeln die unkonjugierte Doppelbindung in die Mesomerie mit einbeziehen. Hier wäre es nötig mit dem Konzept der HOMO-Konjugation zu argumentieren.

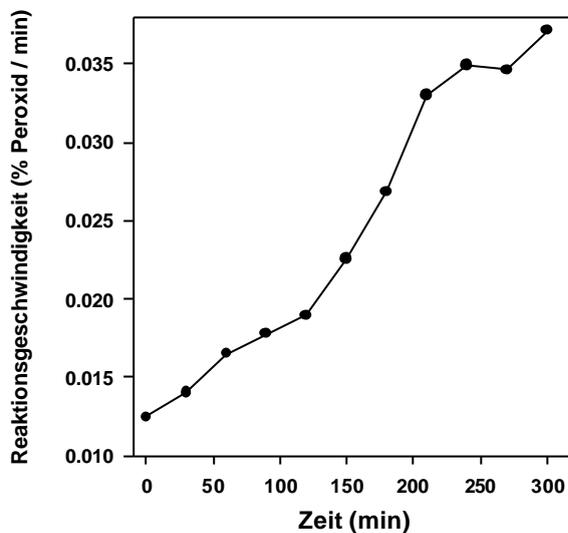
Die gegenüber **112** zusätzliche Doppelbindung kann aber die homolytische Dissoziationsenergie der Wasserstoffatome in den Brückenkopfpositionen absenken. Schon auf Seite 128 wurde die Ähnlichkeit dieses Strukturelementes mit dem Methyllinoleat erwähnt. **113** bietet also einen alternativen Reaktionspfad mit ähnlichem Mechanismus der Peroxidbildung an. Da die Polyenkette relativ klein ist, kann sich ein durch Abstraktion entstandenes Radikal nicht genügend stabilisieren und die Peroxidation von **113** setzt ein. **113** wirkt also als Cooxidans. Es reagiert leichter als Methyllinoleat und kann die Kettenreaktion fortsetzen und beschleunigen. Dieser Effekt der zusätzlichen Doppelbindung wurde in allen drei untersuchten Paaren **112-117** gefunden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung des cooxidativen Verhaltens der unhydrierten bicyclischen Polyene ist die Addition an die exocyclische Doppelbindung:



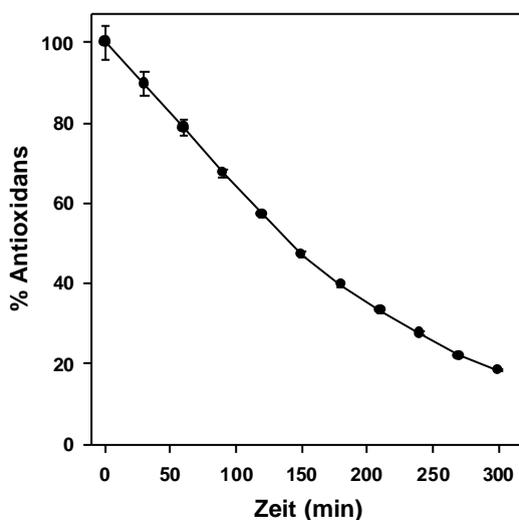
**Abbildung 111:** Entstehung von kettenträgenden Radikalen durch die Addition eines Radikals  $R\cdot$  an die exocyclische Doppelbindung der Norborandienpolyene

Der Derivatigraph untermauert noch einmal die Ergebnis bezüglich der Cooxidativität:



**Abbildung 112:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl-linoleat in Gegenwart von 221DBH 113

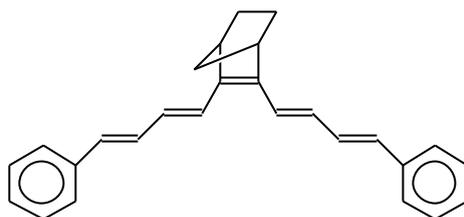
In den ersten 60 Minuten wirkt 113 ganz deutlich als Antioxidans. Die Reaktionsgeschwindigkeit liegt unterhalb der des Referenzexperimentes. Bereits nach 150 Minuten ist aber die untere Grenze der Reaktionsgeschwindigkeit des Referenzexperimentes erreicht. Die Geschwindigkeit pendelt aber nicht, wie beim reinen Methyl-linoleat zwischen Ober- und unter Grenze (0.021-0.033 % Peroxid/min) hin und her, sondern steigt stetig an und überschreitet nach 240 Minuten die Obergrenze. 113 zeigt also deutlich krypto-prooxidative Eigenschaften.



**Abbildung 113:** Abbau von 221DBH 113 im Reaktionssystem

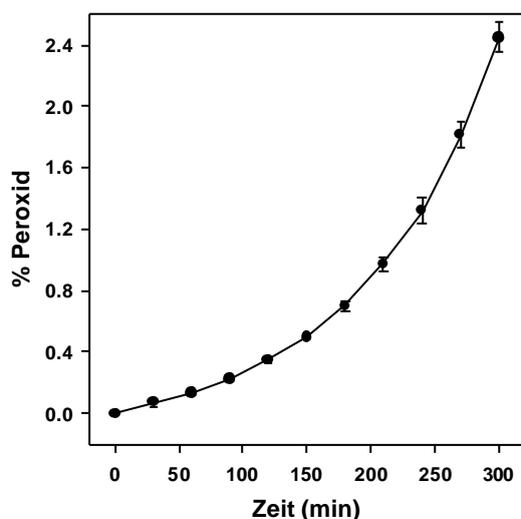
Der Abbau von **113** verläuft sehr langsam. Nach 90 Minuten, wenn 67% der Ausgangskonzentration vorhanden sind, setzt die Peroxidbildung verstärkt ein. Das heißt, daß **113** nur in großen Konzentrationen wirksam sein kann. Der Vergleich mit **112**, wo kein Abbau stattfand zeigt, daß **113** empfindlicher gegenüber Sauerstoff sein muß. Dies ist konsistent mit den oben besprochenen Zusammenhängen zwischen Struktur und Reaktivität dieser Verbindungen.

### 3.5.7.3 HDPD



**Abbildung 114:** Struktur von HDPD **114**

Die Verbindung **114** zeigt die besten antioxidativen Eigenschaften von allen untersuchten Norborn(adi)enpolyenen. Die Wirksamkeit ist identisch mit  $\beta$ -Carotin, trotz des kürzeren Polyensystems. Diese Ergebnisse betätigen auch die Befunde von G. Bucholski [24]. Seine Diplomarbeit zeigte, daß polyenische Verbindungen mit benzolischen Endgruppen gute Antioxidantien sind. Diese dort erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel 3.6.9. noch einmal diskutiert und erweitert.



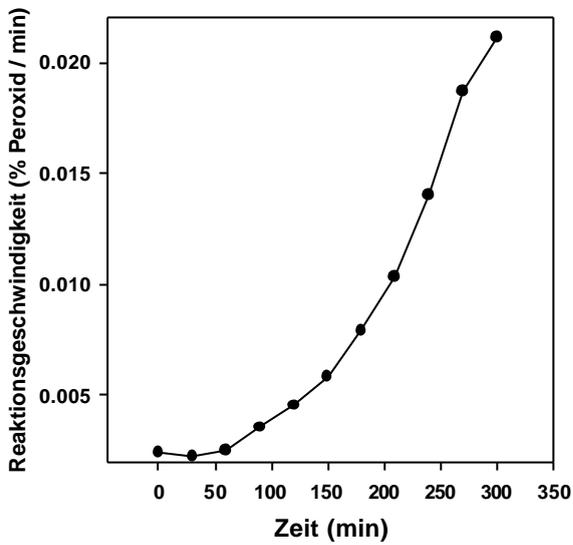
**Abbildung 115:** Antioxidative Wirkung von HDPD **114**

**% Methyllinoleathydroperoxid  
nach 5h : 2.45 ± 0.10 %**

**Referenzexperiment:**

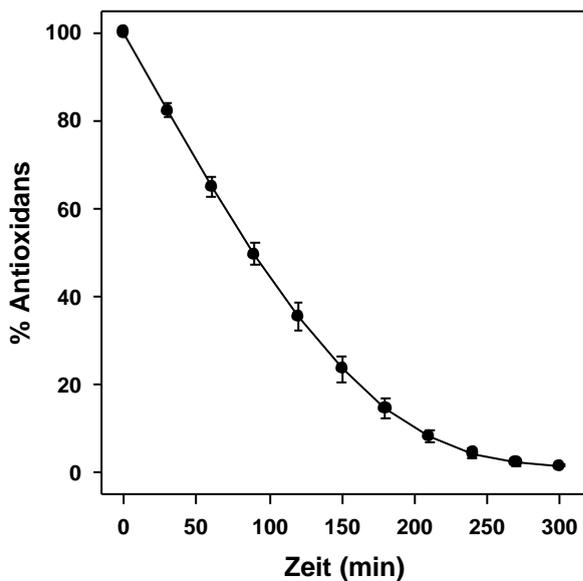
**% Methyllinoleathydroperoxid  
nach 5h : 7.96 ± 0.3 %**

Die Betrachtung von Derivativ- und Abbaugraphen entspricht den Erwartungen:

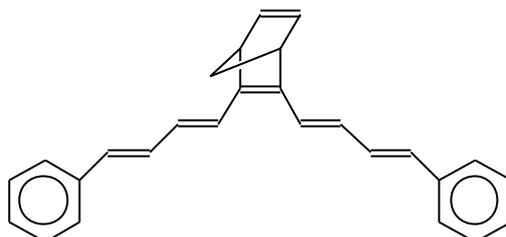


**Abbildung 116:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methyl- linoleat in Gegenwart von HDPD 114

Ein erneuter Vergleich mit  $\beta$ -Carotin zeigt, daß der Derivatigraph von 114 zunächst flacher etwas verläuft, dann aber stärker ansteigt. ab einer Reaktionszeit von 240 Minuten sind die Graphen identisch. Dies bedeutet, daß die Abbauprodukte von 114 ein geringeres antioxidatives Potential besitzen, als die Abbauprodukte des  $\beta$ -Carotins.

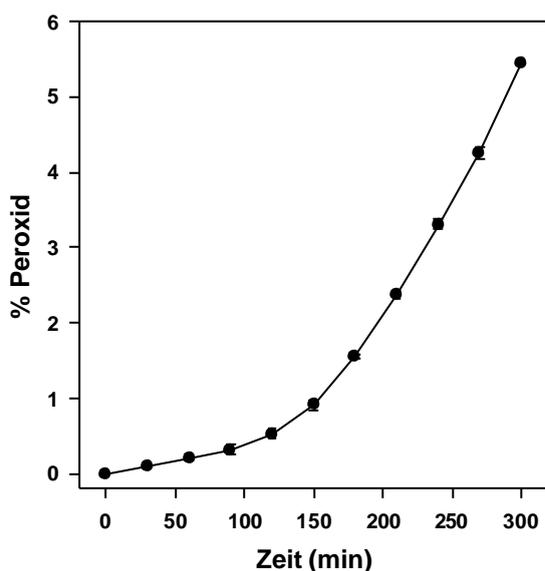


**Abbildung 117:** Abbau von HDPD 114 im Reaktionssystem

**3.5.7.4. 221DPD****Abbildung 118:** Struktur von 221DPD **115**

Die Messungen mit **115** bestätigen die Tendenz, welche man bereits im Paar **112/113** sah. Die Einführung der neuen Doppelbindung beeinträchtigt die antioxidative Wirksamkeit beträchtlich. In Gegenwart von **115** erhält man nach 5 Stunden mehr als doppelt soviel Peroxid, wie bei der Verwendung von **114**.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt der Derivatigraph (Abb. 120). Auch dort ist die Endgeschwindigkeit nach 5 Stunden annähernd doppelt so hoch, wie bei **114** und zeigt erste krypto-prooxidative Effekte. Bei diesem untersuchten Paar scheint die Reaktionsgeschwindigkeit tatsächlich mit der aktuellen Antioxidansmenge direkt verknüpft zu sein.

**Abbildung 119:** Antioxidative Wirkung von 221DPD **115**

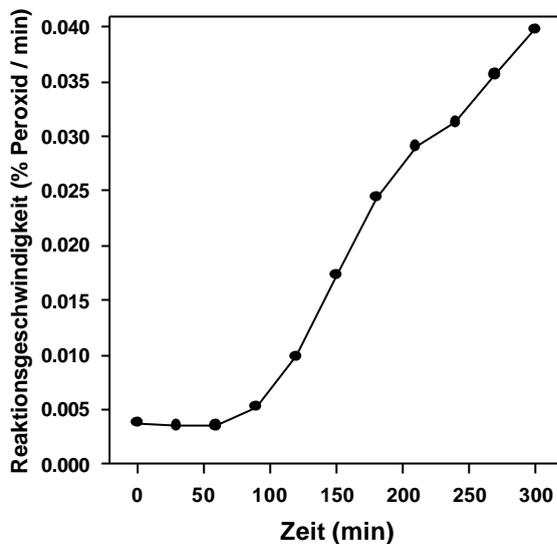
**% Methylinoleathydroperoxid**

**Nach 5h :**  $5.45 \pm 0.02$  %

**Referenzexperiment:**

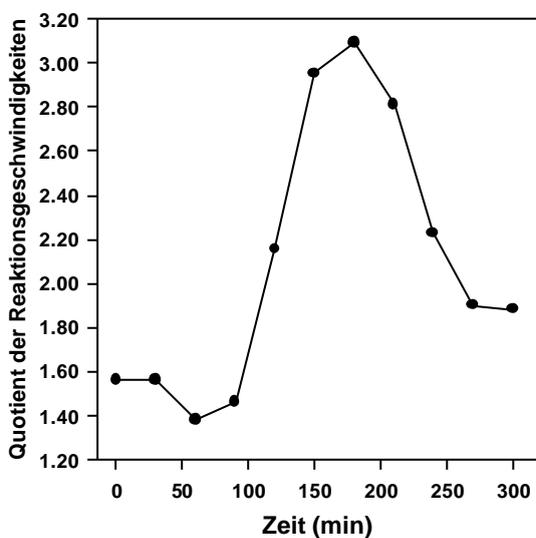
% Methylinoleathydroperoxid

nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %



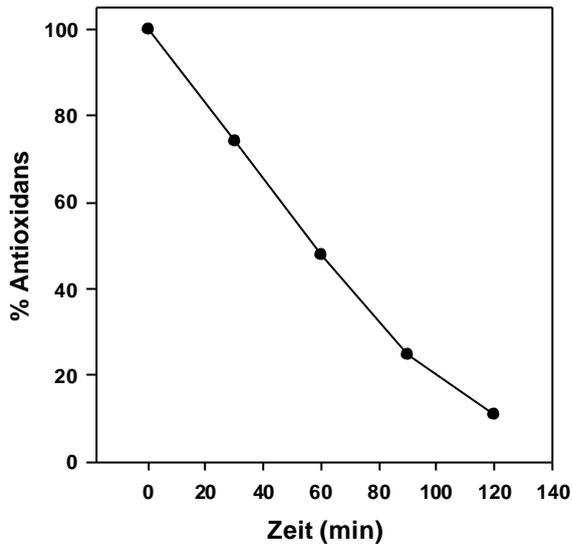
**Abbildung 120:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von 221DPD 115

Zur weiteren Charakterisierung dieser Befunde wurde die Quotienten für die Reaktionsgeschwindigkeiten der Peroxidbildung von 114 und 115 gebildet:



**Abbildung 121:** Quotient der Reaktionsgeschwindigkeiten der Verbindungen 114 und 115 (Ordinate: RG 114/115, mit RG=Reaktionsgeschwindigkeit)

Zur Diskussion des Kurvenverlaufes ist es nötig, die Graphen für den Abbau von 114 und 115 hinzuzuziehen: Nach 90 Minuten sind noch 50% 114 und 25% 115 vorhanden, nach 180 Minuten 15% 114. 115 ist nicht mehr nachweisbar.

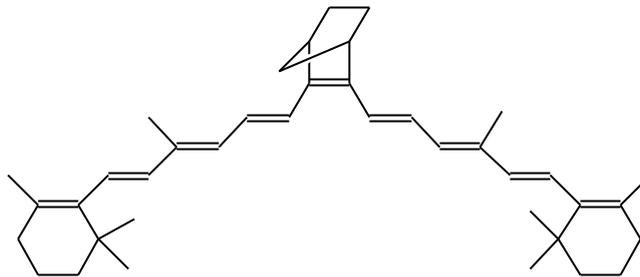


**Abbildung 122:** Abbau von 221DPD 115 im Reaktionssystem

Der Quotient der Reaktionsgeschwindigkeiten zeigt in den ersten 90 Minuten, daß die Peroxidbildung bei 115 schneller verläuft, als bei 114. Dann beginnt der Graph sehr steil anzusteigen, durchläuft ein Maximum und fällt wieder stark ab und stabilisiert sich auf einem Wert, der größer ist, als am Anfang der Reaktion. Daraus lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

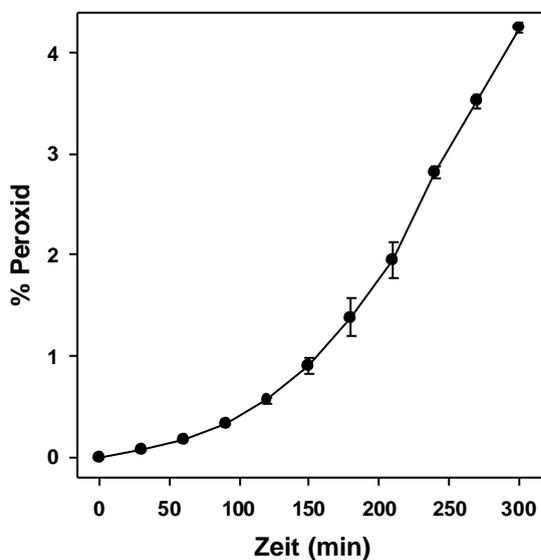
- Die Ausgangsgeschwindigkeit der Reaktion ist abhängig von der Struktur des verwendeten Antioxidans. Es liegt nicht der Fall vor, daß die Reaktionsinhibition in der Anfangsphase nur durch das Vorhandensein einer genügend hohen Menge Antioxidans gesteuert wird und die Peroxidbildung komplett zum Erliegen bringt.
- Sobald substanzspezifische Grenzkonzentrationen unterschritten sind, setzt die Peroxidbildung im verstärkten Maße ein. Dies sieht man an der starken Steigung des Quotientengraphens nach 90 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt ist die doppelte Menge 114 relativ zu 115 vorhanden.
- Auch wenn alles Antioxidans verbraucht ist, gelangt man nicht zwangsläufig zur Geschwindigkeit der Referenzreaktion. Dies zeigt erneut, daß die Abbauprodukte eine entscheidende Rolle spielen müssen.
- Die Abbauprodukte von 115 zeigen eher prooxidative Eigenschaften, die von 114 eher antioxidative. Ansonsten wäre der höhere Wert des Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeiten nach 5 Stunden relativ zum Quotienten am Anfang der Reaktion und der krypto-prooxidative Effekt im Derivatigraphen nicht zu erklären.

### 3.5.7.5. H-9-En



**Abbildung 123:** Struktur von H-9-En **116**

**116** ist strukturell stark mit dem  $\beta$ -Carotin verwandt. Das Polyensystem ist zwei Doppelbindungen kürzer als dort und die Norbornaenbrücke fixiert die zentrale Doppelbindung in *E*-Konfiguration. Von seinen antioxidativen Eigenschaften ist **116** wesentlich schlechter als  $\beta$ -Carotin. Es bilden sich 40% mehr Peroxid nach 5 Stunden:



**Abbildung 124:** Antioxidative Wirkung von H-9-En **116**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :**  $4.24 \pm 0.06 \%$

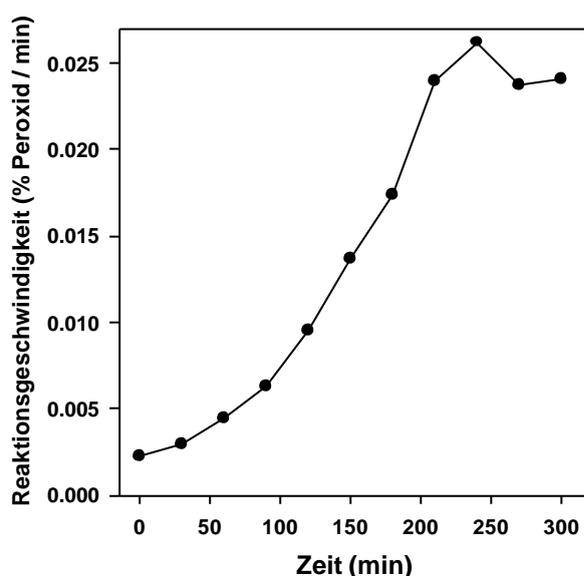
**Referenzexperiment:**

**% Methylinoleathydroperoxid nach 5h :**  $7.96 \pm 0.3 \%$

Diese Substanz bestätigt erneut die bei **112** und **114** aufgestellten Hypothesen: Das Norbornengerüst unterdrückt große Teile des antioxidativen Potentials der untersuchten Polyensysteme. Eine Erklärung dafür ist die Neuschaffung einer verbesserten Abstraktionsposition in der Kette. Trotzdem muß man hier berücksichtigen, daß auch die Verkürzung des Polyensystems ihren Beitrag liefert. Zwar dürfte auf Grund der

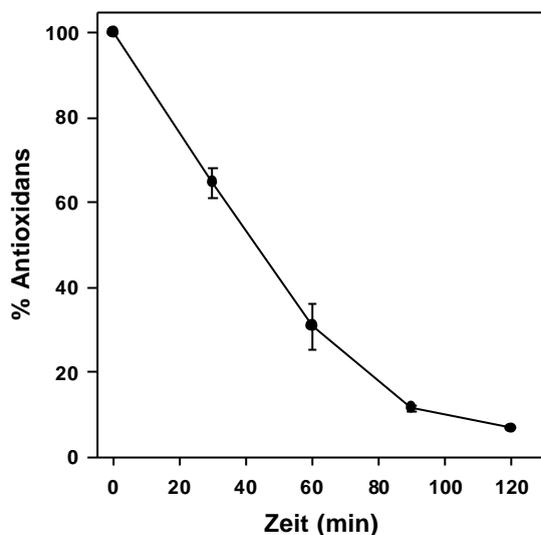
bisherigen Ergebnisse dieser Faktor nur eine untergeordnete Rolle spielen, aber er darf trotzdem nicht vernachlässigt werden. Gleichzeitig muß man aber auch berücksichtigen, daß sich in den Molekülen Z-fixierte Doppelbindungen befinden. Der negative Einfluß dieses Strukturelementes auf den antioxidativen Effekt wurde bereits bei der Untersuchung der Phythoene **102** und **103** in den Kapiteln 3.5.5.2. und 3.5.5.3 festgestellt. Alle diese für den antioxidativen Effekt negativen Strukturparameter vereinigen sich hier in einer Verbindung.

Der Derivatigraph zeigt trotzdem eine hohe Ähnlichkeit mit dem von  $\beta$ -Carotin. Der Verlauf ist annähernd identisch, bloß die Reaktionsgeschwindigkeiten sind immer entsprechend etwas erhöht. Dies deutet darauf hin, daß bei **116** und  $\beta$ -Carotin hohe mechanistische Übereinstimmungen in dieser Reaktion vorliegen müssen.



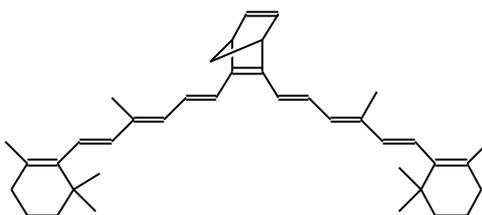
**Abbildung 125:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von H-9-En **116**

Der Abbau der Verbindung selbst verläuft viel schneller als beim  $\beta$ -Carotin. Während dort nach 60 Minuten noch 45% der Ausgangsmenge vorhanden sind, so sind es hier nur 31%. Dies kann auch die relativ schlechten antioxidativen Eigenschaften von **116** gegenüber  $\beta$ -Carotin erklären.



**Abbildung 126:** Abbau von H-9-En **116** im Reaktionssystem

### 3.5.7.6 221-9-En



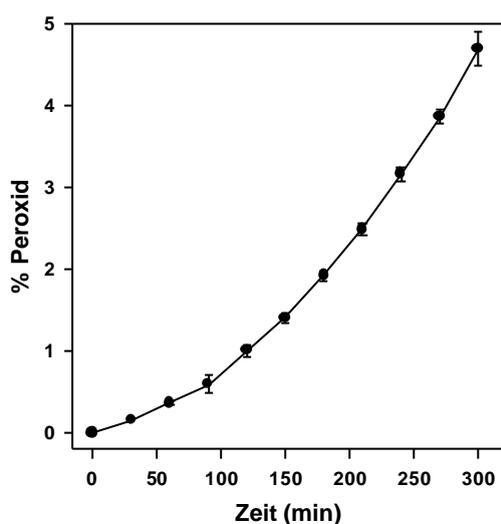
**Abbildung 127:** Struktur von 221-9-En **117**

Zwar zeigt diese Verbindung die übliche Tendenz, daß zentrale Norbornadiengerüste den antioxidativen Effekt abschwächen, aber nicht in den Maßen wie bisher. Es bilden sich nur 10% mehr Peroxid, als bei der vergleichbaren hydrierten Verbindung **116**.

Dieses Ergebnis ist erstaunlich, wenn man die anderen beiden Paare (**112/113** und **114/115**) damit vergleicht. Dort bedeutete die Einbringung der Doppelbindung in den Bicyclus immer eine dramatische Verschlechterung des antioxidativen Potentials. Da dies hier nicht der Fall ist, muß man die Erklärung in der Natur der Endgruppe suchen:

Der  $\beta$ -Jonon-Ring ist hochreaktiv. Wie schon in der Literatur [74, 54, 14] beschrieben ist er die zentrale Angriffsposition beim Abbau des  $\beta$ -Carotins. Epoxidierungen am C<sub>5</sub>-Atom und Abstraktionen am C<sub>4</sub>-Atom des Ringes sind dabei die entscheidenden Reaktionen. Spaltungsreaktionen in der Kette werden zwar auch beobachtet, scheinen aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Bei dem Paar **116/117** verlagert sich also die Hauptangriffsposition von den zentralen Bicyclen in die Endgruppe. Deren Struktur und Reaktivität bestimmen die antioxidativen Eigenschaften der beiden Verbindungen. Deswegen sind die Ergebnisse für diese beiden Verbindungen auch so ähnlich. Trotzdem ist der Beitrag des Bicyclus nicht zu vernachlässigen, da ansonsten der antioxidative Effekt der beiden Verbindungen stärker ausgeprägt sein müßte.



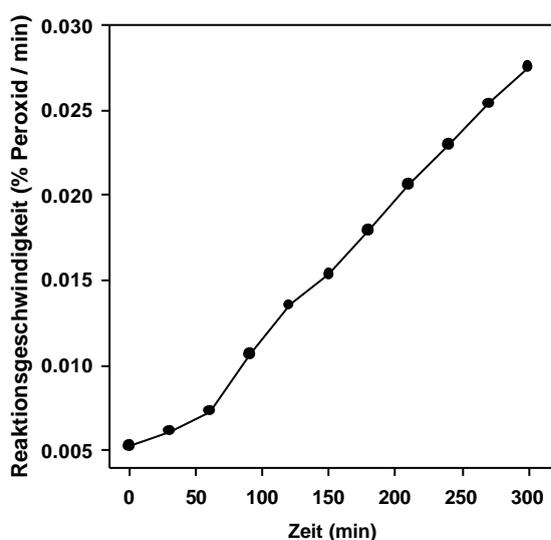
**Abbildung 128:** Antioxidative Wirkung von 221-9-En **117**

% Methylinoleathydroperoxid  
nach 5h :  $4.69 \pm 0.21$  %

**Referenzexperiment:**

% Methylinoleathydroperoxid  
nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %

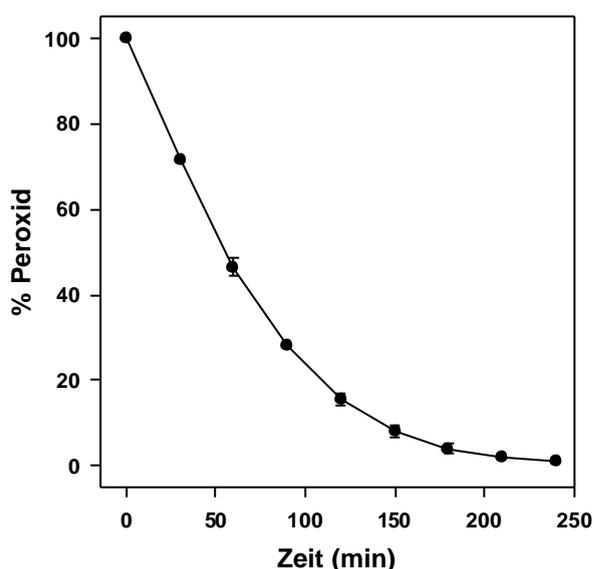
Der Einfluß der Doppelbindung im Norbonangerüst zeigt sich bei der Betrachtung des Derivatigraphens:



**Abbildung 129:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart von 221-9-En **117**

Während bei **116** sich die Reaktionsgeschwindigkeit nach 210 Minuten auf der des Referenzexperimentes einpendelte, steigt hier der Graph nach einer Induktionsperiode von 60 Minuten linear an. Zwar ist die Reaktionsgeschwindigkeit nach 300 Minuten immer noch im Bereich des Referenzexperimentes, aber die Tendenz zu einem weiteren Anstieg ist vorhanden.

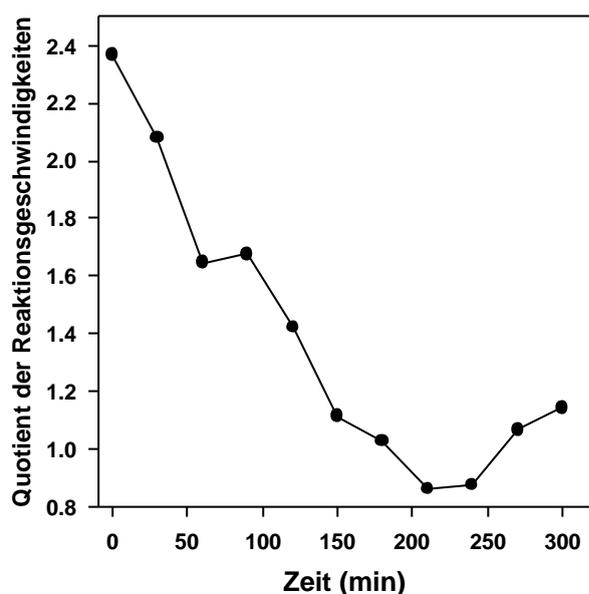
Der Graph für den Abbau von **117** zeigt, daß diese Verbindung etwas langsamer abgebaut wird als **116**. Während bei **116** die Halbwertszeit 42 Minuten beträgt, so ist sie hier 54 Minuten. Also kann man auch hier keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Abbaugeschwindigkeit und Reaktivität finden.



**Abbildung 130:** Abbau von 221-9-En **117** im Reaktionssystem

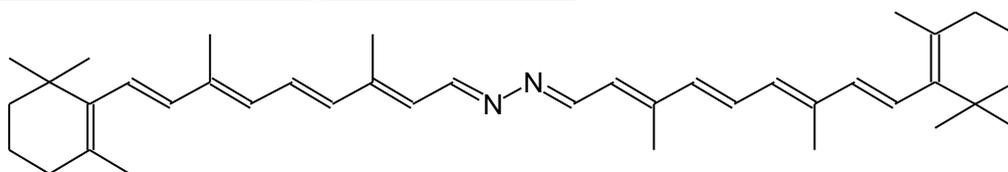
Ein interessantes Ergebnis findet man, wenn man den Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeit für die Peroxidbildung in Gegenwart von **116** und **117** bildet: In der Anfangsphase der Reaktion ist die Peroxidbildung in Gegenwart der hydrierten Verbindung **116** um den Faktor 2.4 langsamer als bei der unhydrierten Verbindung. Hier zeigt sich wieder direkt der Einfluß der zusätzlichen Doppelbindung. Mit dem Abbau der Substanzen sinkt auch gleichzeitig der Quotient. Dies bedeutet, daß der negative Einfluß der Doppelbindung direkt an das Vorhandensein der Verbindung gekoppelt ist. Nach 120 Minuten, wenn praktisch nur noch **117** vorhanden ist, sinkt der Quotient unter 1. Dies zeigt, daß die Anwesenheit der Reinsubstanz einen stärkeren Antioxidativen Effekt hat, als die Abbauprodukte. Nach 210 Minuten, wenn **117** nur

noch in Spuren vorhanden ist steigt der Graph wieder an. In diesem Bereich übernehmen die Abbauprodukte die Reaktionskontrolle. Daraus folgt, daß die Abbauprodukte von **117** schlechtere Antioxidantien sind als bei **116**. Dies deckt sich mit der Aussage über das antioxidative Potential der Ausgangsverbindungen.



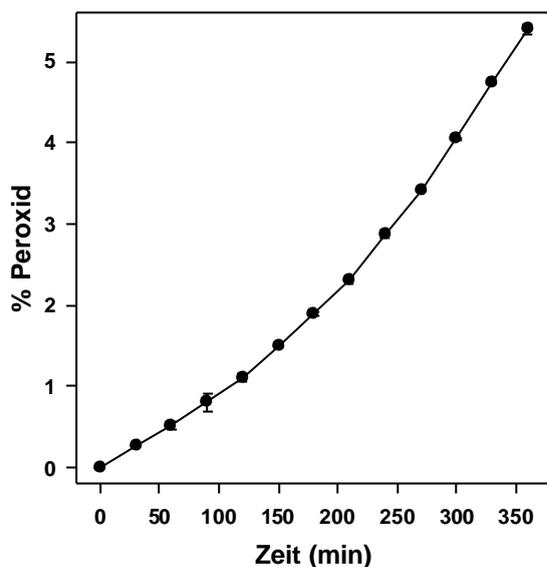
**Abbildung 131:** Quotient der Reaktionsgeschwindigkeiten der Verbindungen **116** und **117** (Ordinate: RG **116/117**, mit RG=Reaktionsgeschwindigkeit)

### 3.5.8. Stickstoffhaltige Carotinoide



**Abbildung 132:** Struktur von DRH **118**

Diese Verbindung wird ist die letzte, welche im Methyllinoleatsystem untersucht wurde. Sie steht am Ende, da es gleichzeitig das einzige Polyen ist, bei welchem Heteroatome in die Kette eingebaut sind. Sie ist ein deutlich schlechteres Antioxidans als  $\beta$ -Carotin, obwohl die Substanz eine Doppelbindung mehr besitzt. Die Reaktivität ist nicht direkt zu erklären, dazu würden mehr Daten von strukturell ähnlichen Verbindungen benötigt.



**Abbildung 133:** Antioxidative Wirkung von DRH 118

% Methyllinoleathydroperoxid

Nach 5h :  $5.40 \pm 0.06$  %

**Referenzexperiment:**

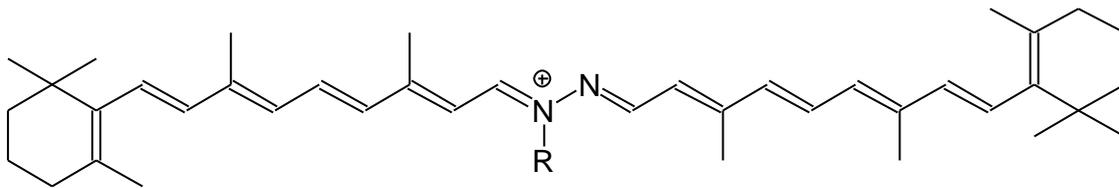
% Methyllinoleathydroperoxid

nach 5h :  $7.96 \pm 0.3$  %

Aufgrund der oben erwähnten Probleme können an dieser Stelle nur Spekulationen über mögliche Wirkungsweisen vorgestellt werden:

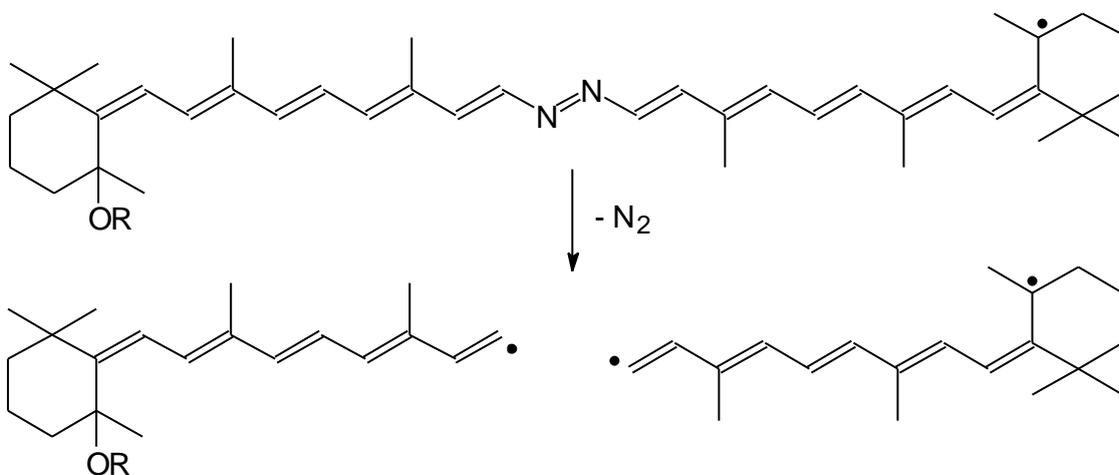
1) Das Polyensystem ist im Zentralbereich verlängert. Dies bedeutet eine sterische Entlastung der Doppelbindungen in diesem Bereich, was gleichzeitig eine erhöhte Angriffswahrscheinlichkeit an dieser Stelle bedeutet. Die Stabilität der Verbindung gegenüber Sauerstoff wird also herabgesetzt. Bis jetzt war bei allen Substanzen der Trend zu erkennen, daß eine Erniedrigung der Stabilität relativ zu  $\beta$ -Carotin einer Absenkung der antioxidativen Wirksamkeit führt. DRH 118 würde sich also in diesen Trend einfügen.

2) Für die Stabilitätssenkung gibt es noch zwei andere Erklärungen. Es ist gut möglich, daß DHR 118 im Verlauf der Reaktion mit kationischen Intermediaten, welche z. B. von Gao et. al. [75] nachgewiesen wurden, reagiert. Daraus ergeben sich protonierte oder alkylierte Schiffbasen. Diese sind in sauren Medien instabil. Die Glasoberfläche des Reaktionsgefäßes besitzt die Tendenz als Säure zu wirken. Dies wurde bei der Untersuchung der Reaktionsgefäße (Kapitel 3.4.3.) festgestellt. Auch die Kationen sind prinzipiell Lewissäuren. Somit zerfällt das Polyen in kürzere Produkte, deren antioxidative Wirkung zwar vorhanden ist, aber deutlich abgeschwächt gegenüber der Ausgangsverbindung.



**Abbildung 134:** Alkyliertes bzw. protoniertes DRH 118

Die Addition von Radikalen an das Polyensystem kann die Stabilität auch beträchtlich beeinflussen:



**Schema 48:** Addition von  $\text{RO}\cdot$  an DRH 118

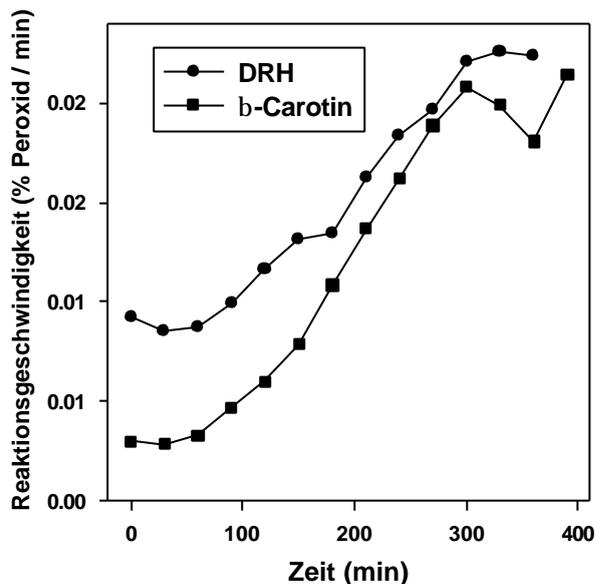
Das entstehende Radikal kann sich über die gesamte Polyenkette delokalisieren. Dabei ist es möglich eine Grenzformel zu formulieren in der eine Azogruppe vorliegt. Wenn man berücksichtigt, daß der Reaktionsstarter auch eine Azoverbindung ist, liegt die Vermutung nahe, daß auch das "Azocarotinoid" zerfällt. Dabei werden neue Radikale gebildet, welche die Kettenreaktion vorantreiben können.

Es gibt also genügend Möglichkeiten, eine Erklärung für die abgesenkte Stabilität von DRH zu finden. Für genauere Aussagen wäre es nötig die Reaktion dynamisch im UV/ Vis zu verfolgen. Die Schiffbase wäre dort deutlich durch eine bathochrom zum Absorptionsmaximum verschobene Bande zu erkennen.

Da DRH 118 gleichzeitig mit Lösungsmittel und Starter eluiert, ist es nicht möglich, eindeutige Werte für den quantitativen Abbau zu erhalten. Hier muß man auch von rein

optischen Beobachtungen ausgehen: Die Lösung war nach ca. 90 min vollständig entfärbt. Zu dieser Zeit war bei  $\beta$ -Carotin noch eine deutlich gelbe Färbung zu beobachten. DRH **118** ist demnach instabiler als  $\beta$ -Carotin, was sich genau in die Theorie einfügt.

Zur Interpretation des Derivatigraphens wird der von  $\beta$ -Carotin zu Hilfe genommen:



**Abbildung 135:** Derivatigraph der Peroxidbildung von Methylinoleat in Gegenwart DRH **118** und  $\beta$ -Carotin

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei **118** zwar im Anfang deutlich höher, nach 180 Minuten zeigen die Graphen aber einen annähernd identischen Verlauf. Der einzige Unterschied ist, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten beim  $\beta$ -Carotin um ca. 30 min gegenüber dem Graphen für **118** parallelverschoben sind. Die Meßwerte nach 300 Minuten liegen beide im Bereich des Referenzexperimentes. Damit zeigt sich, daß **118** selber zwar ein schlechteres Antioxidans ist als  $\beta$ -Carotin, aber die Abbauprodukte sehr ähnlich sein müssen. Dies ist mit der Struktur der Verbindungen auch konsistent.

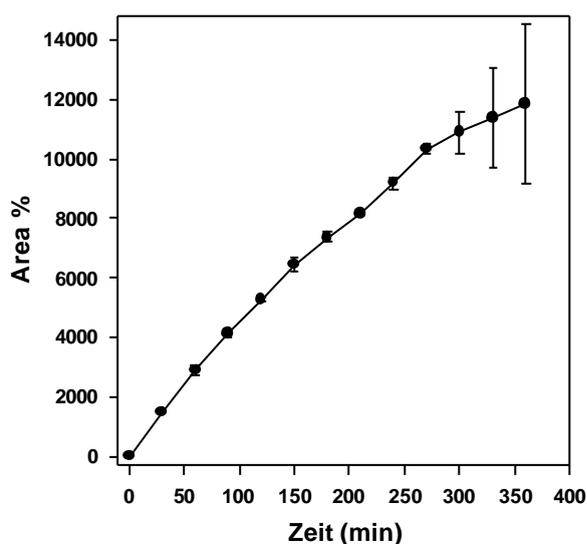
### 3.6. Messungen mit Cumol

Wie bereits erwähnt, treten bei der Verwendung von Cumol als Substrat zwei Probleme auf:

- 1) Die Extinktionen der Absorptionsbande des aromatischen Ringes bei 254nm ist sehr schwach. Daraus folgt, daß die Genauigkeit des Detektors bei dieser Meßwellenlänge in geringen Konzentrationsbereichen (ca. in den ersten zwei Stunden der Messung) nicht so zuverlässig ist, wie beim Methyllinoleat. Deshalb wurde eine doppelt so große Probenschleife (20 µml) in das Injektionssystem eingebaut, um die Auflösung des Verfahrens zu verdoppeln.
- 2) Eine andere Möglichkeit ist die Messung des Hydroperoxides bei 218 nm. Die Extinktion des Cumolhydroperoxides bei dieser Wellenlänge ist bei langen Reaktionszeiten (3-5h) aber so hoch, daß der Detektor überladen wird und somit eine exakte Auswertung nicht mehr möglich ist.

#### Zur Auswertung müssen deswegen folgende Prinzipien beachtet werden:

- a) 218nm: Liegt die Peroxidbildung nach 5h im Bereich von 5000 Area% der HPLC-Software, so ist die Auswertung der Wellenlänge 218 nm noch verwendbar. Peroxidmengen über dieser Grenze führen zu erheblichen Verbreiterungen der Fehlerintervalle für die Messungen:



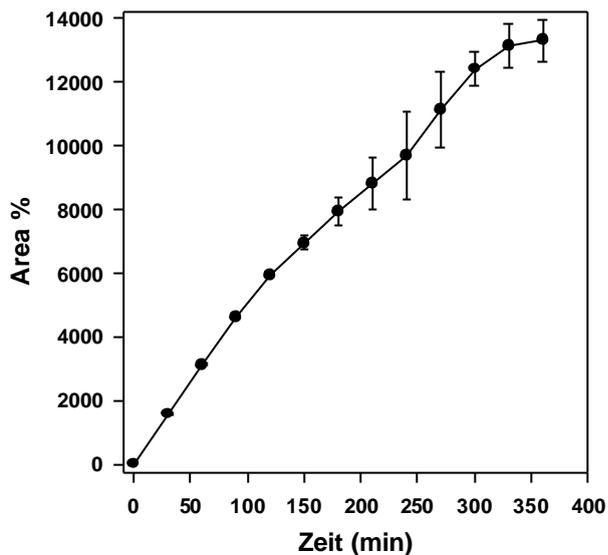
**Abbildung 136:** Uninhibierte Bildung des Cumolhydroperoxides

Messwellenlänge: 218 nm

Sauerstoffpartialdruck: 150 torr

Probenschleife: 20 µl

Wie man dem Graph entnehmen kann steigt das Intervall des zufälligen Fehlers mit der Zeit annähernd linear an. Weiterhin zeigt der Graph eine starke Krümmung, welche bei einer Kettenreaktion ohne Kettenverzweigung und genügend Überschuß an Substrat und Sauerstoff nicht auftreten dürfte. Bei einem Partialdruck des Sauerstoffs von 760 torr zeigt sich bei 218 nm dasselbe Bild bei 150 torr:



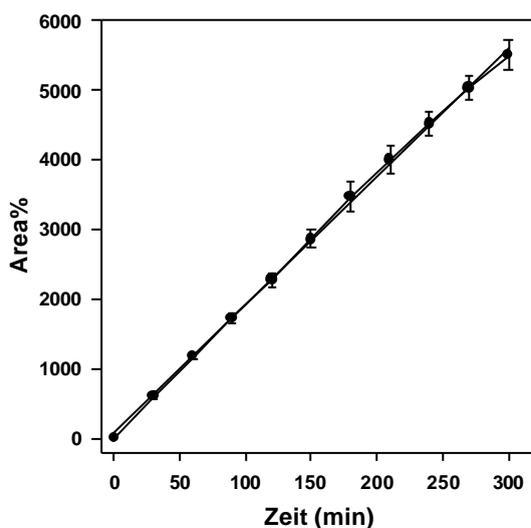
**Abbildung 137:** Uninhibierte Bildung des Cumolhydroperoxides

Messwellenlänge 218 nm

Sauerstoffpartialdruck: 760 torr

Probenschleife: 20  $\mu$ l

Ganz anders sieht das Bild bei der Verwendung einer 10 $\mu$ l Probenschleife aus:



**Abbildung 138:** Uninhibierte Bildung des Cumolhydroperoxides (Messwellenlänge 218nm, Sauerstoffpartialdruck 150 torr, Probenschleife: 10 $\mu$ l)

Lineare Regression:

Steigung: 18.48 Area%/min,

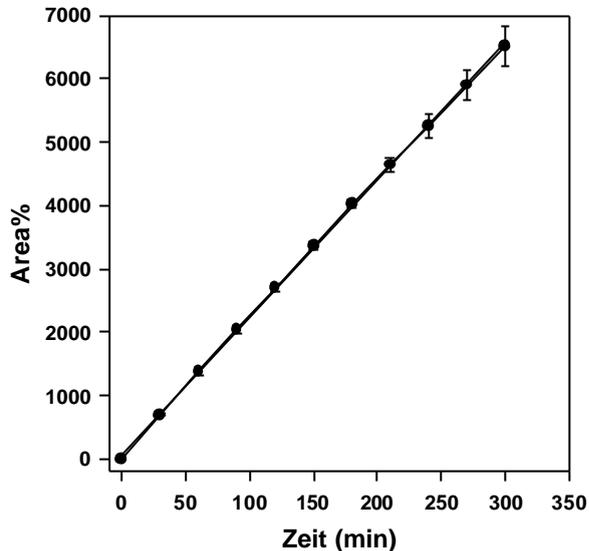
Ordinatenabschnitt: 58.41,

Regressionskoeffizient : 0.9992

**% Cumolhydroperoxid**

**nach 5h : 5500  $\pm$  86 Area%/min**

Dieser Graph ist vollständig linear. Dasselbe Bild ergibt sich bei 760 torr Sauerstoffpartialdruck:



**Abbildung 139:** Uninhibierte Bildung des Cumolhydroperoxides (Messwellenlänge 218 nm, Sauerstoffpartialdruck 760 torr, Probenschleife: 10 $\mu$ l)

Lineare Regression:

Steigung: 21.7 Area%/min

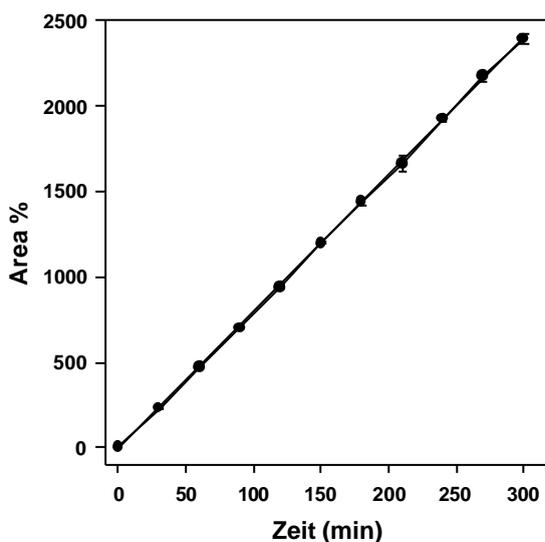
Ordinatenabschnitt: 68.12

Regressionskoeffizient : 0.9996

**% Cumolhydroperoxid nach 5h :**  
6526  $\pm$  318 Area%

Dieser Graph ist ebenfalls vollständig linear, obwohl man sieht, daß die anfangs verschwindend kleinen Fehlerbalken größer werden. Die 10 $\mu$ l Probenschleife halbiert aber die Auflösung des Meßverfahrens. Deswegen wurde für alle relevanten Messungen die 20 $\mu$ l Probenschleife verwendet.

b) 254nm:



**Abbildung 140:** Uninhibierte Bildung des Cumolhydroperoxides (Messwellenlänge 254nm, Sauerstoffpartialdruck 150 torr, Probenschleife: 20 $\mu$ l)

Lineare Regression:

Steigung: 8.04 Area%/min

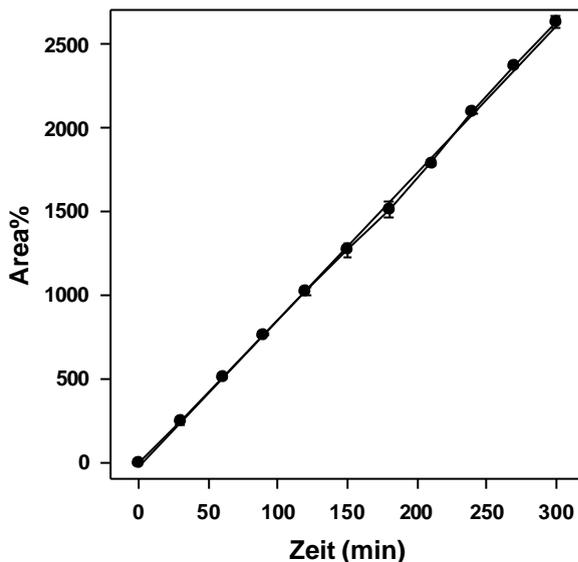
Ordinatenabschnitt: -12.90

Regressionskoeffizient: 0.9998

**% Cumolhydroperoxid nach 5h :**  
2394  $\pm$  34 Area% / min

Auch hier ist der Graph vollständig linear. Die Meßwerte liegen so gut auf der Regressionsgeraden, daß diese, obwohl eingezeichnet, im obigen Graphen nicht mehr eindeutig zu identifizieren ist.

Für 760 torr Sauerstoffpartialdruck ergibt sich:



**Abbildung 141:** Uninhibierte Bildung des Cumolhydroperoxides (Messwellenlänge 254nm, Sauerstoffpartialdruck 760 torr, Probenschleife: 20µl)

Lineare Regression:

Steigung: 8.77 Area%/min

Ordinatenabschnitt: -26.63

Regressionskoeffizient: 0.9992

**% Cumolhydroperoxid nach 5h :**  
2629 ± 34 Area%

Zur Überprüfung der Zulässigkeit der Messungen bei verschiedenen Wellenlängen werden die aus den obigen Graphen erhaltenen Steigungen verglichen:

Bei 218nm Meßwellenlänge und 150 torr Sauerstoffpartialdruck beträgt die Steigung des Graphens der Bildung des Peroxids 18.48 Area%/min. Bei 760 torr Sauerstoffpartialdruck beträgt der analoge Wert 21.70 Area%/min. Daraus folgt, daß eine Vergrößerung des Sauerstoffpartialdruckes um den Faktor 5.1 nur eine Geschwindigkeit von 117.4% relativ zur Messung bei 150 torr zur Auswirkung hat. Bei den Messungen bei 254nm Meßwellenlänge, wird auf dieselbe Weise aus den Steigungen (8.04 bzw. 8.77 Area%/min) eine Änderung auf 109% errechnet.

Würde man aus den oben errechneten Geschwindigkeitserhöhungen einen Mittelwert mit Standardabweichung errechnen, so liegt die Standardabweichung im Bereich von 5-6%, was dem allgemeinen zufälligen Fehler bei dieser Art von Messungen entspricht.

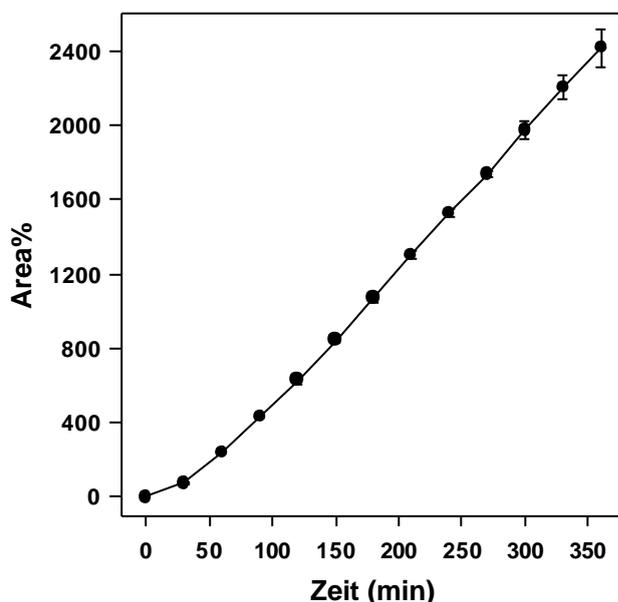
Somit ist es möglich sowohl die Messungen bei 254nm als auch bei 218nm zur Auswertung der Meßergebnisse heranzuziehen.

### 3.6.1: Antioxidative Effekte

Anmerkung zum Auswertverfahren: Für die Messungen mit Cumol wurde kein Eichfaktor bestimmt, mit dem man direkt von den ermittelten Flächenprozenten auf den Peroxidgehalt schließen kann. Zur Standardisierung der Meßwerte wurden deshalb alle Messungen bei 254nm unter Verwendung der 20µl Probenschleife durchgeführt. Der nach 5 Stunden erhaltene Wert (2394 Area% bei 150torr bzw. 2629 Area% bei 760 torr) wurde auf 100 normiert und die anderen Meßergebnisse entsprechend relativ zu diesem Wert gesetzt. Es sind jeweils beide Werte (Area% und normierter Wert) angegeben. Die Derivatigraphen wurden aus der Auftragung Area% gegen die Zeit bestimmt.

#### 3.6.2.1. b-Carotin $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Dies ist die kleinste verwendete Konzentration an Antioxidans. Wie man dem Graphen direkt entnimmt, ist der antioxidative Effekt minimal. Nach 5 Stunden haben sich 82.5 % der Peroxidmenge des Referenzexperimentes gebildet. Nach 6 Stunden ist ungefähr der Wert des Referenzexperimentes erreicht.



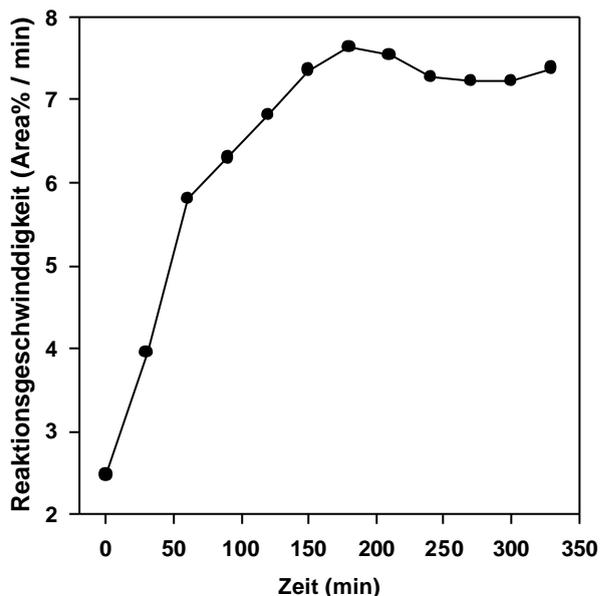
**Abbildung 142:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

**% Cumolhydroperoxid nach  
5h :  $1975 \pm 45$  Area%  
normierter Wert:  $82.5 \pm 1.9\%$**

Dies korreliert mit dem Abbau des reinen  $\beta$ -Carotins im Reaktionssystem. Ab dem Meßintervall von 45-60 Minuten war kein  $\beta$ -Carotin mehr detektierbar. Deswegen wird

an dieser Stelle auch kein Graph für den Abbauprozess abgebildet, da nur drei Meßwerte vorliegen. Auf den ersten Blick deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß der antioxidative Effekt des  $\beta$ -Carotins direkt mit dessen Vorhandensein gekoppelt ist. Zur genaueren Untersuchung dieser These wurden, wie bei den Messungen mit Methylolinoleat, auch beim Cumol Derivatigraphen angefertigt:

Der Derivatigraph für die Peroxidbildung zeigt einen anderen Verlauf als bei den Messungen mit Methylolinoleat. Während dort die Reaktion eine Inhibitionsperiode innerhalb der ersten 90 Minuten aufwies, steigt beim Cumol die Reaktionsgeschwindigkeit schon in den ersten 60 Minuten steil an und durchläuft bei 180 Minuten ein Maximum.

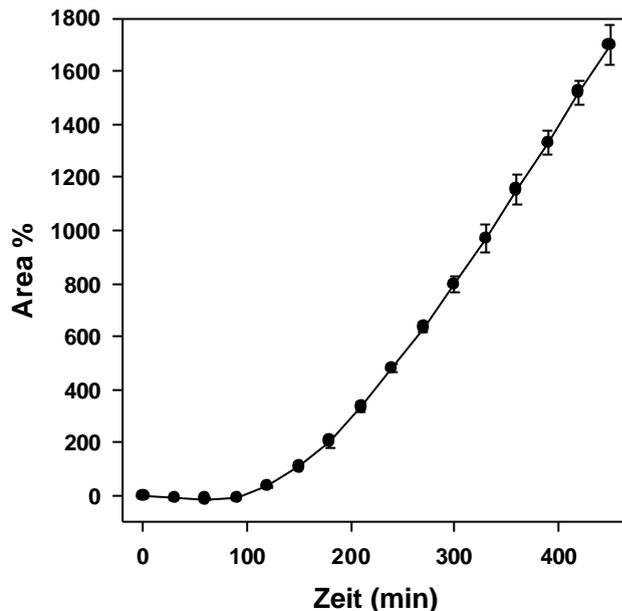


**Abbildung 143:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Referenzreaktion, so sieht man, daß die Reaktionsgeschwindigkeit während des gesamten Beobachtungsintervall unterhalb der des Referenzexperimentes (8.04 Area%/min) liegt. Da das  $\beta$ -Carotin, wie bereits erwähnt, schon während der Anfangsperiode der Reaktion verbraucht wird, läßt das Ergebnis der Derivativauftragung darauf schließen, daß die Abbauprodukte des  $\beta$ -Carotins auch antioxidativ aktive Spezies sind, welche die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamen können. Damit wäre wieder einmal gezeigt, daß der antioxidative Effekt nicht zwingend mit dem Vorhandensein des  $\beta$ -Carotins selbst verknüpft ist.

### 3.6.2.2. $\beta$ -Carotin $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$

Bei diesem Experiment sieht man, daß eine Erhöhung der Konzentration die Peroxidbildung weiter zurückdrängt. Man erkennt deutlich eine Induktionsperiode, welche 90 Minuten anhält.

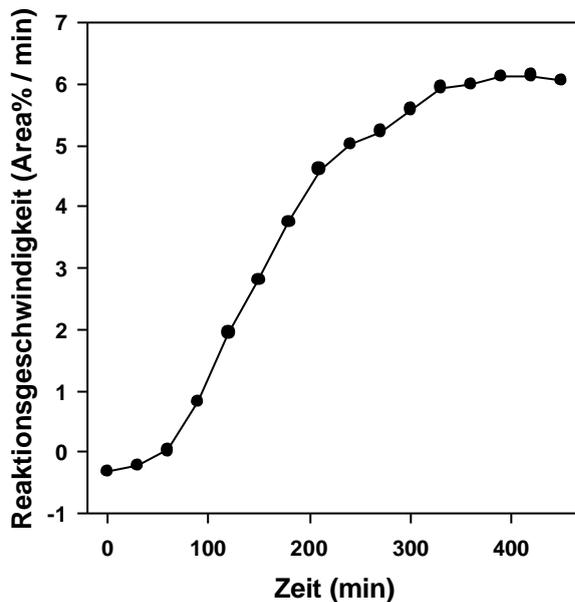


**Abbildung 144:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**  $796 \pm 27 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $33.2 \pm 1.1\%$

Der Derivatigraph verhält sich auf den ersten Blick so, wie man es bei einem Antioxidans im klassischen Sinne erwartet: Nach einer Induktionsperiode, in der kein Peroxid gebildet wird, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit an und pendelt sich auf im späteren Verlauf auf einem Endwert ein. Dieser Wert ist aber immer noch niedriger als die Geschwindigkeit des Referenzexperimentes. Derselbe Effekt wurde bereits bei den Messungen mit Methylinoleat beobachtet.

Hier bestätigt sich die bei a) aufgestellte Hypothese: Da nach fünf Stunden alles  $\beta$ -Carotin verbraucht ist, aber die Peroxidbildung immer noch langsamer verläuft als im Referenzexperiment, muß man sagen, daß die Abbauprodukte des  $\beta$ -Carotins in jedem Fall auch antioxidative Wirksamkeit besitzen.

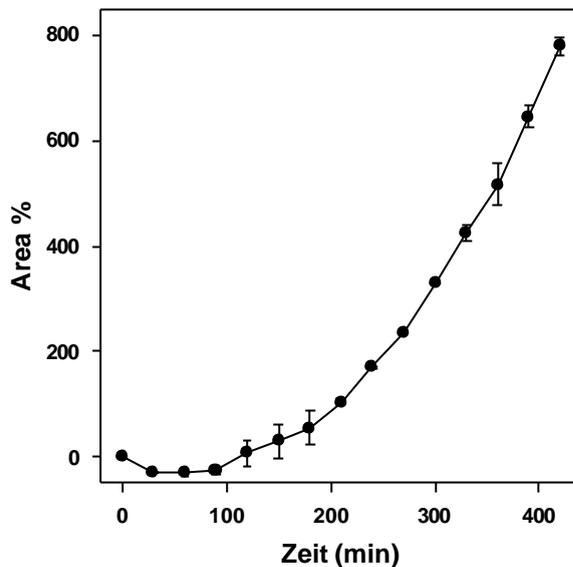


**Abbildung 145:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

### 3.6.2.3 $\beta$ -Carotin $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$

Auch eine weitere Erhöhung der  $\beta$ -Carotinkonzentration zeigt keine prooxidativen Effekte im Sinne von Burton und Ingold [7]. Die Hydroperoxidbildung wird, wie es eigentlich zu erwarten ist, weiter zurückgedrängt.

Bei diesem Experiment wurde zum ersten Mal ein Effekt beobachtet, welcher sich in allen weiteren Experimenten mit Konzentrationen  $\geq 5 \cdot 10^{-3} \text{M}$  zeigte: In den ersten Minuten sinkt die Peroxidkonzentration leicht ab und bleibt dann eine von der verwendeten Substanz abhängige Zeit lang konstant. Dies bedeutet, daß die verwendeten Antioxidantien nicht nur die Peroxidbildung unterdrücken, sondern auch, in hohen Konzentrationen, in der Lage sind Peroxide des Cumols zu vernichten. Somit muß man den Begriff der Antioxidativität noch stärker erweitern: Ein Antioxidans ist nicht nur zwangsläufig eine alternative Route zu einen bestehenden Reaktionspfad. Es kann auch als Reduktionsmittel die Peroxidbildung rückgängig machen.



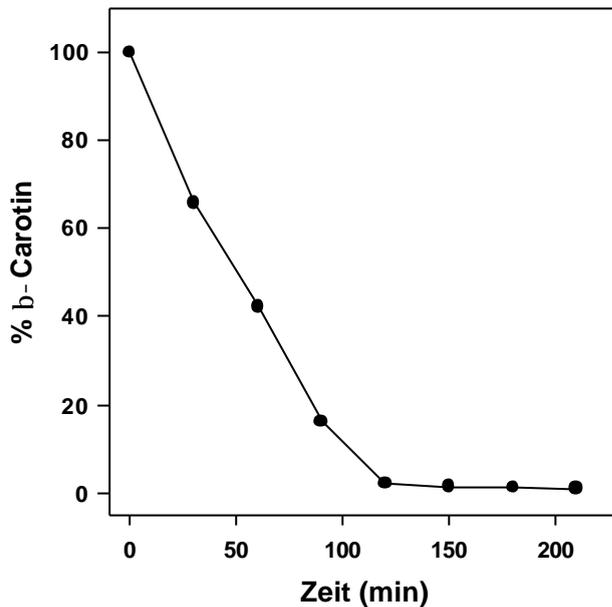
**Abbildung 146:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**% Cumolhydroperoxid nach 5h :  $330 \pm 2 \text{ Area\%}$**   
normierter Wert:  $13.8 \pm 0.1\%$

Vergleicht man die Mengen des gebildeten Peroxides in den Experimenten 3.6.2.1-3.6.2.3, so sieht man direkt, daß kein linearer Zusammenhang zwischen der Antioxidanzkonzentration und der Peroxidmenge besteht. (Exp: 3.6.2.1.: 1975, 3.6.2.2.: 796, 3.6.2.3.: 330).

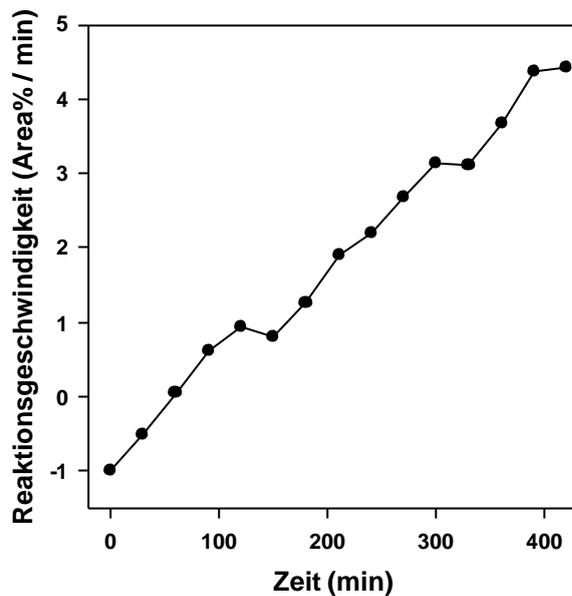
Dies deutet darauf hin, daß es eine Grenzkonzentration gibt, ab welcher  $\beta$ -Carotin einen anderen Reaktionspfad für die Desaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies öffnen kann. Dieser Pfad kann durch die Interaktion von  $\beta$ -Carotin-Radikal-Produkten mit reinem  $\beta$ -Carotin ausgelöst werden, da bei hohen  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen Reaktionen dieser Moleküle untereinander immer wahrscheinlicher werden. Die Konkurrenz durch die Reaktion mit dem reinen Cumol wird zurückgedrängt.

Eine mathematische Betrachtung des Graphens für den Abbau des reinen  $\beta$ -Carotins ist nicht möglich, da zu wenig Meßpunkte vorhanden sind. Während das  $\beta$ -Carotin bei den Messungen mit Methylinoleat einen deutlich logarithmischen Abbau zeigte und, sieht man hier nur einen starken Abfall der  $\beta$ -Carotinmenge, bei dem nach 120 Minuten nur noch 2% der Ausgangskonzentration vorhanden sind.



**Abbildung 147:** Abbau von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) im Reaktionssystem

Vergleicht man die Graphen der Bildung des Cumolhydroperoxides, so erscheint es auf den ersten Blick, daß eine Erhöhung der  $\beta$ -Carotin Konzentration nur zu einer Parallelverschiebung der Peroxidbildung führt. Dies ist auch der Fall bei 3.6.2.1 und 3.6.2.2, wie bereits gezeigt wurde. Betrachtet man aber den Derivatigraphen von 3.6.2.3., so zeigt sich, daß die Peroxidbildung bei Überschreitung der oben erwähnten Grenzkonzentration anders verläuft. Der Graph steigt langsam, aber stetig an und erreicht auch nach 7 Stunden nicht die Geschwindigkeit des Referenzexperimentes. Würde die Peroxidbildung bei 3.6.2.3 demselben Mechanismus wie 3.6.2.1 und 3.6.2.2. gehorchen, fände man ein Maximum in der Reaktionsgeschwindigkeit. Deswegen wurde bei Experiment 3.6.2.3 die Reaktionszeit um zwei Stunden verlängert. In Anbetracht der relativen Carotinoidkonzentrationen konnte damit sichergestellt werden, daß bei identischem Reaktionsverlauf genügend lange gemessen wurde, um ein eventuelles Maximum in der Reaktionsgeschwindigkeit zu erfassen. Es zeigt sich aber nur, daß die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich unter der des Referenzexperimentes liegt und erst (bei einer linearen Interpolation) nach 700 Minuten in die Dimensionen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 3.6.2.1 und 3.6.2.2. vordringt.

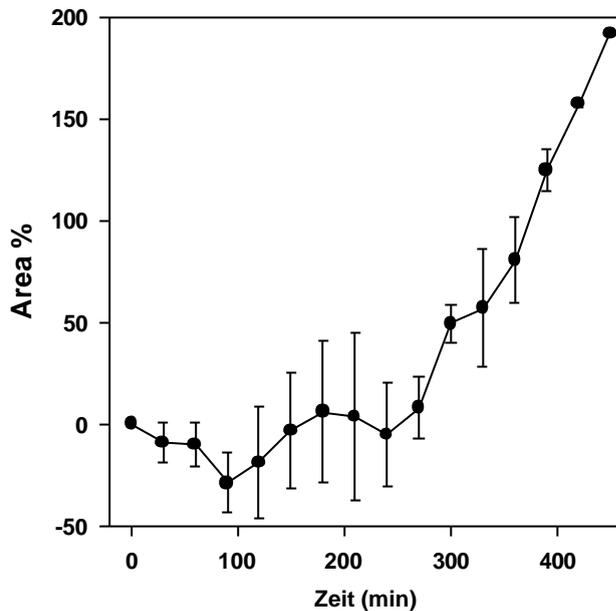


**Abbildung 148:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Die durch dieses Experiment erhaltenen Ergebnisse decken sich in einer Basisaussage mit denen von Burton und Ingold [7]: Der Mechanismus des antioxidativen Effektes ist abhängig von der Carotinoidkonzentration. Durch das Meßverfahren bedingt ergeben sich aber grundsätzlich unterschiedliche Aussagen. Während Burton und Ingold durch ihre Messungen des Sauerstoffpartialdruckes einen prooxidativen Effekt sahen, ist dieser bei den hier vorliegenden Messungen nicht ermittelbar. Man findet sogar einen verstärkten antioxidativen Effekt! Es ist gut möglich, daß bei diesen hohen Carotinoidkonzentrationen überproportional viel Sauerstoff verbraucht wird, dieser dient aber nicht der Peroxidbildung des Cumols.

#### **3.6.2.4 b-Carotin $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$**

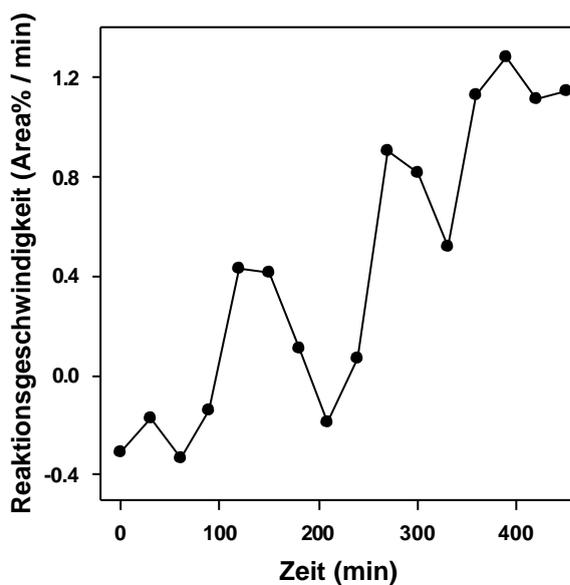
Zur Verifizierung der unter c) beobachteten Effekte wurde die Konzentration des  $\beta$ -Carotins noch einmal erhöht. Die Ergebnisse sind folgende: Wieder einmal zeigt sich, daß kein linearer Zusammenhang zwischen der Antioxidanskonzentration und der Stärke des gemessenen Effektes besteht. Auch sieht man, daß die Fehlerbreite innerhalb der ersten 300 Minuten der Reaktion deutlich ansteigt. Der Graph stellt die Mittelwerte von vier Messungen dar. Damit wäre gezeigt, daß die Reduktion des Peroxides nur eine Nebenreaktion ist, welche auftreten kann, aber durch nicht näher identifizierte Reaktionsparameter ausgelöst wird.



**Abbildung 149:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

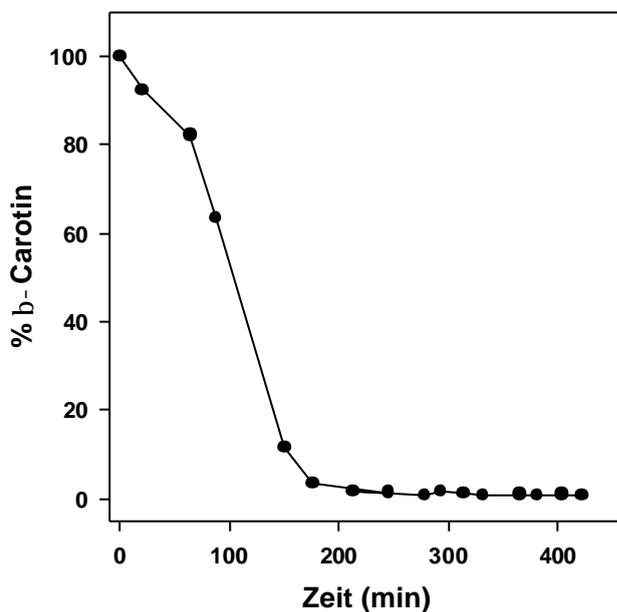
**% Cumolhydroperoxid nach 5h :**  $49 \pm 9 \text{ Area\%}$   
 normierter Wert:  $2.0 \pm 0.4\%$

Diese Fehler pflanzt sich natürlich auch in den Derivatigraphen fort. Die einzige Aussage, welche man treffen kann ist, daß die Reaktionsgeschwindigkeit, trotz hoher Schwankungen ansteigt und in einem Bereich liegt, welcher deutlich unter der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes anzusiedeln ist.



**Abbildung 150:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Für die Auswertung des Graphens für den Abbau des reinen  $\beta$ -Carotins gilt dasselbe wie bei 3.6.2.3. Eine mathematische Behandlung der Ergebnisse wäre reine Willkür. Als Anhaltspunkt für einen Vergleich zwischen den Experimenten 3.6.2.3. und 3.6.2.4. kann man sagen, daß bei 3.6.2.3. nach 120 Minuten noch 2% der Ursprungskonzentration des  $\beta$ -Carotins vorhanden sind, bei 3.6.2.4. sind es 3.4% nach 180 Minuten. Dieser Wert entspricht den Erwartungshaltungen bei der verwendeten Konzentration. Hier deutet sich bei 90 min ein Plateaubildungseffekt an, der in Kapitel 3.6.3.4. beim Astaxanthin ausführlich diskutiert wird.

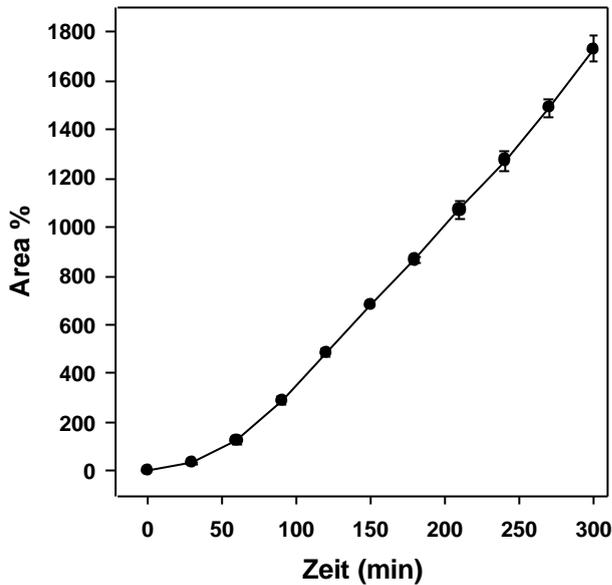


**Abbildung 151:** Abbau von  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Die in den Kapiteln 3.6.2.1 bis 3.6.2.4 gefundenen Effekte werden noch einmal im Zusammenhang mit dem prooxidativen Effekt im Kapitel 3.7.4. diskutiert.

### **3.6.3.1. Astaxanthin $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$**

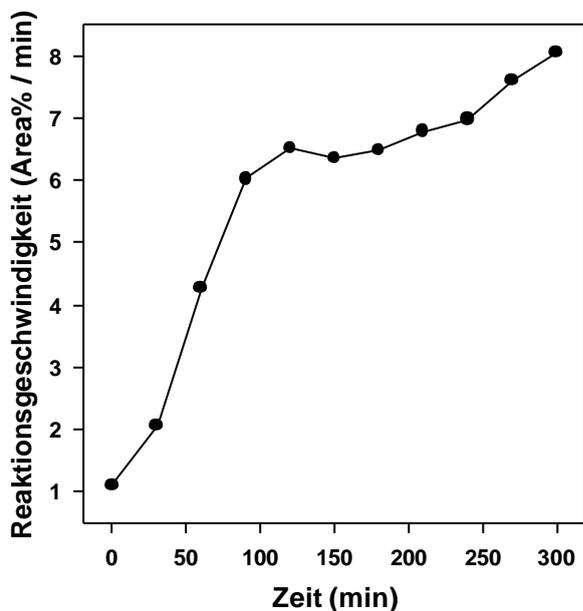
Bei dieser Konzentration ist der Unterschied in den antioxidativen Effekten von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin sehr gering. Die Ergebnisse zeigen zwar, daß Astaxanthin ein besseres Antioxidans ist als  $\beta$ -Carotin (Astaxanthin:  $72.2 \pm 2.1\%$ ,  $\beta$ -Carotin:  $82.5 \pm 1.9\%$  relativ zu 100% Cumolhydroperoxid im Referenzexperiment), der eigentliche Effekt ist sehr schwach. Dies ist jedoch in Anbetracht der geringen Antioxidanskonzentration nicht erstaunlich.



**Abbildung 152:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

**%Cumolhydroperoxid**  
**nach 5h:**  $1729 \pm 51 \text{ Area\%}$   
 normierter Wert:  $72.2 \pm 2.1\%$

Ähnlich wie beim  $\beta$ -Carotin ist es auch hier nicht möglich einen sinnvollen Graphen für den Abbau des Astaxanthins zu präsentieren. Nach 45 Minuten wird kein Astaxanthin mehr von Detektor registriert.



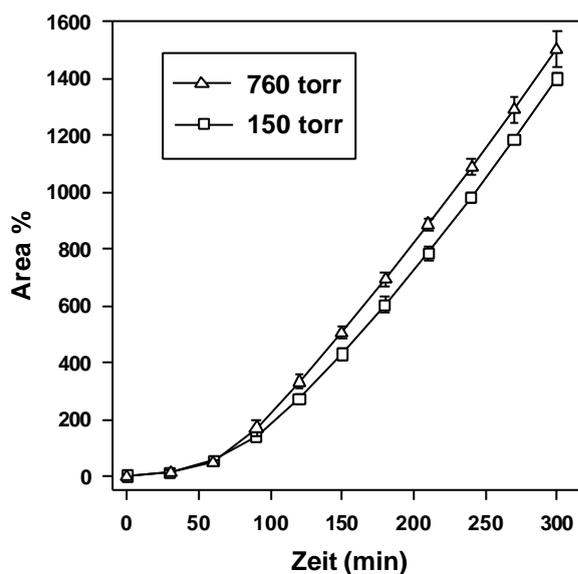
**Abbildung 153:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

Der Derivatigraph der Peroxidbildung zeigt einen ähnlichen Verlauf wie beim  $\beta$ -Carotin. Auch hier ist keine direkte Inhibitionsperiode zu beobachten. Die

Reaktionsgeschwindigkeit steigt in den ersten 90 Minuten sehr steil an und erreicht nach 300 Minuten einen Wert, der dimensionsmäßig im Bereich der Geschwindigkeit der uninhibierten Oxidation des Cumols liegt. Im Gegensatz zum  $\beta$ -Carotin durchläuft die Reaktionsgeschwindigkeit kein absolutes, sondern nur ein lokales Maximum. Dies bedeutet, daß beim Astaxanthin keine reaktionsbeschleunigenden Intermediate auftreten oder daß die Reaktivität der antioxidativen Abbauprodukte höher ist als die von potentiell prooxidativen.

### 3.6.3.2. Astaxanthin $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Bei dieser Konzentration wurde zusätzlich noch die Abhängigkeit der Peroxidbildung von der Sauerstoffkonzentration untersucht:



**Abbildung 154:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

#### **% Cumolhydroperoxid nach 5h:**

a) 150 torr:  $1396 \pm 21$  Area%

normierter Wert:  $58.3 \pm 1.0\%$

b) 760 torr:  $1500 \pm 61$  Area%

normierte Werte:

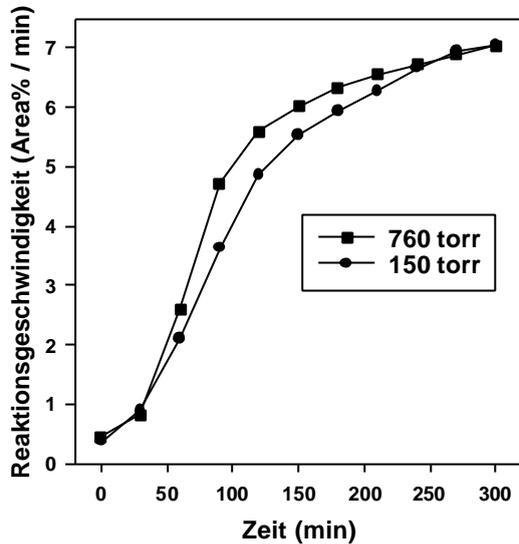
$57.0 \pm 0.9\%$  (760)

$62.7 \pm 2.5\%$  (150)

Die Normierung auf die Referenzexperimente bei 150 torr und 760 torr zeigt, daß die relative Aktivität des Antioxidans hier unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck ist. Bei jedem Druck ist der Abfall der Peroxidbildung im Rahmen des zufälligen Fehlers gleich. Der Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes ist also geringer als angenommen.

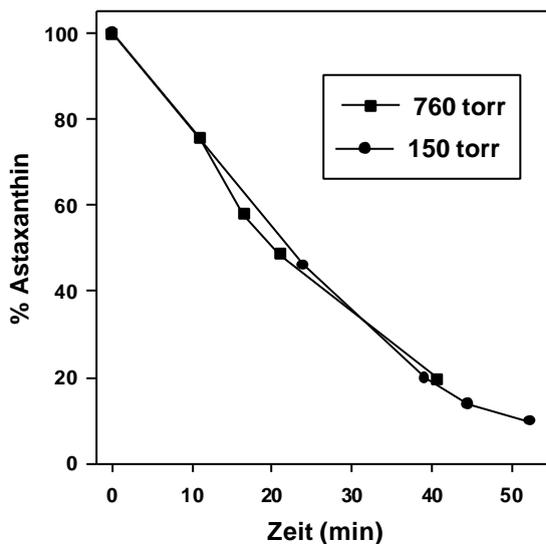
Im Derivatigraphen zeigt sich, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten, unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck gegen einen Grenzwert streben. Auch in der Anfangsperiode der Reaktion sind die Geschwindigkeiten bei beiden Partialdrücken im Rahmen des

experimentellen Fehlers identisch. Dies bedeutet, daß im Verlauf der Reaktion der Partialdruck des Sauerstoffs eine immer untergeordnetere Rolle spielt:



**Abbildung 155:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) bei 760 torr und 150 torr Sauerstoffpartialdruck

Hier zeigt sich auch noch einmal deutlich, daß das Abklingen der Reaktionsgeschwindigkeit nicht auf einen möglichen Mangel von Sauerstoff im Reaktionsgefäß zurückzuführen ist. Wäre dies der Fall, so würde der Graph der Messung unter reiner Sauerstoffatmosphäre weiter ansteigen.

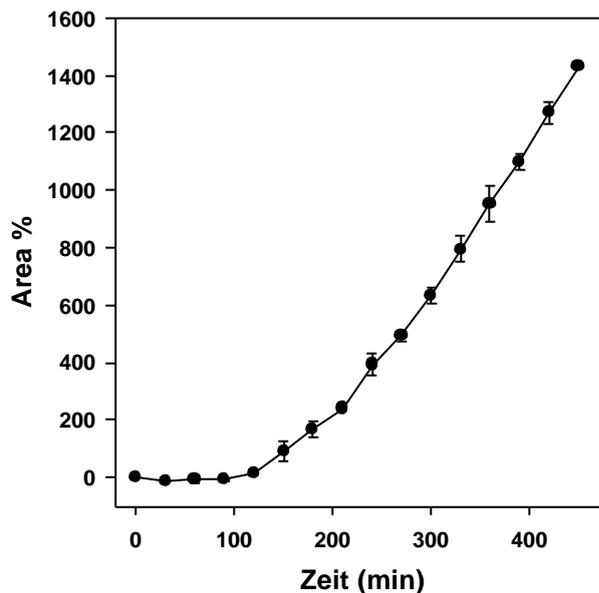


**Abbildung 156:** Abbau von Astaxanthin (Konzentration  $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) bei 760 torr und 150 torr Sauerstoffpartialdruck im Reaktionssystem

Auch in den Messungen für den Abbau des Astaxanthins setzt sich der oben diskutierte Trend fort. Wie man dem Graphen direkt entnehmen kann, besteht praktisch kein Unterschied zwischen den Messungen bei verschiedenen Drücken. In beiden Fällen ist das Astaxanthin nach 50 Minuten zu über 90 % verbraucht: Bei diesen Ergebnissen ist es auch nicht möglich, Aussagen über autokatalytische Effekte während des Abbaus zu treffen.

### **3.6.3.3. Astaxanthin $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$**

Bei dieser Konzentration verlängert sich wie erwartet durch die Erhöhung der Antioxidansmenge auch das Intervall in dem keine Peroxidbildung zu registrieren ist:



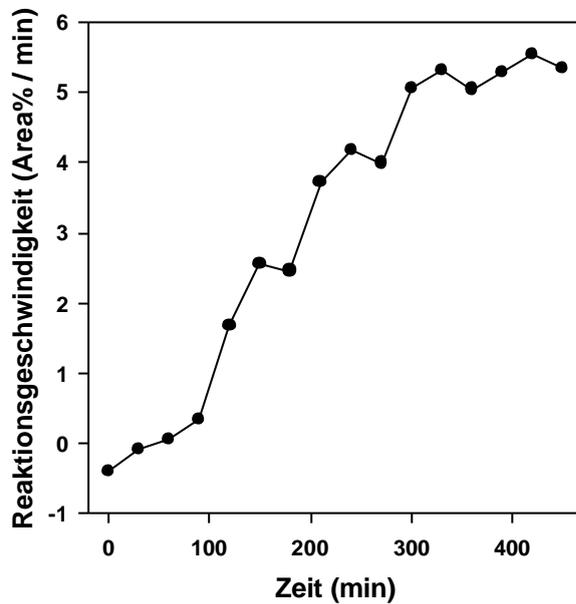
**Abbildung 157:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**% Cumolhydroperoxid  
nach 5h :  $633 \pm 30$  Area%**  
normierter Wert:  $26.4 \pm 1.3\%$

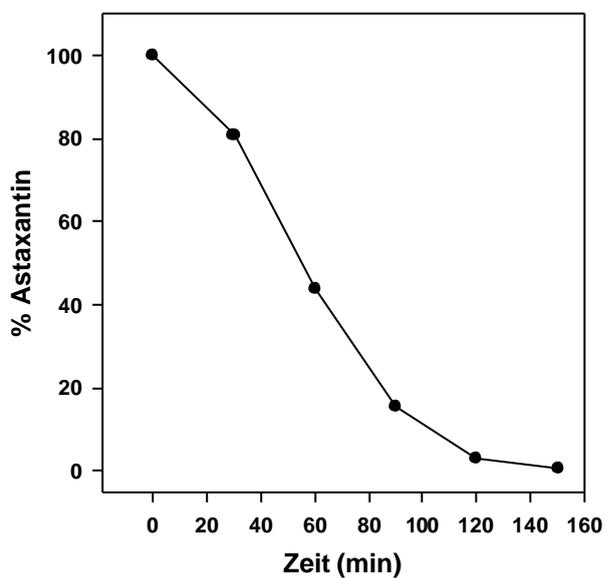
Vergleicht man den Derivatigraphen und den Graphen für den Abbau des reinen Carotinoids (s.u.), so stellt man fest, daß nach 90 Minuten, wenn 90% des Astaxanthins verbraucht sind, der Derivatigraph stark ansteigt. Die an diesem Punkt vorliegende Astaxanthinkonzentration liegt im Bereich der in Experiment 3.6.3.1. verwendeten. Während dort die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb von 90 Minuten von 1.1% auf 6% Peroxid/min ansteigt, steigt in diesem Experiment die Geschwindigkeit von 0.3% auf 2.4 % Peroxid/min.

Hier zeigt sich einmal mehr, daß die Abbauprodukte des Antioxidans in den Mechanismus eingreifen. Wäre die antioxidative Reaktivität nur von der

Effektivkonzentration des Antioxidans abhängig, so müßten der Derivatigraph von 3.6.3.3. nach 90 Minuten parallel zu dem von a) verlaufen.



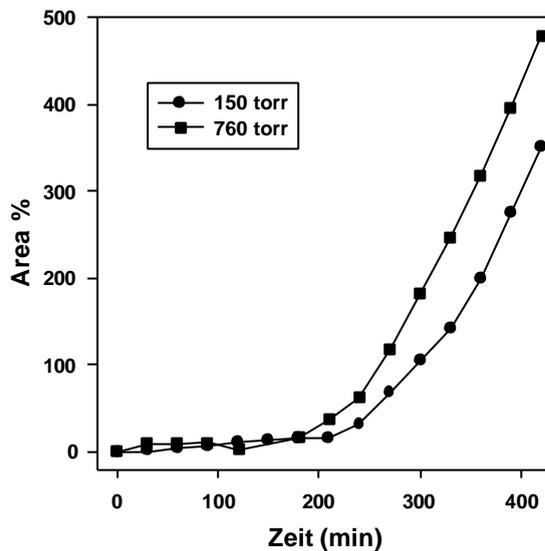
**Abbildung 158:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )



**Abbildung 159:** Abbau von Astaxanthin (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

### 3.6.3.4. Astaxanthin $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$

Auch bei dieser Konzentration wurde wie bei Experiment 3.6.3.2. noch zusätzlich die Abhängigkeit der Reaktion von Sauerstoffpartialdruck untersucht:



**Abbildung 160:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

#### % Cumolhydroperoxid nach 5h:

a) 150 torr:  $105 \pm 4$  Area%

normierter Wert:  $4.4 \pm 0.2\%$

b) 760 torr:  $183 \pm 6$  Area%

normierte Werte:

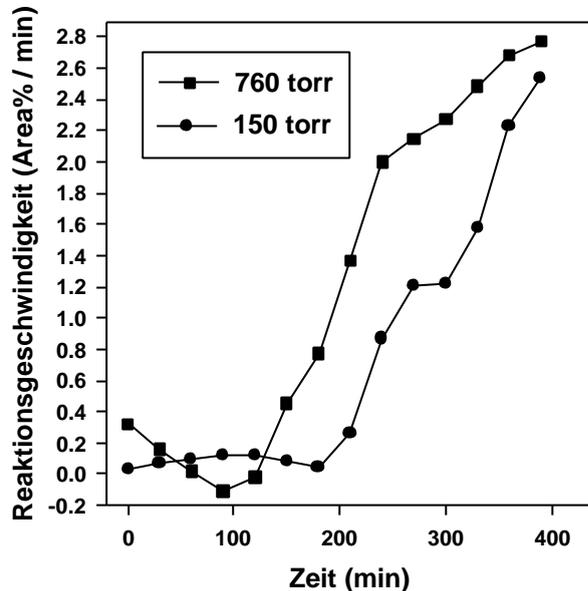
$7.0 \pm 0.3\%$  (760 torr)

$7.6 \pm 0.3\%$  (150 torr)

Es ist direkt ersichtlich, daß in diesem Fall der Sauerstoffpartialdruck einen sehr starken Einfluß auf die Peroxidbildung ausübt. Nach 5 Stunden liegt der Faktor zwischen den Messungen bei 150 torr und 760 torr Sauerstoffpartialdruck bei 1.7. Nach 6.5 Stunden ist dieser Faktor aber dann auf 1.3 gefallen. Im Referenzexperiment betrug dieser Faktor gemittelt über die Zeit  $1.1 \pm 0.02$ , war also im Rahmen eines geringen Fehlers konstant. Damit zeigt sich, daß Astaxanthin bzw. dessen Abbauprodukte prinzipiell auch als Cooxidantien für die Reaktion angesehen werden müssen

Bei hohen Astaxanthin- und Sauerstoffkonzentrationen steigt die Menge des gebildeten Peroxides überproportional relativ zur Referenzreaktion an. Dieser Effekt fällt unter die Definition der Krypto-Prooxidativität. Es wird zwar bei 760 torr relativ mehr Peroxid gebildet, als auf Grund des Referenzexperimentes zu erwarten wäre, die antioxidative Eigenschaft steigt aber gleichzeitig auch, bedingt durch die Erhöhung der Astaxanthinkonzentration, entsprechend an. In der Summe ergibt sich damit ein deutlich antioxidativer Effekt. Damit kann man sagen, daß krypto-prooxidative Effekte zwar theoretisch möglich sind, aber wesentlich schwächer sind als die antioxidativen Effekte.

Der Derivatigraph von Experiment 3.6.3.4 zeigt Eigenschaften, welche sich nicht eindeutig interpretieren lassen:



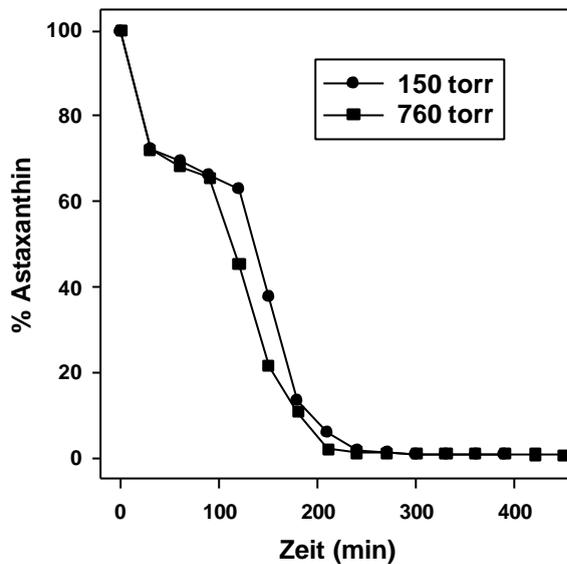
**Abbildung 161:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Astaxanthin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) bei 760 und 150 torr Sauerstoffpartialdruck

Die Peroxidbildung bei 760 torr durchläuft im Intervall von 0-90 Minuten ein Minimum und steigt dann steil an. Dieses Minimum wird bei 150 torr nicht beobachtet. Dies bedeutet, daß bei hohem Sauerstoffpartialdruck und hoher Astaxanthinkonzentration Peroxide vernichtet werden! Ein ähnlicher Effekt wurde bereits beim  $\beta$ -Carotin bei dieser Konzentration beobachtet.

Man sieht außerdem, daß nach 390 Minuten die Graphen für die Peroxidbildung ineinander übergehen. Dies bedeutet, daß nach genügend langer Reaktionszeit, wenn alles Astaxanthin und ein Großteil von dessen Abbauprodukten verbraucht sind, der Sauerstoffpartialdruck wieder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Es ist bemerkenswert, daß nach dieser Zeit die Reaktionsgeschwindigkeit immer noch deutlich unter der der Referenzexperimente (760 torr: 8,8 Area%/min, 150 torr 8,0 Area% / min) liegt. Damit wäre wieder einmal gezeigt, daß es verschiedene Arten von Abbauprodukten geben muß, welche in den Mechanismus eingreifen.

Die Graphen für den Abbau des Astaxanthins im Reaktionssystem zeigen einen Effekt, welcher bis dato noch nicht so explizit beobachtet wurde:



**Abbildung 162:** Abbau von Astaxanthin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) im Reaktions-system

Man sieht direkt, daß die Abbaureaktion unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck ist. Beide Experimente liefern im Rahmen der Meßgenauigkeit des Experimentes identische Ergebnisse.

In den ersten 30 Minuten der Reaktion werden 27% des eingesetzten Astaxanthins verbraucht. Danach klingt die Reaktion sehr stark ab. Im Intervall von 30-120 Minuten werden nur 10% des Astaxanthins verbraucht. Der Graph durchläuft ein relativ zur übrigen Abbaugeschwindigkeit genähertes Plateau. Dies bedeutet, daß der gewöhnlich logarithmisch verlaufende Abbau des Astaxanthins in diesem Fall teilweise zum Erliegen kommt. In dem gleichen Intervall wird auch die Peroxidbildung des Cumols deutlich zurückgedrängt. Dies kann nur bedeuten, daß es bei genügend hoher Astaxanthinkonzentration Bereiche gibt, in denen nicht nur das Cumol, sondern auch das Astaxanthin selbst geschützt wird. Wäre diese antioxidative Aktivität hauptsächlich vom reinen Astaxanthin abhängig, so dürfte dieser Effekt nicht auftreten. Die Unterdrückung der Peroxidbildung und des Abbaus von Astaxanthin wären bei diesem Reaktionspfad untrennbar miteinander verbunden.

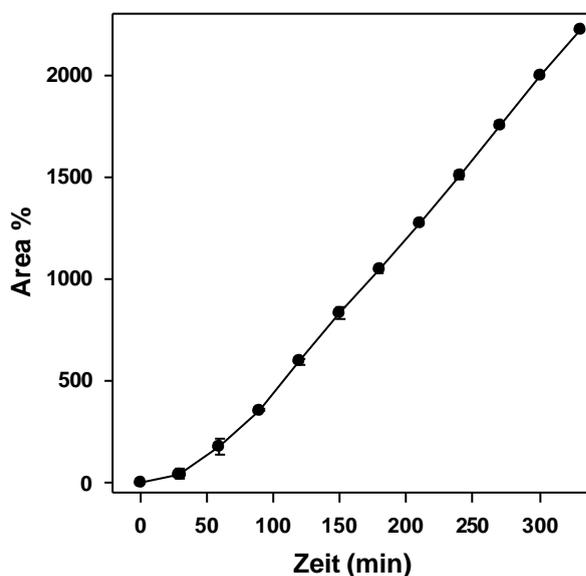
Betrachtet man Antioxidation als alternativen Reaktionspfad zur Peroxidation, so ist zu sagen, daß ein oder mehrere Abbauprodukte des Astaxanthin so hochreaktiv sind, daß sie nicht nur die Oxidation des Cumols verhindern, sondern auch Angriffe auf das Astaxanthin selbst blockieren. Bezüglich des Cumols reichen theoretisch geringe

Mengen dieser Abbauprodukte aus. Dies zeigt sich deutlich in den Experimenten 3.6.3.1 und 3.6.3.2. Zum Schutz des Astaxanthins selber werden größere Mengen benötigt, welche sich auch erst bei der Verwendung höherer Ausgangskonzentrationen von Astaxanthin bilden können.

Die hohe Reaktivität dieser oben erwähnten Intermediate ist damit untrennbar mit einem wesentlich höherem Bedarf an diesen Molekülen verbunden. Dies bedingt die hohen Astaxanthinkonzentrationen, damit immer genügend Moleküle dieser Spezies nachgeliefert werden können. Ab einer bestimmten Konzentration ist dieses Gleichgewicht nicht mehr gegeben und der Abbau des Astaxanthins verläuft wieder sehr schnell.

### **3.6.4.1. $\alpha$ -Tocopherol $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$**

$\alpha$ -Tocopherol ist ein phenolisches Antioxidans und zeigt damit auch andere Wirkungsmechanismen als die untersuchten polyenischen Antioxidantien auf.

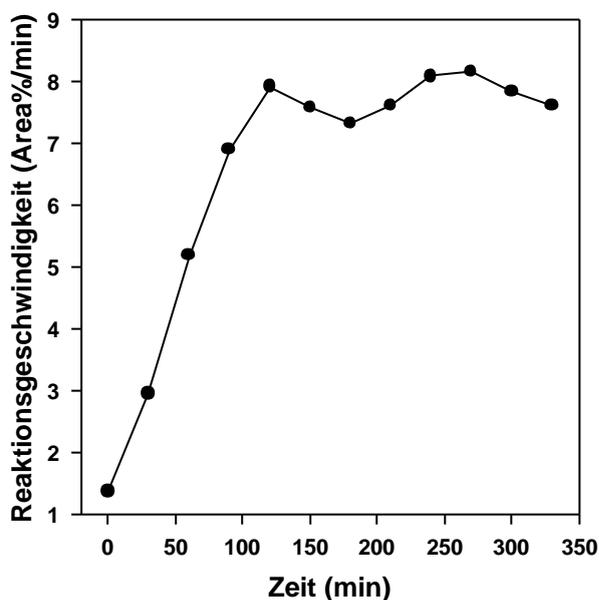


**Abbildung 163:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

**% Cumolhydroperoxid nach 5h :**  $2224 \pm 3 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $92.9 \pm 0.1\%$

Bei den Messungen im Cumolsystem war  $\alpha$ -Tocopherol mit Abstand das beste Antioxidans. Dort lagen aber auch andere Konzentrationsverhältnisse vor. Bei dem hier vorliegenden Verhältnis von Substrat zu Antioxidans von  $1 : 5.56 \cdot 10^{-4}$  statt  $1 : 0.01$  liegt die Wirksamkeit des  $\alpha$ -Tocopherols ungefähr im Bereich von  $\beta$ -Carotin. Astaxanthin ist bei dieser Konzentration ein deutlich besseres Antioxidans (s. 3.6.3.1.).

Dies bedeutet, daß die Wirksamkeit der verschiedenen Substanzklassen von Antioxidantien mit deren Relativkonzentration gegenüber dem Substrat gekuppelt ist. Im Derivatigraph sieht man, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten 100 Minuten steil ansteigt und sich anschließend auf dem Niveau der Referenzreaktion einpendelt. Dieser Kurvenverlauf ist mit dem Graphen für Astaxanthin bei identischen Mengenverhältnissen vergleichbar. Trotzdem sind die antioxidativen Eigenschaften des  $\alpha$ -Tocopherols dem Astaxanthin in diesem Fall unterlegen.



**Abbildung 164:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

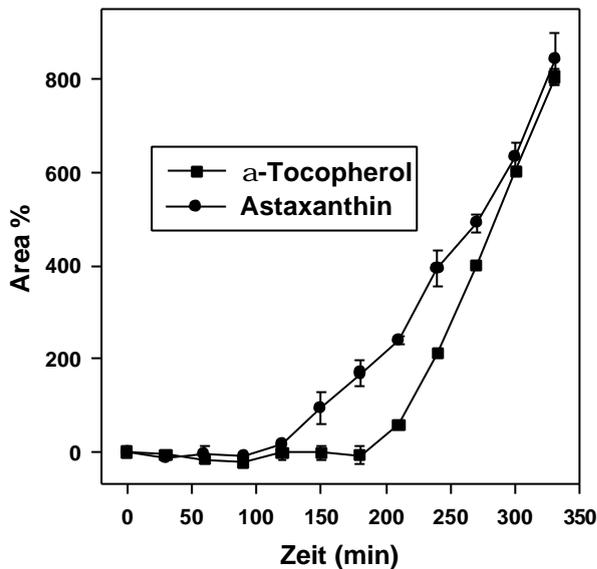
Die deutlichen Unterschiede in der Wirksamkeit dieser beiden Substanzen zeigen sich erst in den folgenden Experimenten.

#### **3.6.4.2. $\alpha$ -Tocopherol $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$**

Bei diesem Experiment wurde die Antioxidansmenge gegenüber Experiment 3.6.4.1 um den Faktor 5 erhöht. Zur besseren Diskussion werden in den folgenden Diagrammen neben dem Graphen für die Peroxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol noch die Auftragungen für Astaxanthin mit eingetragen.

Der Graph zeigt, daß man in diesem Fall zwar wie immer den (willkürlich) festgelegten Peroxidgehalt nach 5 Stunden zur Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften des  $\alpha$ -Tocopherols heranziehen kann, hier aber der Verlauf der Meßkurven unterhalb dieses

Zeitpunktes so unterschiedlich ist, daß eine Diskussion der Peroxidbildung zwischen 0 min und 300 min benötigt wird. Bei allen anderen bis jetzt besprochenen Experimenten war dies nicht nötig. Die Werte bei 300 min repräsentierten höher aufgelöste Ergebnisse eines eindeutigen Trends, der bis zu diesem Zeitpunkt anhielt.

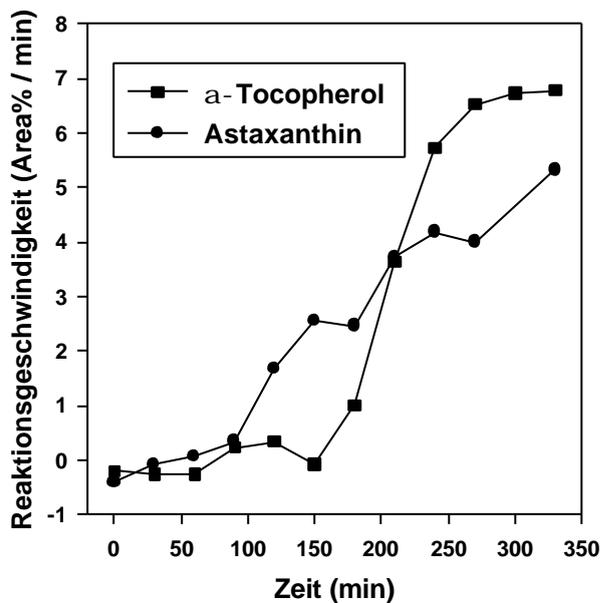


**Abbildung 165:** Cumylhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**%Cumylhydroperoxid nach 5h:**  $603 \pm 8 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $25.2 \pm 0.3\%$

**Astaxanthin:**

$633 \pm 30 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $26.4 \pm 1.3\%$

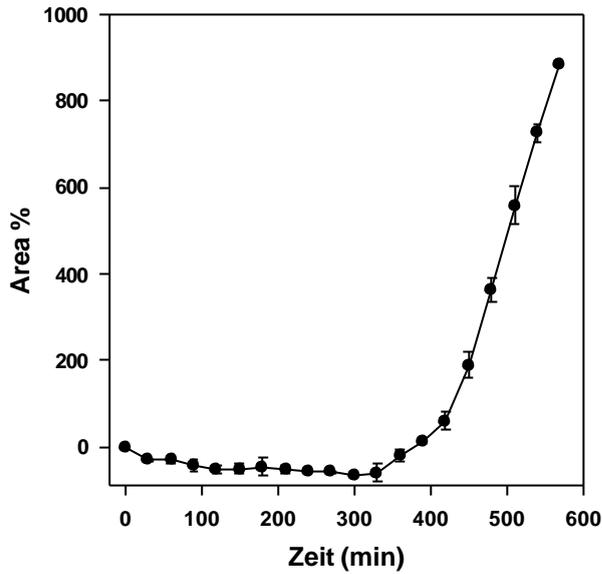


**Abbildung 166:** Derivatigraph der Cumylhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) und Astaxanthin ( $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

Die Peroxidbildung zeigt unterschiedliche Verläufe. Während beim  $\alpha$ -Tocopherol 180 min keine Peroxidbildung registrierbar ist, sind beim Astaxanthin zu diesem Zeitpunkt schon Peroxide entstanden. Ab 300 min scheinen die Graphen parallel zu verlaufen. Der Derivatigraph zeigt, daß beim Astaxanthin die Peroxidbildung langsam aber stetig stattfindet. Das  $\alpha$ -Tocopherol zeigt einen Kurvenverlauf, den man sich für ein Antioxidans dessen Abbauprodukte keine, bzw. eine vernachlässigbar geringe antioxidative Wirkung haben vorstellt: Solange  $\alpha$ -Tocopherol vorhanden ist, wird die Peroxidbildung komplett unterdrückt. Ab einen gewissen Punkt, bei dem die Konzentration des  $\alpha$ -Tocopherols so stark gesunken ist, daß es keine ernsthafte Konkurrenz zur Peroxidation des Substrates darstellt (nach ca. 150 min), steigt die Reaktionsgeschwindigkeit steil an und pendelt sich auf einem Wert etwas unterhalb der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes ein. Dieser Verlauf läßt den Schluß zu, daß die Abbauprodukte des  $\alpha$ -Tocopherols bei der gegebenen Basiskonzentration, wie bereits erwähnt nur, in geringem Ausmaß am Ende der Reaktion einen minimal antioxidativen Effekt ausüben, bzw. eine nicht genügend hohe Lebensdauer besitzen um deutlich wirksam zu sein. Beim Astaxanthin ist nach 5 Stunden nur eine Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, welche ca. 60% der des Referenzexperimentes beträgt. Würde man diese Graphen interpolieren, so ist zu sagen, daß bei kurzen Reaktionszeiten  $\alpha$ -Tocopherol ein deutlich besseres Antioxidans ist als Astaxanthin. Sobald jedoch das  $\alpha$ -Tocopherol verbraucht ist, wird Astaxanthin zum besseren Antioxidans, da dessen Wirkungsweise nicht nur mit seiner Anwesenheit, sondern auch mit dessen Abbauprodukten stark zusammenhängt.

### **3.6.4.3. $\alpha$ -Tocopherol $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$**

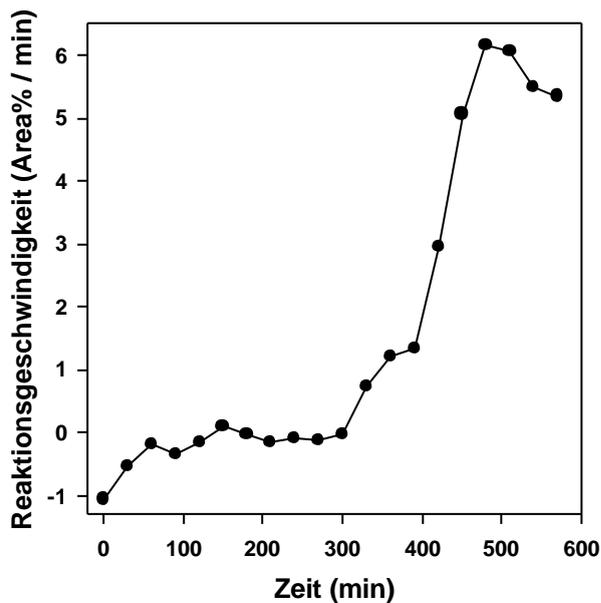
Hier wurde die Antioxidansmenge noch einmal verdoppelt. Die Ergebnisse dieser Experimente setzen den in 3.6.4.2. angedeuteten Trend fort: Während der ersten 330 min der Reaktion wird kein Peroxid gebildet. Man beobachtet sogar wieder einen geringen Abbau der Peroxide, welcher auch schon z.B. bei 3.6.2.4. auftrat. Dieser Abbau der Peroxide wird nur bei sehr hohen Konzentrationen an Antioxidans beobachtet. Auch hier ist es nicht zweckmäßig den Peroxidgehalt bei 300 min mit den anderen Experimenten zu vergleichen, da auf Grund der hohe Antioxidanskonzentration das Einsetzen der eigentlichen Peroxidation erst jenseits dieses Zeitintervalls beginnt.



**Abbildung 167:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

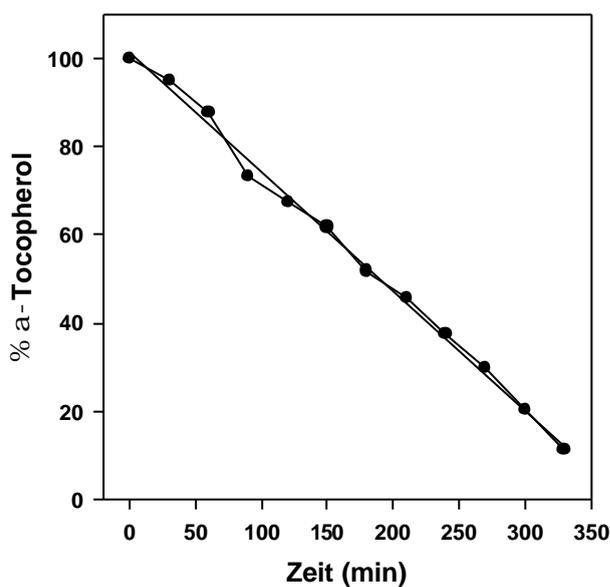
**% Cumolhydroperoxid nach 5h :**  $-64 \pm 4 \text{ Area\%}$   
 normierter Wert:  $-2.7 \pm 0.2\%$

Beim  $\alpha$ -Tocopherol befindet man sich nach 300 min noch in dem Bereich wo die Peroxidmenge unterhalb des Ausgangswertes liegt, beim Astaxanthin liegt der Meßwert bei 104. Nach 420 min beträgt der Wert für  $\alpha$ -Tocopherol 59 Area%, für Astaxanthin Area % 351. Dies zeigt wieder, daß bei hohen Konzentrationen  $\alpha$ -Tocopherol das bessere Antioxidans ist.



**Abbildung 168:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Die Derivativauftragung zeigt tendenziell denselben Verlauf wie bei 3.6.4.2.: 300 Minuten wird die Peroxidbildung komplett unterdrückt, anschließend steigt der Graph steil an und pendelt sich nach 480 Minuten auf einem Wert unterhalb der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes ein. Hier zeigt sich, daß auch die Abbauprodukte des  $\alpha$ -Tocopherols antioxidative Eigenschaften haben müssen. Um diesen Effekt jedoch auszunutzen sind wesentlich höhere Mengen an  $\alpha$ -Tocopherol nötig, als bei den verglichenen Carotinoiden.



**Abbildung 169:** Abbau von  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Lineare Regression:

Steigung:  $-0.27\% / \text{min}$

Ordinatenabschnitt: 101.17

Regressionskoeffizient: 0.996

In diesem Versuch gelang es zusätzlich, Daten über den Abbau des  $\alpha$ -Tocopherols zu erhalten: Nach 300 Minuten sind 80% des  $\alpha$ -Tocopherols verbraucht (Astaxanthin : 150 min). Damit ist der außergewöhnlich gute antioxidative Effekt des  $\alpha$ -Tocopherols zu erklären. Der Abbau verläuft wieder linear (s. Kapitel 3.5.3.) und nicht wie beim Astaxanthin teilweise gekrümmt. Die Abbauprodukte des  $\alpha$ -Tocopherols haben somit keine positiven oder negativen Effekt auf die Geschwindigkeit des Abbaus dieser Substanz. Geht man von der Basistheorie aus, daß ein Antioxidans eine Konkurrenzsubstanzen zum Substrat während der Peroxidation darstellt, so hat die Substanz mit der höheren Lebensdauer auch eine höhere Wirksamkeit. Bei den Carotinoiden ist der Abbau der Reinsubstanz mit der Güte des antioxidativen Effektes gekuppelt:  $\beta$ -Carotin wird schneller abgebaut als Astaxanthin und besitzt auch deutlich

schlechtere antioxidative Eigenschaften; C<sub>26</sub>-Diketon wird langsamer abgebaut als Astaxanthin und besitzt bessere antioxidative Eigenschaften. Dies bedeutet für die Carotinoide, daß Struktur und Reaktivität der Abbauprodukte einen deutlich größeren, wenn nicht sogar entscheidenden Einfluß auf den Reaktionsverlauf haben.

Korreliert man die Menge von  $\alpha$ -Tocopherol während der Reaktion, so kann man sagen, daß bis zu einer Grenzkonzentration von ca.  $4 \cdot 10^{-4}$  mol/l  $\alpha$ -Tocopherol die Peroxidation des Cumols vollständig unterdrückt. Unterhalb dieser Konzentration wird der antioxidative Effekt stark abgeschwächt, ist aber immer noch vorhanden.

### **3.6.5. BHT-CAR**

Die Verbindung **59** (Struktur: s. Seite 32), welche auch als BHT-CAR bezeichnet wird, besitzt von allen im Cumolsystem untersuchten Substanzen mit Abstand die besten antioxidativen Eigenschaften. Ihre überragende Antioxidativität begründet sich aus einer Kombination von phenolischem und polyenalem Antioxidans.

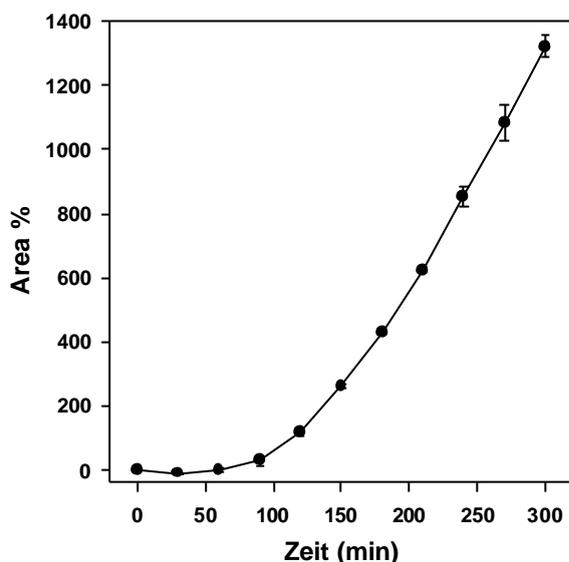
Im Methyllinoleatsystem wurden Antioxidantien gefunden, deren Wirkungsgrad besser als Astaxanthin, aber schlechter als  $\alpha$ -Tocopherol war. Die vergleichende Diskussion der antioxidativen Wirksamkeit aller Verbindungen wird dann in Kapitel 3.7 ff. zeigen, daß die Eigenschaften von BHT-CAR auch auf das Methyllinoleatsystem übertragen werden müssen. Somit ist BHT-CAR eines der besten Antioxidantien, welche es zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt.

#### **3.6.5.1. BHT-CAR $2 \cdot 10^{-4} M$**

Schon bei der geringsten untersuchten Konzentration bleibt die Peroxidbildung deutlich unterhalb der Mengen, welche beim Astaxanthin, das in den Experimenten mit Cumol bei dieser Konzentration bis jetzt das beste Antioxidans war, gefunden wurde. Es bilden sich nur 77% der Peroxidmenge relativ zum Astaxanthin. Die Induktionsperiode, ab welcher im Meßgraphen ein deutlicher Anstieg der Peroxidbildung zu verzeichnen ist, verlängert sich von 60 auf 90 min.

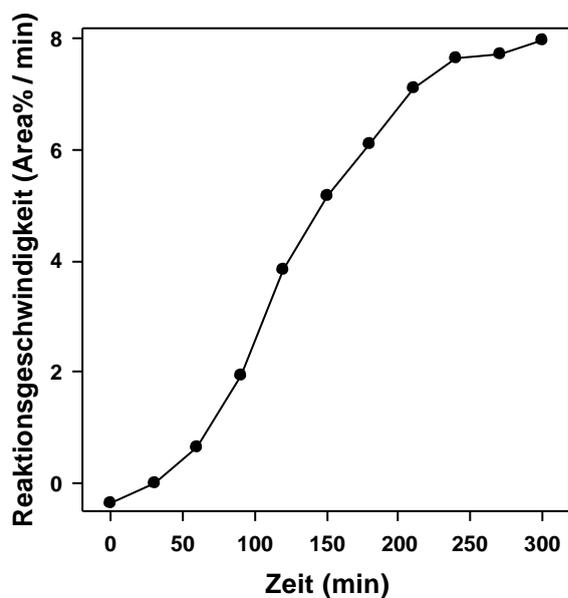
Interessant ist in diesem Fall der Derivatigraph (Abb. 171). Der Verlauf der Kurve ähnelt dem bei Experiment b) bei  $\alpha$ -Tocopherol gemessenen. Man sieht zunächst eine Induktionsperiode, dann steigt der Graph an und liegt ab 240 min im Bereich des Graphen des Referenzexperimentes. Der Bereich der Reaktionsbeschleunigung von

90-240 min verläuft aber wesentlich flacher als beim  $\alpha$ -Tocopherol. Dieser Kurvenverlauf ist eher typisch für ein polyenisches Antioxidans als für ein phenolisches. Somit zeigt sich schon im ersten Experiment, daß die Kombination der notwendigen Strukturparameter für antioxidative Eigenschaften wirklich gelungen ist.



**Abbildung 170:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT-CAR  
(Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**  
 $1323 \pm 32 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $55.3 \pm 1.3 \%$



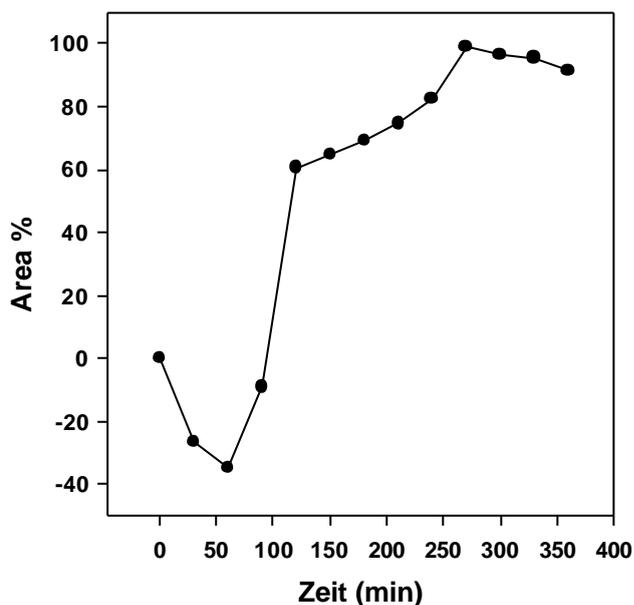
**Abbildung 171:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT-CAR  
(Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

Ein Graph für den Abbau des reinen BHT-CAR wird hier nicht präsentiert, da bereits nach 40 min die Ausgangssubstanz nicht mehr detektierbar war. Dies ist ein Hinweis

darauf, daß die Oxidationsempfindlichkeit der Substanz so hoch ist, daß diese direkt in das entsprechende Chinon bzw. dessen Abbauprodukte übergeht. Der Anteil der phenolischen antioxidativen Wirkung ist also am Anfang so stark, daß diese den Effekt des Polyensystems überkompensieren müßte. Sobald die polyenische antioxidative Wirkung einsetzt, ändert sich auch der Mechanismus, was im Derivatigraphen, wie oben bereits erwähnt, zum Ausdruck kommt.

Hier zeigt sich bereits, daß das BHT-CAR die bereits diskutierten Vorteile der verschiedenen Antioxidansklassen vereint: BHT-CAR wirkt am Anfang der Reaktion sehr stark, so wie es phenolische Antioxidantien tun und im Verlauf der Reaktion auch sehr stark, so wie man es bei polyenischen Antioxidantien beobachtet.

### 3.6.5.2. BHT-CAR $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$



**Abbildung 172:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT-CAR (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**

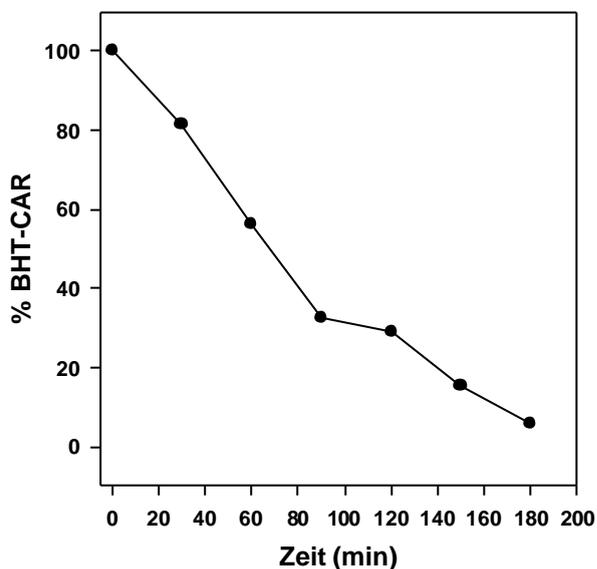
$97 \pm 2 \text{ Area\%}$

normierter Wert:  $4.1 \pm 0.1\%$

In diesem Experiment wurde die Reaktion nur über 360 min verfolgt. Wie man deutlich sieht, setzt beim BHT-CAR die Zerstörung des Peroxides deutlich schon bei dieser Konzentration ein. Das BHT-CAR wirkt also nicht nur als Antioxidans, welches die Peroxidation des Cumols verhindert, sondern auch als Reduktionsmittel. Bei den anderen gemessenen Verbindungen sah man dieses Effekt erst deutlich ab einer

Konzentration von  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l Antioxidans. Vergleicht man das Ergebnis dieses Experimentes mit  $\alpha$ -Tocopherol oder Astaxanthin, so ist das BHT-CAR diesen beiden Verbindungen deutlich überlegen. Während dort nach 5 Stunden bereits Peroxidmengen von  $25.2 \pm 0.3\%$  bzw.  $26.4 \pm 1.3\%$  ermittelt wurden, zeigt sich beim BHT-CAR ein Peroxidwert von  $4.1 \pm 0.1\%$ .

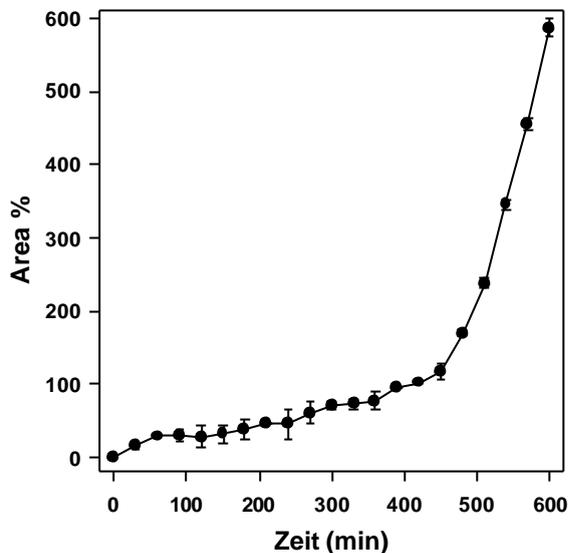
Die starken Schwankungen in diesem Bereich und das kurze Reaktionsintervall können bei einer Derivativauftragung zu falschen Schlüssen führen. Deswegen wurde in diesem Fall auf diese Auftragung verzichtet.



**Abbildung 173:** Abbau von BHT-CAR (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Der Graph für den Abbau des reinen BHT-CAR während der Reaktion ist auch nicht eindeutig auswertbar. Man kann nicht sagen, ob der Verlauf linear oder logarithmisch ist. Es ist aber zu bemerken, daß ab dem Zeitpunkt, wo im Graphen für die Peroxidbildung der erste Anstieg registriert wird (60 min) nur noch 56% des BHT-CAR übrig sind. Ab dieser Konzentration ist keine Zerstörung von Peroxid bzw. komplette Unterdrückung der Peroxidation vorhanden. An diesem Punkt reicht die BHT-CAR-Konzentration nicht mehr aus um reduktiv zu wirken. Die Geschwindigkeit der Peroxidbildung liegt aber immer noch deutlich unter der des Referenzexperimentes.

### 3.6.5.3. BHT-CAR $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$



**Abbildung 174:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT-CAR (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

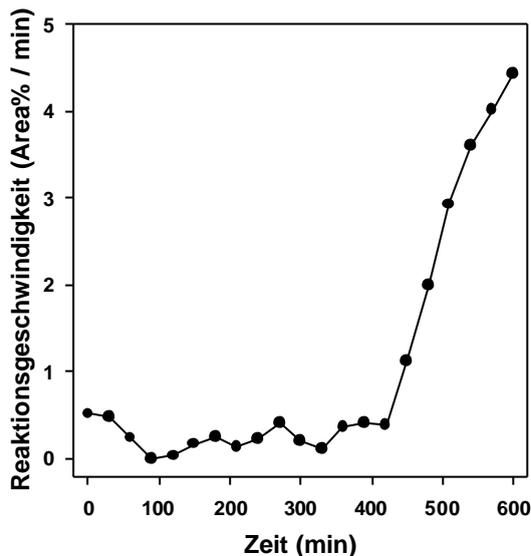
**%Cumolhydroperoxid nach**

**5h:**  $70 \pm 5 \text{ Area\%}$

normierter Wert:  $2.9 \pm 0.2\%$

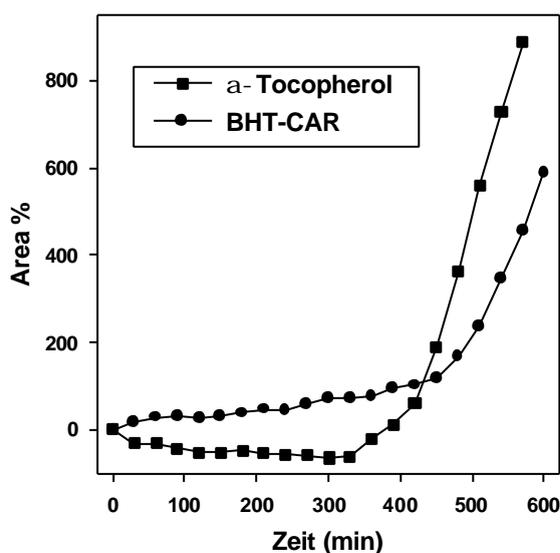
Gegenüber den natürlichen Carotinoiden zeigt BHT-CAR bei dieser Konzentration eine starke Überlegenheit in der Wirksamkeit. Die Peroxidmenge, welche beim Astaxanthin nach 7 Stunden erreicht wird, ist beim BHT-CAR erst nach 9 Stunden entstanden. Es ist in diesem Fall nicht sinnvoll, den willkürlich gewählten Zeitpunkt von 5 Stunden Reaktionszeit zu vergleichen, da bei diesen hohen Konzentrationen die Peroxidbildung sehr spät einsetzt. Zwar erhält man nach 5 Stunden das Ergebnis, daß die gebildete Menge Peroxid in Gegenwart von BHT-CAR kleiner ist, als in Gegenwart von Astaxanthin, aber der quantitative Vergleich nach einem längeren Reaktionsintervall erhöht die Auflösung des Verfahrens beträchtlich. Die Kurvenverläufe von Astaxanthin und BHT-CAR schneiden sich nicht. Auch Interpolationen zeigen keine potentiellen Schnittpunkte an. Dies bedeutet, daß BHT-CAR zu jedem Zeitpunkt der Reaktion ein besseres Antioxidans ist, als Astaxanthin. Dieses Ergebnis sichert noch einmal die Möglichkeit eines qualitativen Vergleichs der untersuchten Substanzen zu einem willkürlich definierten Zeitpunkt. Die einzigen Substanzen bei denen (potentielle) Schnittpunkte zwischen zwei Vergleichsgraphen auftreten, sind die phenolischen Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol und BHT. Gründe dafür sind grundsätzliche mechanistische Unterschiede zwischen phenolischen und polyenischen Antioxidantien. Eine Diskussion dieses Effektes wird neben den Kurzdiskussionen der Einzelmessungen in diesem Kapitel noch ausführlich in Kapitel 3.7. ff. geführt. Deutlicher sieht man die

oben erwähnten Effekte, wenn man die Derivatigraphen für die Peroxidbildung direkt miteinander vergleicht: Während beim Astaxanthin der Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bereits nach 200 Minuten beginnt (s.3.6.3.4.), registriert man beim BHT-CAR erst nach 430 Minuten einen deutlichen Anstieg. Damit wäre gezeigt, daß BHT-CAR dem Astaxanthin in seiner Wirkungsweise vollständig überlegen ist.



**Abbildung 175:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT-CAR (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

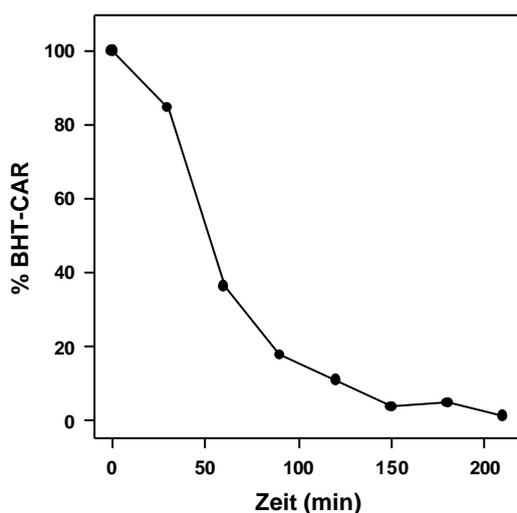
Ein interessanter Effekt zeigt sich, wenn man die Meßgraphen für BHT-CAR und  $\alpha$ -Tocopherol direkt miteinander vergleicht:



**Abbildung 176:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT-CAR (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) und  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Beim  $\alpha$ -Tocopherol tritt zunächst die beobachtete Reduktion der Peroxide ein, während beim BHT-CAR von Anfang an ein kleiner Anstieg in der Peroxidbildung zu verzeichnen ist. Vergleicht man die Peroxidmengen nach 5 Stunden, so betragen die Einzelwerte 70 Area% für BHT-CAR und -64 Area% für  $\alpha$ -Tocopherol. Diese -64 Area% beim Tocopherol entsprechen gleichzeitig dem Minimum des Graphens der Peroxidbildung. Relativiert man diese Werte auf das Referenzexperimentes (2493 Area%. nach 5h), so entstehen beim BHT-CAR 97% weniger Peroxide, beim  $\alpha$ -Tocopherol 103% weniger Peroxide. [Anmerkung: Es ist immer zu beachten, daß der Startwert für die Peroxidmenge auf Null normiert ist. Peroxide sind bei allen Experimenten in kleinen Startmengen vorhanden. Deswegen ist es auch möglich, daß negative Werte für die Peroxidbildung verzeichnet werden. S. auch 3.4.6.]

Nach 440 Minuten schneiden sich die Graphen. Dies zeigt wieder, daß carotinoidähnliche Antioxidantien auf lange Sicht besseren Schutz vor Oxidationen liefern.  $\alpha$ -Tocopherol ist nur wirksam, wenn es vorhanden ist. Bei Carotinoiden können die Abbauprodukte also auch einen starken Einfluß auf die Reaktion ausüben. Dieser Effekt wurde bereits bei Astaxanthin und  $\beta$ -Carotin beobachtet und deswegen liegt die Schlußfolgerung nahe, daß man ihn auf polyenische Antioxidantien verallgemeinern kann.



**Abbildung 177:** Abbau von BHT-CAR (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Der Vollständigkeit halber wurde hier noch der Graph für den Abbau von BHT-CAR aufgeführt. Man sieht direkt, daß diese Verbindung bei hohen Konzentrationen keine

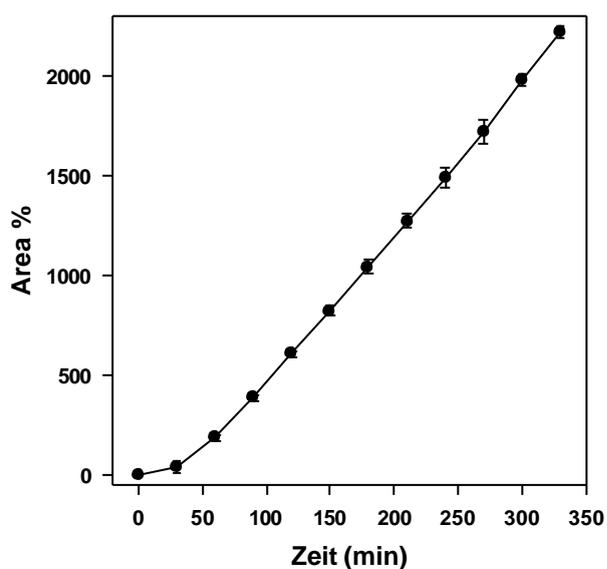
Plateaubildung zeigt, wie das Astaxanthin. Gleichzeitig ist zu erkennen, daß beim BHT-CAR der carotinoide Charakter stärker ist als der phenolische. Während beim  $\alpha$ -Tocopherol der Abbau des Antioxidans linear verläuft, sieht man hier wieder eine Meßkurve, welche eher auf einen autokatalytischen Verlauf schließen läßt:

### 3.6.6.1. BHT $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$

BHT **6** ist ein weiteres phenolisches Antioxidans. Die Wirkungsweise dieser Verbindung wurde bereits auf Seite 9 erläutert. Wie die Meßgraphen zeigen, ist BHT in der kleinsten verwendeten Konzentration ein relativ schlechtes Antioxidans. Sein Wirkungsgrad liegt ungefähr im Bereich von  $\beta$ -Carotin.

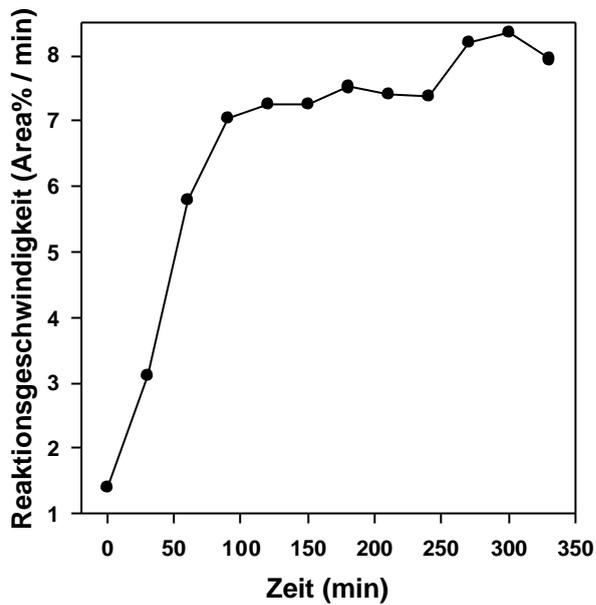
Eine deutliche Schutzwirkung ist nur in den ersten dreißig Minuten zu erkennen. Man kann diesen Bereich aber nicht unbedingt als Induktionsperiode bezeichnen, da in diesem Intervall auch Peroxidbildung stattfindet.

Anschließend steigt der Graph für die Peroxidbildung steil an und die Reaktionsgeschwindigkeit pendelt sich auf einem Wert ein, der im Rahmen des zufälligen Fehlers mit der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes identisch ist. In diesem Konzentrationsbereich zeigen die Abbauprodukte des BHT keine antioxidative Wirksamkeit. Sobald es verbraucht ist, kann die Peroxidation des Cumols nicht mehr verhindert werden.



**Abbildung 178:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

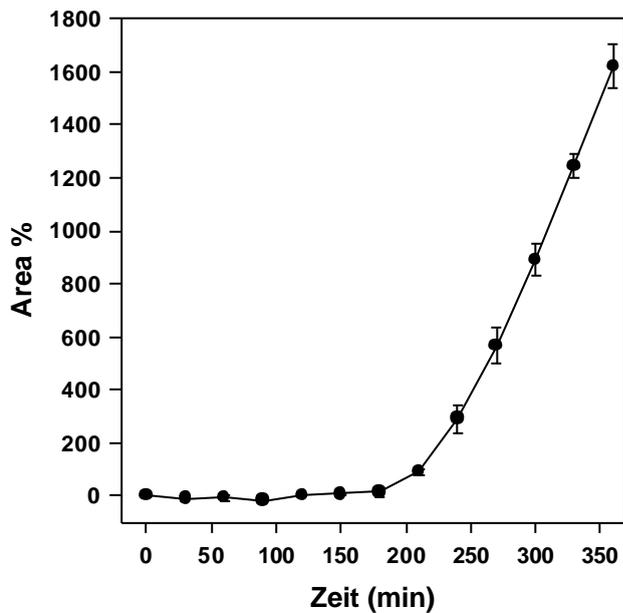
**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**  $1981 \pm 21 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $82.7 \pm 0.9\%$



**Abbildung 179:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT  
(Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

### 3.6.6.2 BHT $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$

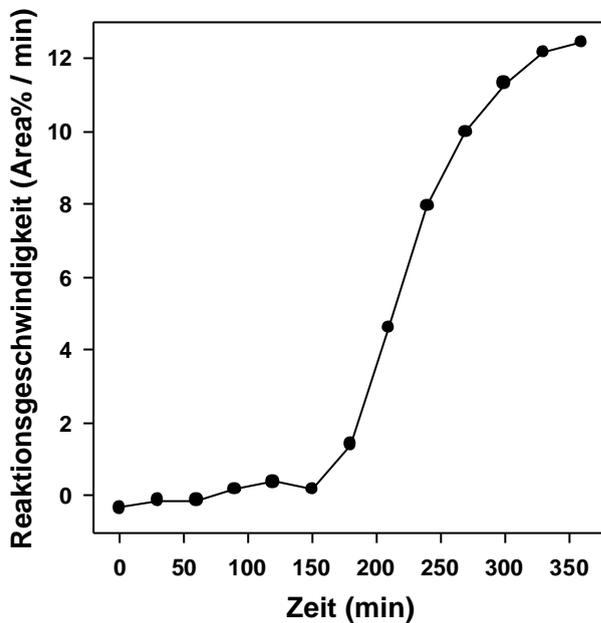
Bei dieser Basiskonzentration ist die Wirksamkeit von BHT etwas schlechter als bei  $\beta$ -Carotin:



**Abbildung 180:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**% Cumolhydroperoxid nach 5h:**  $890 \pm 59 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $37.2 \pm 2.5\%$

Die gemessene Schutzwirkung des BHT beginnt aber fragwürdig zu erscheinen, wenn man den Derivatigraphen betrachtet:



**Abbildung 181:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

Man sieht in der Anfangsperiode, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidbildung gegen Null strebt. Dann erfolgt ein steiler Anstieg. Die Reaktionsgeschwindigkeit pendelt sich aber nicht im Bereich des Referenzexperimentes (8 Area%/min) ein, sondern geht über diesen Wert hinaus (12 Area%/min). Bei dieser Substanz findet man also zum ersten Mal einen deutlichen krypto-prooxidativen Effekt. BHT ist ein sehr gutes Antioxidans, aber seine Abbauprodukte wirken bei größeren Konzentrationen und langen Reaktionszeiten prooxidativ! Somit ist es nur eine Frage der Zeit, bis die antioxidativen Effekte des BHT durch die prooxidativen Effekte seiner Abbauprodukte überkompensiert werden. Für den Einsatz in Technik und Pharmazie ist diese Substanz deshalb besser zu vermeiden. Anreicherungseffekte der Abbauprodukte könnten bei Verwendung über längere Zeiträume negative Wirkungen für das zu schützende System haben.

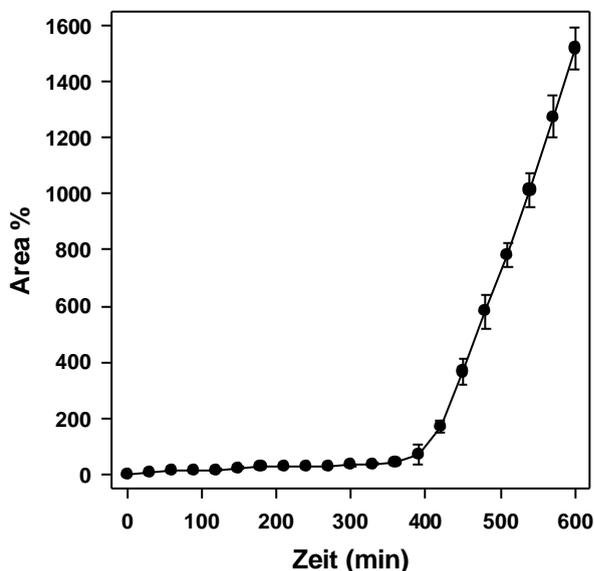
Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen, welche beim BHT-CAR erhalten wurden, so gewinnt der überragende antioxidative Effekt des BHT-CAR noch eine weitere Dimension: BHT-CAR ist nicht nur bei weitem das beste Antioxidans, das im Rahmen dieser Studie gefunden wurde, es deaktiviert zusätzlich noch vollständig den krypto-

prooxidativen Effekt des BHT. Dies liegt an der Veränderung des Wirkungsmechanismus und der Natur der möglichen Abbauprodukte.

### 3.6.6.3. BHT $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$

Bei dieser Konzentration zeigt BHT hervorragende antioxidative Aktivität. Während der ersten 6 Stunden ist nur ein minimaler Anstieg in der Peroxidbildung zu verzeichnen. Dieses Verhalten ist typisch für phenolische Antioxidantien. Man findet einen Kurvenverlauf, wie er in der Literatur [17] diskutiert wird: Das Antioxidans blockiert die Oxidation des Substrates vollständig, solange genügend hohe Mengen vorhanden sind. Bei dem hier durchgeführten Experiment ist die Antioxidansmenge so hoch, daß die Eigenschaften von BHT, welche bei den anderen Konzentrationen von Astaxanthin übertroffen wurden, nun Astaxanthin in der Wirksamkeit überholen.

Im Gegensatz zum  $\alpha$ -Tocopherol wird hier aber kein Abbau der bereits vorhandenen Peroxide beobachtet. BHT besitzt also keine reduktive Wirkung. Auch liegt die antioxidative Wirkung immer noch unterhalb von  $\alpha$ -Tocopherol.



**Abbildung 182:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

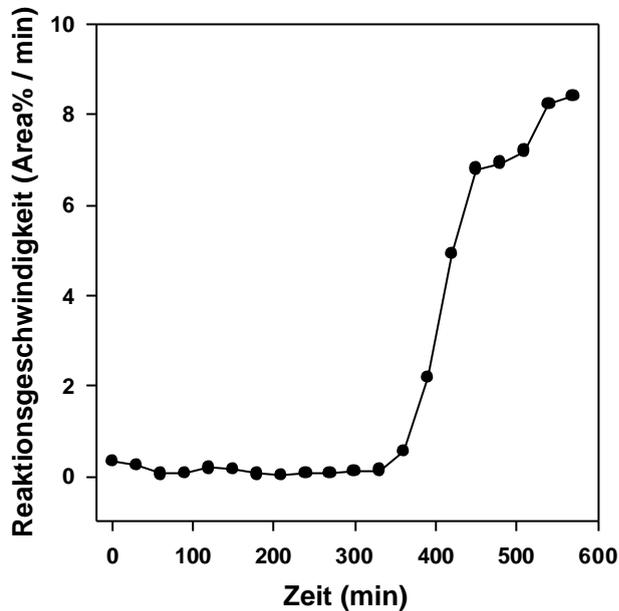
**% Cumolhydroperoxid nach**

**5h:**  $34 \pm 4 \text{ Area\%}$

normierter Wert:  $1.4 \pm 0.2\%$

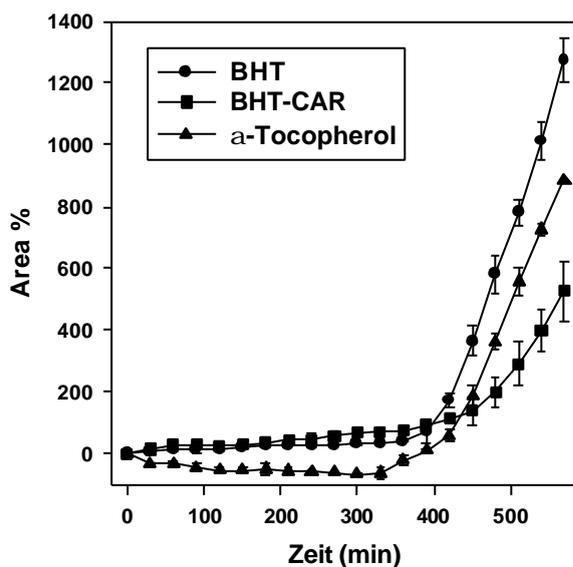
Der Derivatigraph zeigt einen etwas anderen Verlauf als bei 3.6.6.2. Der Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit ist nicht so dramatisch wie dort. Nach 10 Stunden liegt er immer noch im Rahmen des Referenzexperimentes. Die Tendenz zu einer weiteren

Steigerung ist aber deutlich zu erkennen. Zur genaueren Untersuchung dieses Effektes müßte die Reaktionszeit also noch weiter verlängert werden.



**Abbildung 183:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von BHT (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ )

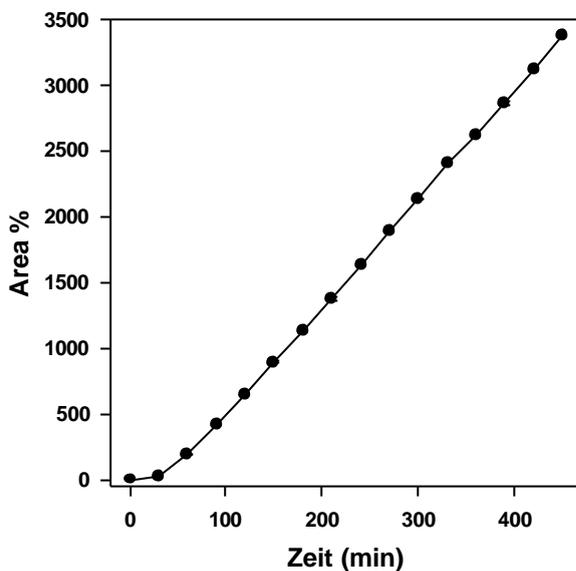
Zur genaueren Wirkungsbestimmung von BHT werden die Ergebnisse für  $\alpha$ -Tocopherol, BHT-CAR und diese Verbindung in einem Diagramm eingezeichnet:



**Abbildung 184:** Vergleich der Wirksamkeiten von BHT, BHT-CAR und  $\alpha$ -Tocopherol (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ )

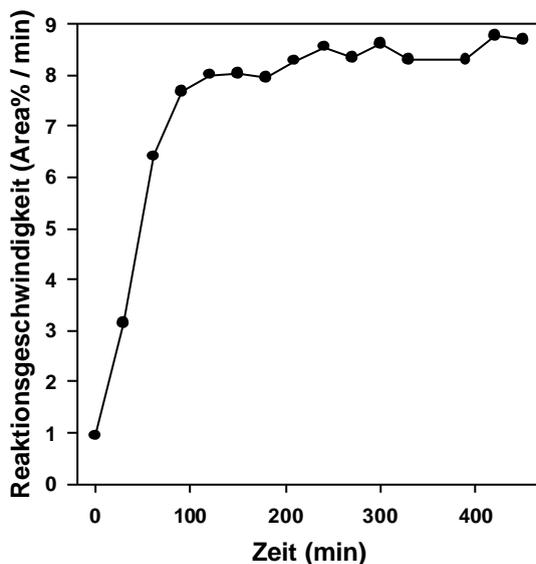
Hier sieht man noch einmal deutlich, daß BHT-CAR im Bezug auf Langzeitwirkung mit Abstand das beste aller untersuchten Antioxidantien ist.

### 3.6.7.1. Lycopin $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$



**Abbildung 185:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Lycopin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**  $2128 \pm 1 \text{ Area\%}$   
 normierter Wert:  $88.9 \pm 0.1\%$



**Abbildung 186:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Lycopin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )

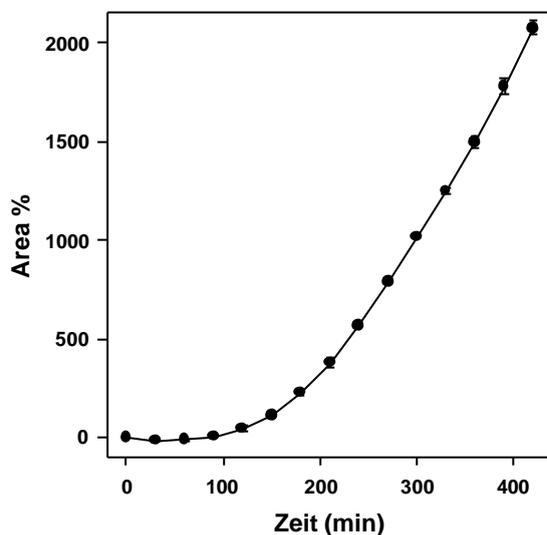
Lycopin **119** (s. Seite 217) hat bei dieser Konzentration von allem im Cumolsystem vermessenen Substanzen die schlechteste antioxidative Wirkung. Leider ist es unter den gegebenen Meßbedingungen nicht möglich, Graphen für den Abbau des Lycopins zu erhalten. Die Substanz eluiert mit dem Lösungsmittel und dem Starter zusammen.

In der Anfangsperiode der Reaktion sieht man wieder eine verminderte Peroxidbildung, aber die Reaktionsgeschwindigkeit steigt innerhalb der ersten 150 Minuten auf den

Wert etwas oberhalb des Referenzexperimentes an, während beim  $\beta$ -Carotin die Endgeschwindigkeit nach 300 Minuten immer noch deutlich unterhalb dieser Referenzgeschwindigkeit lag. Damit liegt die Schlußfolgerung nahe, daß die Abbauprodukte leicht prooxidative Wirkung zeigen.

### **3.6.7.2. Lycopin $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$**

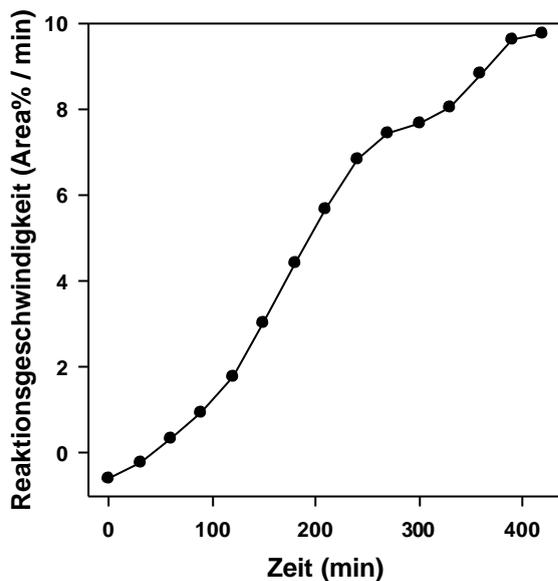
Auch hier setzt sich der Trend fort, welcher sich bei Messung a) ankündigte: Die antioxidative Wirkung von Lycopin liegt immer noch unterhalb der von  $\beta$ -Carotin, wobei die Meßgraphen einen qualitativ sehr ähnlichen Verlauf haben:



**Abbildung 187:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Lycopin  
(Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

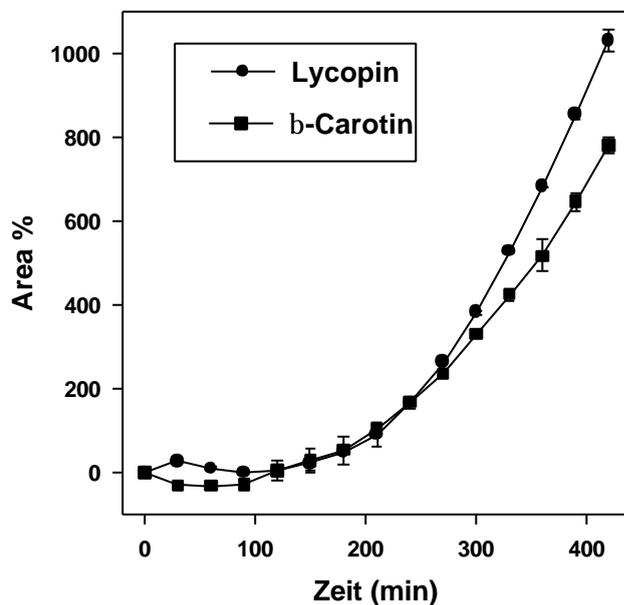
**% Cumolhydroperoxid nach 5h:**  
 $1015 \pm 5 \text{ Area\%}$   
normierter Wert:  $42.4 \pm 2\%$

Der Unterschied in der Reaktivität zeigt sich dann deutlich im Derivatigraphen (Abb. 188). Während beim  $\beta$ -Carotin die Reaktionsgeschwindigkeit nach 7 Stunden immer noch deutlich unterhalb des Referenzexperimentes liegt, wird sie bei Lycopin bereits nach 6 Stunden überschritten. Der Abbau des Lycopins selbst ist in den hier durchgeführten Experimenten auf Grund des apparativen Aufbaus nicht quantitativ verfolgbar. Trotzdem ist zu erwähnen, daß die Entfärbung der Reaktionslösung bei Verfolgung mit bloßem Auge etwas schneller erfolgt, als beim  $\beta$ -Carotin. Dieser Anhaltspunkt gibt Aufschluß darüber, daß in dem Bereich wo die Prooxidativität registriert wurde (Reaktionszeit  $\geq 6$  Stunden), kein Lycopin mehr vorhanden war. Hier zeigt sich erneut, daß die Abbauprodukte des Lycopins nicht nur schlechter wirken als beim  $\beta$ -Carotin, sondern auch noch zusätzlich prooxidatives Potential besitzen.



**Abbildung 188:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Lycopin (Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

### 3.6.7.3. Lycopin $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$



**Abbildung 189:** Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Lycopin bzw.  $\beta$ -Carotin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**

$883 \pm 4 \text{ Area\%}$

normierter Wert:  $16.0 \pm 0.2\%$

**%Cumolhydroperoxid nach 8h:**

$1030 \pm 25 \text{ Area\%}$

normierter Wert:  $43.0 \pm 1.0\%$

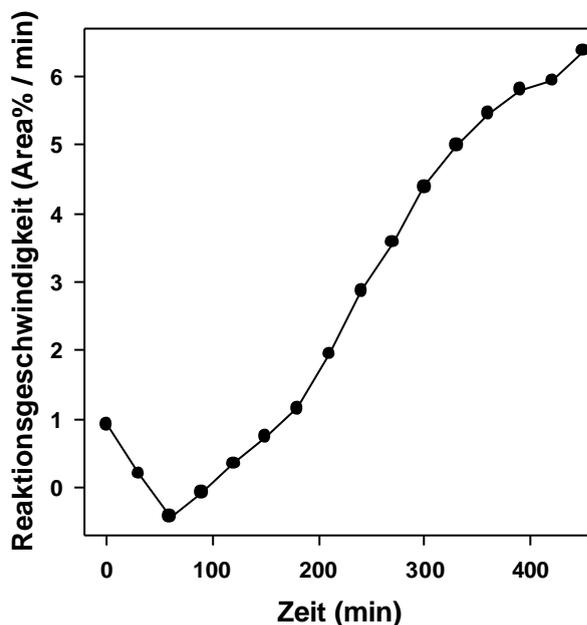
( $\beta$ -Carotin:  $13.8 \pm 0.1\%$  (5h);

$32.5 \pm 0.8\%$  (8h) für normierte Werte)

Auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeiten werden auch die Ergebnisse dieser Messung mit den Ergebnissen für  $\beta$ -Carotin direkt verglichen: Abgesehen von kleinen Unterschieden in der Anfangsphase der Reaktion ist die antioxidative Wirksamkeit für

beide Verbindungen innerhalb der ersten vier Stunden im Rahmen des zufälligen Fehlers identisch:

Die leicht reduktiven Effekte, welche beim  $\beta$ -Carotin schon direkt am Anfang registriert wurden, stellen sich hier erst nach 30 Minuten ein. Diese sieht man deutlich im Derivatigraphen, wo beim  $\beta$ -Carotin von Anfang an die Reaktionsgeschwindigkeit negativ ist, während beim Lycopin die Reaktionsgeschwindigkeit positiv ist und kleiner wird und dann erst reduktive Effekt für eine kurze Zeit einsetzen:



**Abbildung 190:** Derivatigraph der Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von Lycopin (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

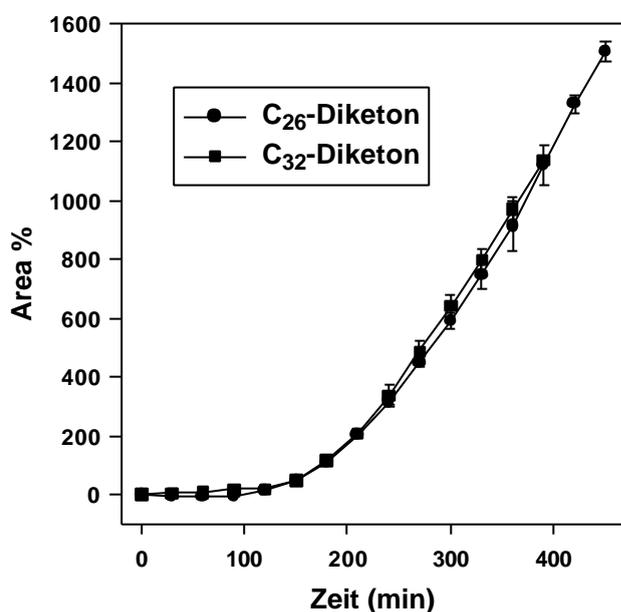
Es ist aber zu berücksichtigen, daß diese reduktiven Effekte, verglichen mit den Oxidationsraten so klein sind, daß sie bei den Carotinoiden keinen deutlichen Einfluß auf die beobachtete Reaktion haben.

Auch hier wird beobachtet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit steiler ansteigt als beim  $\beta$ -Carotin. Erste Vorversuch im Methylinoleat-Meßsystem haben ergeben, daß der Abbau des Lycopins ca. 20% schneller verläuft als beim  $\beta$ -Carotin. Dies gibt eine teilweise Erklärung für die schlechtere antioxidative Wirkung. Dieses Ergebnis erklärt aber nicht die Befunde bei den Versuchen a) und b). Auch hier zeigt sich wieder, daß in den Bereichen, in denen die Antioxidantien selbst vollständig verbraucht sind, die Reaktionsgeschwindigkeit bei den Experimenten mit Lycopin wesentlich höher ist, als

beim  $\beta$ -Carotin. Damit ist die These des bedeutenden Einflusses der Abbauprodukte auf die Reaktion sehr stark untermauert.

Aber auch die prooxidativen Effekte werden zurückgedrängt. Zieht man die Ergebnisse von BHT hinzu, so erhärtet sich der Verdacht, daß diese Effekte nur bei der mittleren Konzentration deutlich auftreten. Im Kapitel 3.7.4. wird auf diesen Effekt noch einmal eingegangen.

### 3.6.8. Spezielle Diketone (96 und 97) $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$



**Abbildung 191** : Cumolhydroperoxidbildung in Gegenwart von C<sub>26</sub>- bzw. C<sub>32</sub>-Diketon (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

**a) C<sub>26</sub>-Diketon**  
**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**

591 ± 25 Area%

normierter Wert: 24.7 ± 1.0%

**b) C<sub>32</sub>-Diketon**

**%Cumolhydroperoxid nach 5h:**

640 ± 36 Area%

normierter Wert: 26.7 ± 1.5%

Zur Überprüfung der guten Eigenschaften des C<sub>26</sub>-Diketons **96** wurde diese Verbindung auch im Cumolsystem bei der Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  untersucht. Zusätzlich wurde auch ihre Schwesterverbindung C<sub>32</sub>-Diketon **97** bei derselben Konzentration vermessen.

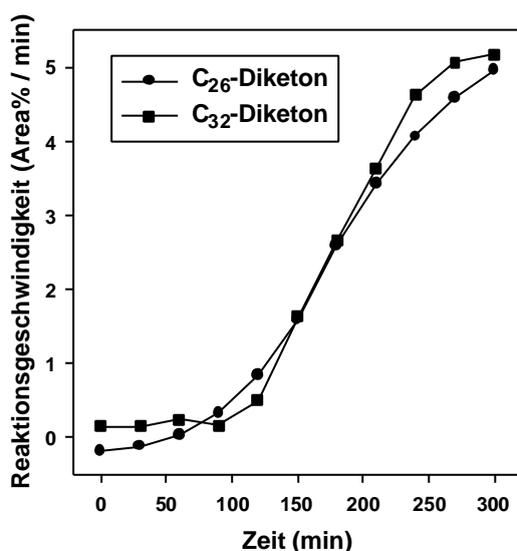
Man sieht, daß die Wirksamkeit des C<sub>26</sub>-Diketons **96** (normierter Wert: 24.7 ± 1.0%) im Bereich von Astaxanthin (normierter Wert: 26.4 ± 1.3%) liegt. Während im Methyllinoleatsystem, bedingt durch die etwas bessere Auflösung, eine Unterscheidung der beiden Verbindungen möglich war, muß man hier auf Grund des zufälligen Fehlers von identischer Wirksamkeit reden. Trotzdem ist tendenziell erkennbar, daß das C<sub>26</sub>-Diketon **96** eine etwas bessere Wirksamkeit als das Astaxanthin besitzt.

Das C<sub>32</sub>-Diketon **97** liegt ebenfalls in diesem Intervall (normierter Wert: 26.7 ± 1.5%).

Die beiden Diketone wurden synthetisiert, da Capsorubin **95** ein deutlich schlechteres antioxidatives Verhalten zeigt als Astaxanthin. Deswegen sollte untersucht werden, ob der verkürzte Chromophor dafür verantwortlich ist. Das C<sub>32</sub>-Diketon **97** entspricht mit seinem terminalen quartären Kohlenstoffzentrum eher der Struktur des Capsorubins.

Die hier erhaltenen Ergebnisse lassen also folgende Schlußfolgerungen zu:

- 1) Der relativ zum Astaxanthin schlechte antioxidative Effekt des Capsorubins **95** liegt allein in der nichtkonjugierten Endgruppe.
- 2) Möglich Wasserstoffabstraktionen in der terminalen Methylgruppe des C<sub>26</sub>-Diketons haben keinen nennenswerten positiven Einfluß auf die Wirksamkeit der Substanz.
- 3) Astaxanthin kann man als ein vinylog verlängertes C<sub>26</sub>-Diketon auffassen. Die Ergebnisse für die Wirksamkeit zeigen, daß entweder die Kettenverlängerung in diesem Maße keinen Einfluß auf die Wirksamkeit hat, oder daß die Endgruppe einen negativen Einfluß auf den antioxidativen Effekt, relativ zum C<sub>26</sub>-Diketon ausübt.

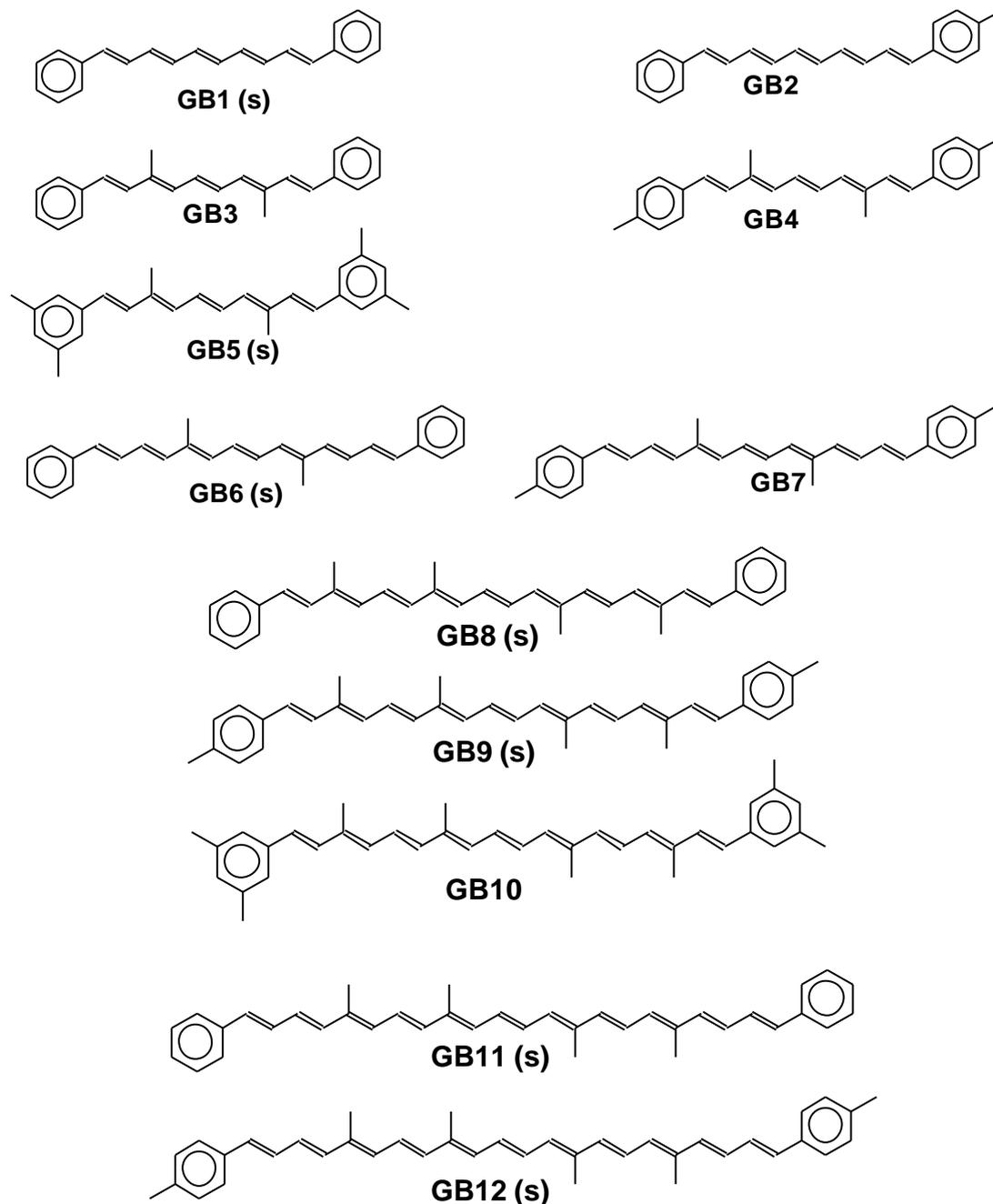


**Abbildung 192:** Derivatigraph der Cumylhydroperoxidbildung in Gegenwart von C<sub>26</sub>- und C<sub>32</sub>-Diketon (Konzentration 2\*10e-3M)

Der Vollständigkeit halber wird in diesem Kapitel noch der Derivatigraph für die Peroxidbildung in Gegenwart der beiden Diketone angegeben. Auch hier zeigt sich der beim Astaxanthin schon beobachtete Effekt, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf einem Wert unterhalb der Geschwindigkeit des Referenzexperimentes einpendelt. Über das Abbauverhalten beider Verbindungen kann hier keine Aussage getroffen werden, da diese unter den experimentellen Bedingungen mit dem Cumol und dem Lösungsmittel zusammen eluieren.

### 3.6.9. Aromatische Polyene

Aufgrund der ersten erfolgreichen Vorversuche (s. Kapitel 3.1.1.2.) auf dem Gebiet aromatischer Polyene wurden von M. Schmidt und Herr G. Bucholski [24] folgende Verbindungen synthetisiert und charakterisiert:



**Abbildung 193:** von M. Schmidt und G. Bucholski synthetisierte Verbindungen **GB1-GB12** [(S) zeigt an, daß die entsprechende Substanz nur in Suspension vermessen werden konnte.]

Die Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften dieser Substanzen wurde ebenfalls von M. Schmidt und G. Bucholski im System Cumol/AMVN durchgeführt. Dabei wurde nur die Konzentration  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  untersucht, da das primäre Interesse die quantitativen Unterschiede zwischen diesen Verbindungen betraf.

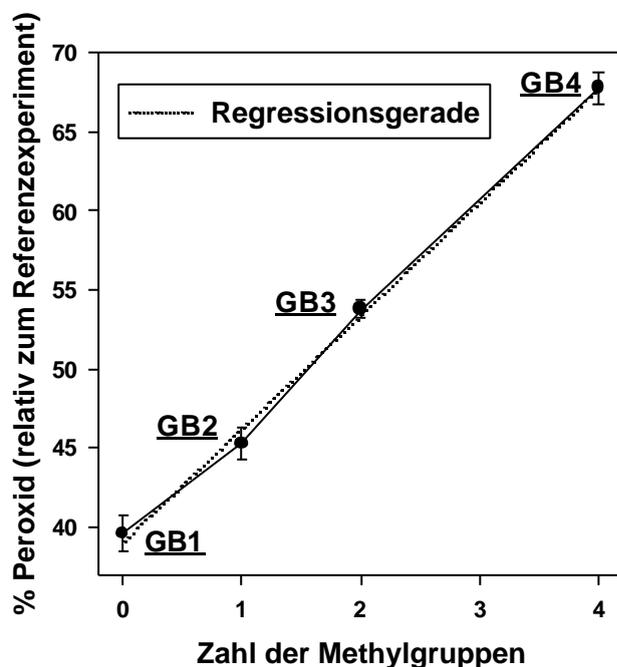
Zuerst ist es nötig eine Korrektur der relativ zum  $\beta$ -Carotin dargestellten Meßwerte durchzuführen. Bei den früheren wurde eine nicht mehr frische Charge  $\beta$ -Carotin verwendet. Deswegen ist die Aktivität dieser Substanz in seiner Diplomarbeit unterbewertet. Die Neuberechnung der Meßwerte für zu folgendem Ergebnissen:

Antioxidans	L = in Lösung S = in Suspension	Endwert Peakfläche Cumolhydroperoxid	% Peroxide
<b>kein Zusatz von Antioxidans</b>	<b>L</b>	<b>2394 ± 34</b>	<b>100.0 ± 1.4</b>
<b><u>GB4</u></b>	L	1623 ± 25	67.8 ± 1.0
<b><u>GB10</u></b>	L	1496 ± 40	62.5 ± 1.7
<b><u>GB3</u></b>	L	1287 ± 18	53.8 ± 0.8
<b><u>GB5</u></b>	S	1124 ± 2	47.0 ± 0.1
<b><u>GB2</u></b>	L	1085 ± 25	45.3 ± 1.0
<b><u>GB1</u></b>	S	947 ± 26	39.6 ± 1.2
<b><u>GB9</u></b>	S	881 ± 12	36.8 ± 0.5
<b><u>GB8</u></b>	S	877 ± 19	36.6 ± 0.8
<b>b-Carotin</b>	<b>L</b>	<b>796 ± 27</b>	<b>33.2 ± 1.1</b>
<b><u>GB7</u></b>	L	784 ± 13	32.7 ± 0.5
<b><u>GB6</u></b>	S	734 ± 7	30.7 ± 0.3
<b><u>GB12</u></b>	S	585 ± 19	24.4 ± 0.8
<b><u>GB11</u></b>	S	583 ± 21	24.3 ± 0.9

**Tabelle 5:** Peroxidbildung von Cumol in Anwesenheit von Antioxidantien (Die Normierung erfolgt auf die Bildung der Peroxide ohne Zugabe von Antioxidantien = 100 %)

Alle Verbindungen zeigen deutlich antioxidative Effekte. Die Ergebnisse sind nicht eindeutig interpretierbar, da die Substanzen teilweise schlecht löslich sind. In diesen

Fällen ist das Antioxidans am Anfang der Reaktion nur suspendiert und löst sich erst später nach. Diese Effekte können durch die hohe Planarität der Verbindungen erklärt werden. Für Verbindung **GB6** wurde von C. Köpsel [76] eine regelmäßige Stapelung berechnet. Dies kann auch bei den anderen schwerlöslichen Verbindungen der Fall sein. Vergleicht man aber die Ergebnisse für **GB8/GB9** und **GB11/GB12**, so sieht man, daß deren antioxidative Potentiale paarweise identisch sind. Dies liefert einen deutlichen Hinweis darauf, daß in Suspension der bereits vorausgesagte schädliche Einfluß von Abstraktionspositionen weitgehend unterdrückt wird. Überträgt man dieses Ergebnis auf Verbindung **GB1**, so kann man sagen, daß dessen antioxidative Wirksamkeit in Lösung annähernd identisch sein müßte, da **GB1** keine Methylgruppen besitzt. Zur weiteren Untersuchung dieser Vermutung werden die Ergebnisse für die Verbindung **GB2-GB4** hinzugezogen: Betrachtet man die Verbindungen **GB2** und **GB3** relativ zu **GB1**, so sieht man, daß pro eingeführte Methylgruppe der antioxidative Effekt um ca. 7% abgeschwächt wird. Trägt man die Mengen des gebildeten Peroxides (relativ zum Referenzexperiment = 100) der einzelnen Verbindungen gegen die Anzahl der Methylgruppen auf, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang:



**Abbildung 194:** Graphischer Zusammenhang zwischen Peroxidbildung und Anzahl der Methylgruppen in den Verbindungen **GB1-GB4**

Nach diesem Graphen ist Verbindung **GB1** von ihrem antioxidativen Potential her rein optisch etwas schlechter als man erwartet. Dies ist durch die Suspension erklärbar.

Nimmt man nun nur die Meßwerte für **GB2-GB4** und bildet für diese Ergebnisse eine lineare Regression, so ergibt der Ordinatenabschnitt den imaginären Wert für Verbindung **GB1** in Lösung. Dieser beträgt 38.3%. Dieses Ergebnis liegt im Rahmen des zufälligen Fehlers (tatsächlicher Meßwert: 39.6% ± 1.2). Damit wäre gezeigt, daß die Verbindung **GB1** sowohl in Lösung, als auch in Suspension identische Ergebnisse zeigen müßte. Dies gibt einen deutlichen Hinweis darauf, daß der Suspensionseffekt auf der Desaktivierung der Methylgruppen beruht.

Verbindung **GB5** fällt aus der Reihe heraus. Diese Verbindung besitzt von allen in Suspension vermessenen Substanzen das geringste antioxidative Potential. Vergleicht man **GB5** mit **GB9** oder **GB12**, so kann diese Aktivität nicht mit der erhöhten Anzahl der Methylgruppen begründet werden, da **GB9** und **GB12** dieselbe Anzahl an Methylgruppen aufweisen. Damit ergibt sich ein deutlicher Hinweis darauf, daß nicht nur die Zahl, sondern auch die Position der Methylgruppen einen entscheidenden Einfluß auf die Reaktivität der Verbindungen haben muß.

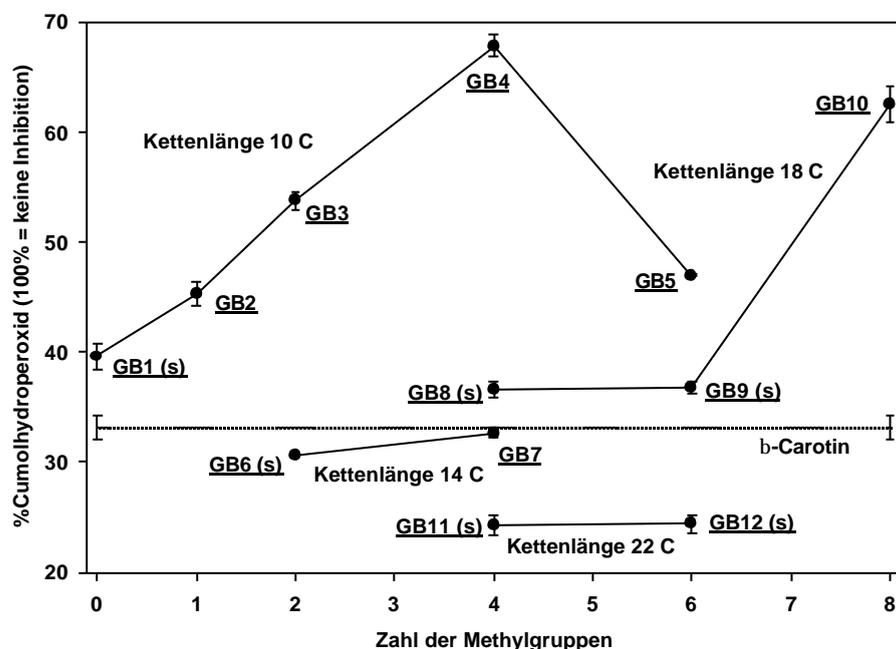
Es ist sehr schwer die Reaktivitäten der höheren Homologen eindeutig zu erklären. Dies liegt daran, daß eine Verlängerung des Polyensystems die antioxidative Wirksamkeit gegenüber den Verbindungen **GB1-GB5** entscheidend verbessert. Gleichzeitig scheint der Einfluß der Methylgruppen immer weiter abzunehmen. Dies ist nicht unbedingt verständlich, da die Verlängerung des Polyensystems auch die Abstraktionswahrscheinlichkeit erhöhen müßte, da die entstehenden Radikale über eine längere Konjugation stabilisiert werden können.

Da aber bei den Verbindungen **GB8/GB9** und **GB11/GB12** der Einfluß der Methylgruppen nicht meßbar ist, ist es gestattet dies in erster Näherung auch für Verbindung **GB6** anzunehmen. Wäre dort ein hoher negativer Einfluß der Methylgruppen vorhanden, wäre das antioxidative Potential von **GB6** wesentlich schlechter. Zusätzlich zeigt Verbindung **GB7**, welche in Lösung vermessen werden konnte, daß der Einfluß der Methylgruppen im Vergleich zu den Verbindungen **GB1-GB4** im Paar **GB6/GB7** stark abgenommen hat. Damit braucht man für die Diskussion der Ergebnisse der Verbindungen **GB1/GB6**, **GB8/GB9** und **GB10/GB11** nur Addition von reaktiven Spezies zu diskutieren. Abstraktionen spielen, wenn überhaupt, hier nur eine untergeordnete Rolle.

In dieser Homologenreihe steigt die Antioxidativität nicht direkt mit der Kettenlänge an. Die Verbindungen **GB8/GB9** fallen heraus. Wäre nur die Kettenlänge entscheidend, dürfte dies nicht der Fall sein. Die Verbindungen **GB8/GB9** sind aber sterisch gehinderter als die anderen in dieser Reihe. Die Additionswahrscheinlichkeit wird also herabgesetzt. Die Verlängerung um jeweils eine Doppelbindung zwischen Endgruppe und dem ersten tertiären Kohlenstoffatom ermöglicht einen neuen Reaktionspfad, welcher das Verhalten der Verbindung im positiven Sinn beeinflusst.

Dieselben Tendenzen zeigen sich beim Vergleich der Verbindung **GB4,GB7** und **GB10**. **GB7** besitzt die sterisch am meisten entlastete Polyenkette und sein antioxidatives Verhalten ist am besten. Verbindung **GB10** ist wirksamer als Verbindung **GB4**, trotz der doppelten Anzahl Methylgruppen, was mit dem verlängerten Polyensystem zusammenhängt.

Für einen umfassenderen Überblick über die Abhängigkeit der antioxidativen Aktivität von der Methylgruppenanzahl und Polyenkettlänge werden die erhaltenen Ergebnisse in einem Diagramm aufgetragen:



**Abbildung 195:** Zusammenhang zwischen Methylgruppenzahl und Peroxidbildung

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß bei den in diesem Kapitel untersuchten Verbindungen gezeigt wurde, daß Methylgruppen als potentielle Abstraktionspositionen oder sterische Barrieren einen negativen Einfluß auf die antioxidativen Eigenschaften von Polyenen haben können. Eine Verlängerung des Polyensystems bewirkt nicht zwangsläufig eine Verbesserung der antioxidativen Eigenschaften. Diese zeigen die Verbindungen **GB8** und **GB9** relativ zu **GB6**. Entscheidend ist, daß bei einer Verlängerung des Polyensystems die Stellung der Methylgruppen auch modifiziert werden muß, um die gewünschte Erhöhung des antioxidativen Potentials zu erreichen.

Die Aktivität der Verbindungen liegt überwiegend unterhalb der von  $\beta$ -Carotin. Wirtschaftlich ist dabei die Verbindung **GB7** interessant, da sie annähernd dieselbe Aktivität wie  $\beta$ -Carotin besitzt, aber synthetisch wesentlich leichter zugänglich ist. Die Verbindungen **GB6**, **GB11** und **GB12** sind aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit wenig interessant für die Verwendung in biologischen Systemen.

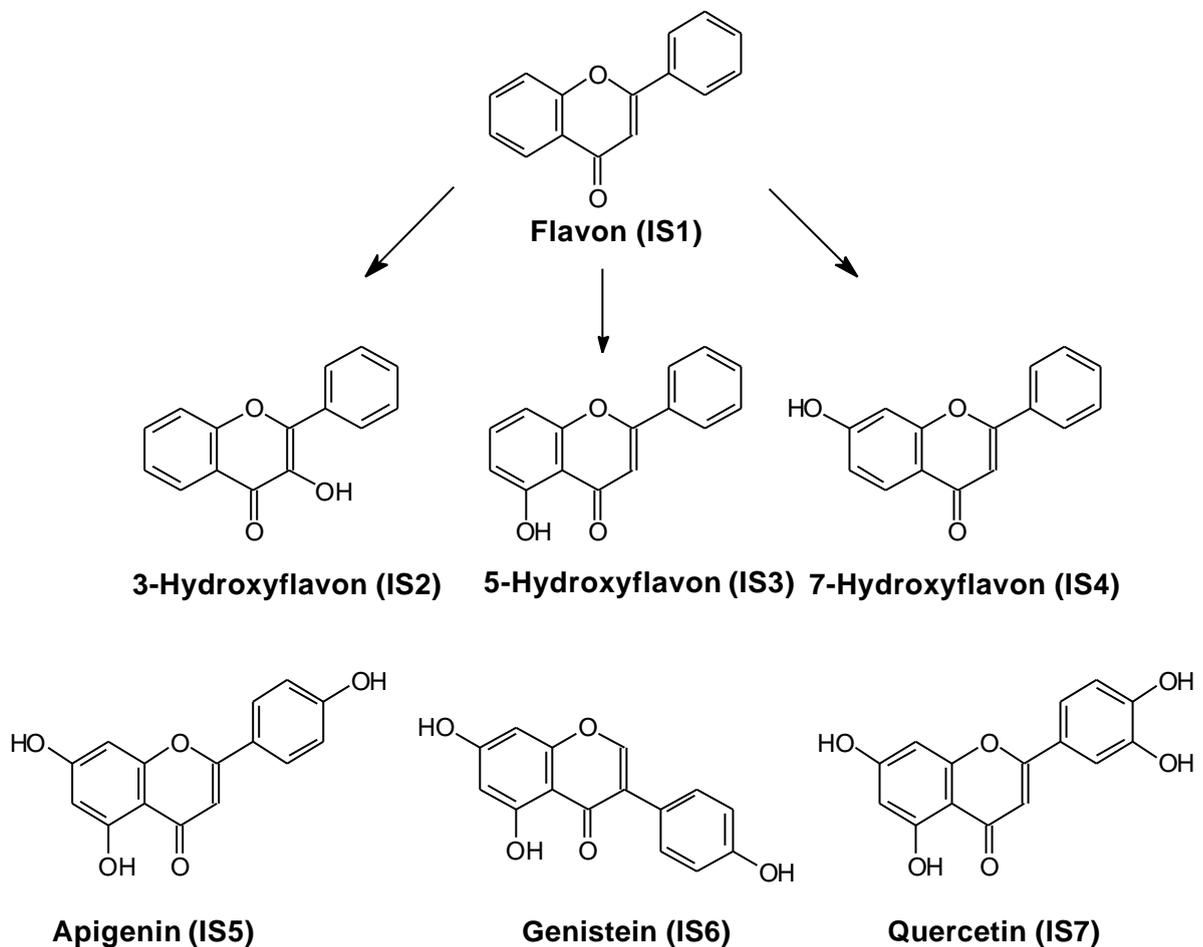
Auf eine Darstellung der Derivatigraphen wird in diesem Kapitel verzichtet, da dort keine besonderen Effekte registriert werden. Keine der untersuchten Substanzen weist krypto-prooxidatives Potential auf. Die Endgeschwindigkeiten nach 5 Stunden liegen alle im Rahmen des Referenzexperimentes.

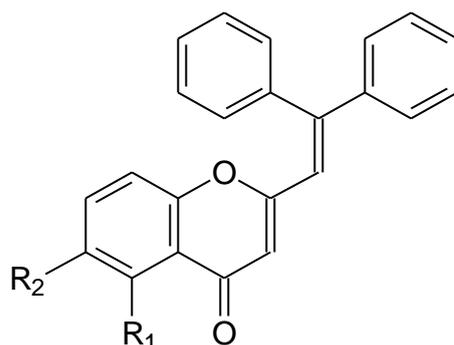
Der Abbau der Reinsubstanzen war nicht eindeutig auswertbar, da die Substanzen mit Lösungsmittel und Starter gleichzeitig unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eluierten.

### 3.6.10 Flavonoide

Das antioxidative Verhalten von Flavonoiden wurde von M. Schmidt und I. Schülke untersucht [77].

Die Reaktionsbedingungen sind identisch mit den übrigen Messungen im Cumolsystem. Zum Vergleich der Aktivität der Flavonoide untereinander wurden die Messungen nur bei einer Konzentration ( $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) an Antioxidans durchgeführt. Die Substanzen selber werden aus Übersichtsgründen in zwei Blöcke eingeteilt. Block 1 enthält den Grundkörper Flavon und drei seiner substituierten Monohydroxyderivate (**IS1-IS4**). Block 2 beinhaltet die Polyhydroxyderivate (**IS5-IS7**) und zwei vinylog verlängerte Flavonoide mit geminalen Phenylgruppen (**IS8-IS9**).



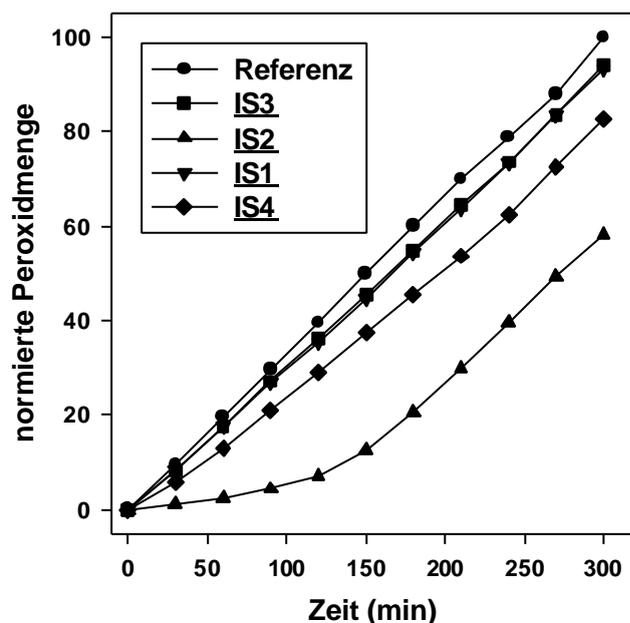


**R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H: 5-Hydroxy-b -phenylvinylflavon (IS8)**

**R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= OH: 6-Hydroxy-b -phenylvinylflavon (IS9)**

**Abbildung 196:** Untersuchte Flavonoide (**IS1-IS9**)

Die in Block 1 untersuchten Flavonoide zeigen alle antioxidative Eigenschaften. Die Antioxidativität liegt aber deutlich unterhalb der von Lycopin, welches in den Experimenten mit Cumol das schlechteste Antioxidans war. Zur Quantifizierung dieser Aussage wird hier auch wieder die relative Peroxidmenge nach 5 Stunden herangezogen. Dabei wird die gebildete Peroxidmenge ohne Zugabe von Antioxidans auf 100% normiert. Alle übrigen Meßwerte werden relativ zu diesem Wert gesetzt:



**Abbildung 197:** Meßgraphen der Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von **IS1-IS4**

Referenz : 100.0%

**IS1:** 93.1%

**IS2:** 58.2%

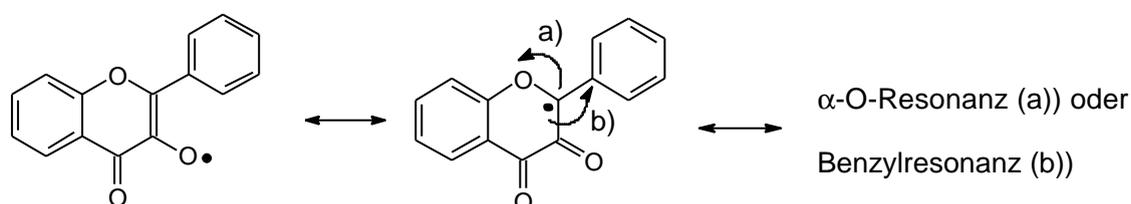
**IS3:** 94.0%

**IS4:** 82.7%

(Lycopin **109:** 42.4%)

Das Ergebnis für **IS1** entspricht den Erwartungen. Da dieses Molekül keine Hydroxygruppen besitzt, welche die Oxidation erleichtern, ist **IS1** ein sehr schlechtes Antioxidans. Die Einführung einer Hydroxygruppe in die 5-Position von **IS1** (**IS3**) ändert die antioxidativen Eigenschaften im Rahmen des systematischen Fehlers nicht. Auch die Einführung einer Hydroxygruppe in 7-Position (**IS4**) führt nur zu einer geringfügigen Verbesserung des antioxidativen Verhaltens. Markant ist dabei, daß sowohl bei **IS3**, als auch bei **IS4** die eingeführten Hydroxygruppen in meta-Position zum Sauerstoffatom des Chromenringes liegen. Betrachtet man die hydroxylierten Chromane als einseitig geschützte Hydrochinone, so ist die schlechte Wirksamkeit einsichtig. Zuerst einmal ist die Oxidation eines partiell geschützten Hydrochinons a priori erschwert, zweitens können durch die meta-Position der Hydroxygruppen keine chinoiden Systeme entstehen.

Für die relativ guten Eigenschaften von **IS2** innerhalb von Block 1 gibt es eine mögliche Erklärung: Die reaktivste Position des Moleküls ist die Hydroxygruppe. Abstrahiert man an dieser Position von **IS2** ein Wasserstoffatom, so kann man folgende Grenzformel formulieren:

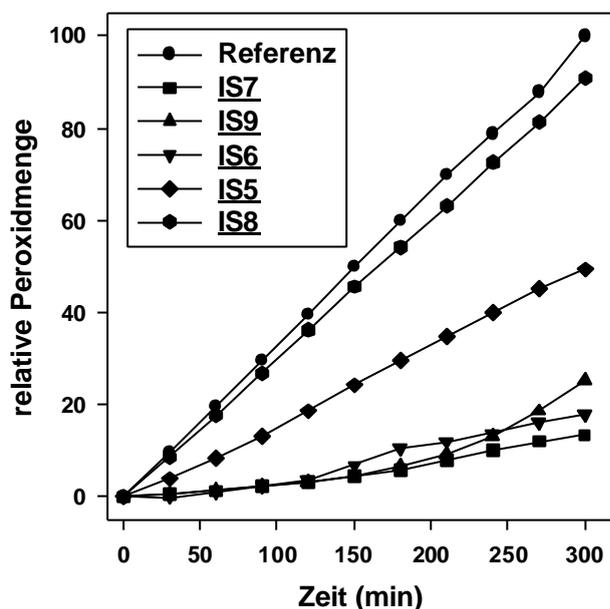


**Abbildung 198:** Resonanzstabilisierungsmöglichkeiten des **IS2**-Radikals

Das entstehende Radikal besitzt hervorragende Möglichkeiten zu einer  $\alpha$ -O- oder Benzylresonanz. Damit ist es sehr gut stabilisiert. Bei den Verbindungen **IS3** und **IS4** ist diese Möglichkeit nicht gegeben. Zwar können Phenolradikale vom Alkoxityp entstehen, aber deren Stabilisierungsmöglichkeiten sind relativ zu **IS2** begrenzt.

Da keine Graphen für den Abbau der Flavonoide aufgenommen werden konnten, kann man keine eindeutigen Aussagen über den Kurvenverlauf der Messung von **IS2** vornehmen. Der Verlauf läßt aber tendenziell darauf schließen, daß **IS2** langsamer abgebaut wird als die übrigen Verbindungen und somit länger aktiv ist.

Die Flavonoide aus Block 2 zeigen folgende Ergebnisse:



**Abbildung 199:** Meßgraphen der Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von **IS5-IS9**

Referenz : 100.0%

**IS5:** 49.3%

**IS6:** 18.0%

**IS7:** 13.5%

**IS8:** 90.9%

**IS9:** 25.3%

Die Verbindungen **IS6**, **IS7** und **IS9** sind mit Abstand die wirksamsten Flavonoide, welche im Cumolsystem untersucht wurden. Die Aktivität von **IS9** liegt im Rahmen des experimentellen Fehlers im Bereich von Astaxanthin und  $\alpha$ -Tocopherol. **IS7** und **IS6** zeigen noch höhere Aktivitäten, welche nur von BHT-CAR übertroffen werden.

Die Ergebnisse für **IS5** sind mit Vorsicht zu betrachten, da diese Verbindung aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit statt in reinem Chlorbenzol in einem Gemisch aus Chlorbenzol und Isopropanol (80:20) vermessen wurde. Die gute Oxidierbarkeit des Isopropanols kann auch ein Abfangen von Sauerstoffradikalen bewirken, so daß dadurch die Menge des gebildeten Cumolhydroperoxides durch einen alternativen Reaktionspfad abgesenkt wird.

**IS8** ist ein sehr schlechtes Antioxidans. Seine Aktivität ist nur geringfügig besser als die von **IS1** und **IS3**. Damit wäre gezeigt, daß die vinyloge Verlängerung des  $\pi$ -Systems in der 2-Position keinen nennenswerten Einfluß auf den antioxidativen Effekt ausübt. Die Verbindung **IS9** dagegen, welche sich nur durch die Stellung der Hydroxygruppe von **IS8** unterscheidet hat dagegen eine bemerkenswert hohe Aktivität. In **IS9** steht die freie Hydroxygruppe in para-Stellung zum Sauerstoffatom des Chromenringes. Dies gibt

dem Molekül die Möglichkeit bei einer Oxidation in eine chinoides System überzugehen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den großen Aktivitätsunterschied zwischen **IS8** und **IS9**.

**IS9** ist erst nach Reaktionszeiten von über 240 Minuten ein schlechteres Antioxidans als **IS6**. Dies liefert einen Hinweis darauf, daß die Abbauprodukte von **IS6** eine stärkere antioxidative Wirksamkeit besitzen als die von **IS9**. Der Anstieg in der Steigung des Meßgraphens von **IS9** läßt darauf schließen, daß der Großteil des antioxidativen Potentials dieser Verbindung nach 240 Minuten verbraucht ist.

**IS6** setzt die Ergebnisse von Block 1 für **IS2** fort. Wieder zeigt sich, daß eine Substitution in 3-Position die Antioxidativität eines Flavonoids entscheidend verbessern kann. Im Falle von **IS6** befindet sich zwischen der Hydroxygruppe und dem Chromenring noch eine Benzolring. Dieser steigert die antioxidative Wirksamkeit von **IS6** relativ zu **IS2** um ca. den Faktor 2. Dies dürfte durch die erhöhte Radikalstabilisierungsmöglichkeit des aromatischen Ringes erklärbar sein. Damit erhärtet sich die aufgestellte These, daß die antioxidativen Eigenschaften mit der Position und Reaktivität von eingeführten Hydroxygruppen zusammenhängt.

**IS7** besitzt von alle untersuchten Flavonoiden die höchste antioxidative Aktivität. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die ortho-Hydrochinon-Struktur dieser Verbindung. **IS7** ist sehr leicht oxidierbar und kann deswegen konkurrierende Oxidationsreaktionen sehr gut unterdrücken.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß eine Erhöhung der Zahl der Hydroxygruppen die Antioxidativität eines Flavonoids erhöht. Einführung dieser Gruppen in 6-, und 3-Position steigert die Aktivität noch einmal im besonderen Maße. Substitutionen in 5- und 7-Position haben keine oder nur minimale Auswirkungen auf die Antioxidativität. Zusätzlich sieht man, daß para-substituierte Hydroxygruppen am Benzolring in der 2-Position sich ebenfalls positiv auf die Antioxidativität auswirken.

### **3.7. Globale Diskussion der Messergebnisse**

#### **3.7.1. Allgemeines**

In diesem Kapitel werden die bereits ansatzweise diskutierten Ergebnisse miteinander verglichen und Zusammenhänge zwischen Struktur und Reaktivität der einzelnen Substanzen bezüglich deren antioxidativer Wirkung aufgezeigt. Die mit den Meßverfahren verfügbaren Daten (Inhibition der Peroxidbildung, Geschwindigkeit der Reaktion und Abbauraten der Antioxidantien) werden in getrennten Unterkapiteln besprochen.

Für den Vergleich der Aktivitäten wird nach S. Beutner et al. [78] ein Schutzfaktor  $SF_{300}$  eingeführt. Dieser Wert repräsentiert die protektive Wirkung der untersuchten Antioxidantien nach 300 Minuten Reaktionszeit und berechnet sich nach der Formel:

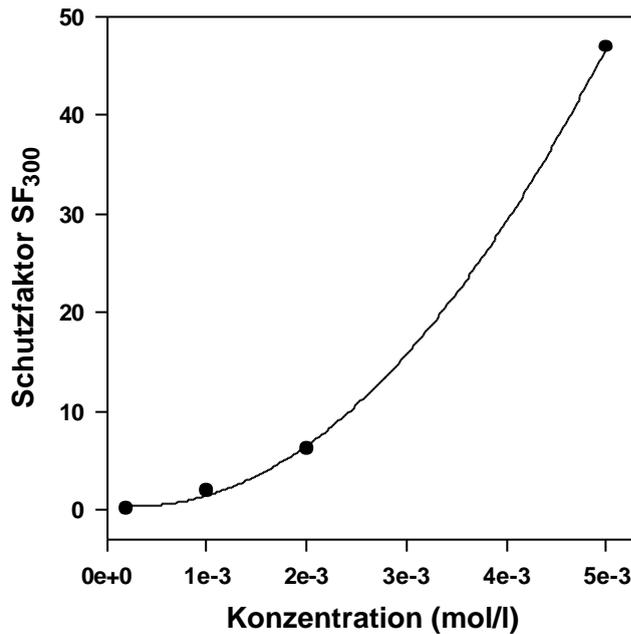
$$SF_{300} = \left( \frac{\text{Menge Peroxid ohne Inhibitor nach 5 Stunden}}{\text{Menge Peroxid mit Inhibitor nach 5 Stunden}} \right) - 1$$

**Gleichung 2:** Berechnung des Schutzfaktors  $SF_{300}$

Für die Messungen mit Methylinoleat werden die Werte in %Peroxid eingesetzt. Da für das Cumolsystem kein Eichfaktor zur Umrechnung von Area% im Chromatogramm in %Peroxid ermittelt wurde, werden dort die Flächenprozentage des Chromatogramms für die Ermittlung des Schutzwertes verwendet. Da der Schutzwert ein relativer Wert ist, kann man diese Auswertung benutzen.

Da beide Meßsysteme zusätzlich zu den verschiedenen Substraten auch noch unterschiedliche Relativkonzentrationen bezüglich Starter, Substrat und Antioxidans verwenden, ist ein direkter Vergleich der Schutzwerte nicht möglich. Zur Überprüfung dieser These werden die Schutzfaktoren für  $\beta$ -Carotin gegen die Konzentrationen aufgetragen. Da in der Meßkurve nur vier Punkte zur Verfügung stehen, ist es schwer, einen exakten mathematischen Zusammenhang zwischen Konzentration und Schutzfaktor zu ermitteln. Die Krümmung zeigt aber eindeutig, daß der Zusammenhang nicht linear ist. Deswegen wird die Kurven mit einer Funktion zweiter Ordnung angefitet, wobei sich eine sehr gute Korrelation ergibt. Anschließend wird aus der

erhaltenen Funktion für  $\beta$ -Carotin die Konzentration bestimmt, welche mit dem im Methyllinoleatsystem erhaltenen Schutzfaktor 1.8 (s.3.7.2) korreliert. Dieselbe Rechnung wird anschließend für Astaxanthin durchgeführt. Dort wird dann der Schutzfaktor bei der Konzentration bestimmt, wo  $\beta$ -Carotin in beiden Systemen dieselbe Wirksamkeit zeigte (1.1m).



**Abbildung 200:** Graphischer Zusammenhang zwischen der  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Meßsystem und dem Schutzfaktor SF<sub>300</sub> im Cumolsystem

Vorgreifend auf die Ergebnisse von Kapitel 3.7.2. und 3.7.3 werden hier die Schutzfaktoren für  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin in den beiden Systemen verglichen. Die Ergebnisse sind folgende:

Substrat	$\beta$ -Carotin	Astaxanthin
Methyllinoleat	1.7 (0.77mM)	9.1 (0.77mM)
Cumol	1.7 (1.1mM)	3.0 (1.1 mM)

**Tabelle 6:** Schutzfaktoren von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin in den verwendeten Meßsystemen (In den Klammern sind die entsprechenden Konzentrationen angegeben)

Daraus ergibt sich, daß im Cumolsystem die relative Schutzwirkung des Astaxanthin geringer ist als im Methyllinoleatsystem. Dies steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen, da:

- a) in den Systemen unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse vorliegen
- b) die zum Vergleich verwendete Meßgröße willkürlich festgelegt wurde.

In beiden Systemen sind die Induktionsperioden verschieden lang. Diese sind substanzspezifisch und haben somit keinen Einfluß auf die relative Reihenfolge der Aktivitäten. Die Mengen des gebildeten Peroxides sind aber in beiden Verfahren unterschiedlich hoch. Bei den höchsten Verwendeten Konzentrationen ist es z.B. nicht möglich, die Aktivitäten einiger Verbindungen nach 5 Stunden zu unterscheiden, da an diesem Zeitpunkt die Peroxidation, bedingt durch die hohe Antioxidanzkonzentration, noch nicht eingesetzt hat. Unter diesen Bedingungen ist ein Vergleich der entsprechenden Verbindungen erst nach längeren Meßzeiten möglich. Man kann also die Schutzfaktoren in beiden Systemen nicht direkt miteinander vergleichen. Beide Verfahren sind mit Vor- und Nachteilen behaftet, aber trotzdem grundsätzlich zur Charakterisierung und quantitativen Einordnung von Antioxidantien jeglicher Art einsetzbar.

Die Verwendung des Schutzfaktors kann aber auch zu Verzerrungen in den Ergebnissen führen. Dazu wird folgende Beispielrechnung durchgeführt: Eine Verbindung A senkt die Peroxidbildung um 99%, eine andere Verbindung B um 99,5 %. Die entsprechenden Schutzfaktoren  $SF_{300}$  wären 99 bzw. 199. Betrachtet man die rohen Zahlenwerte, so würde man annehmen, daß B ein Verbindung A um Größenordnungen überlegenes Antioxidans ist. Tatsächlich sind beide Verbindungen hervorragende Antioxidantien. Ihre Aktivitäten liegen im selben Bereich. Man kann den Schutzfaktor zur Skalierung der Ergebnisse verwenden, muß dabei aber immer berücksichtigen, daß dessen reziproke Natur bei sehr guten Antioxidantien zu möglichen Überschätzungen von deren Wirksamkeit führt.

Deswegen wird eine weitere Größe, der Unterdrückungsfaktor  $UF_{300}$ , eingeführt. Dieser repräsentiert die prozentuale Menge Peroxid, welche weniger als im auf 100% normierten Referenzexperiment gebildet wird:

$UF_{300} = 100 - \% \text{ Peroxid in Gegenwart von Antioxidans (normiert auf das Referenzexperiment)}$

**Gleichung 3:** Berechnung des Unterdrückungsfaktors  $UF_{300}$

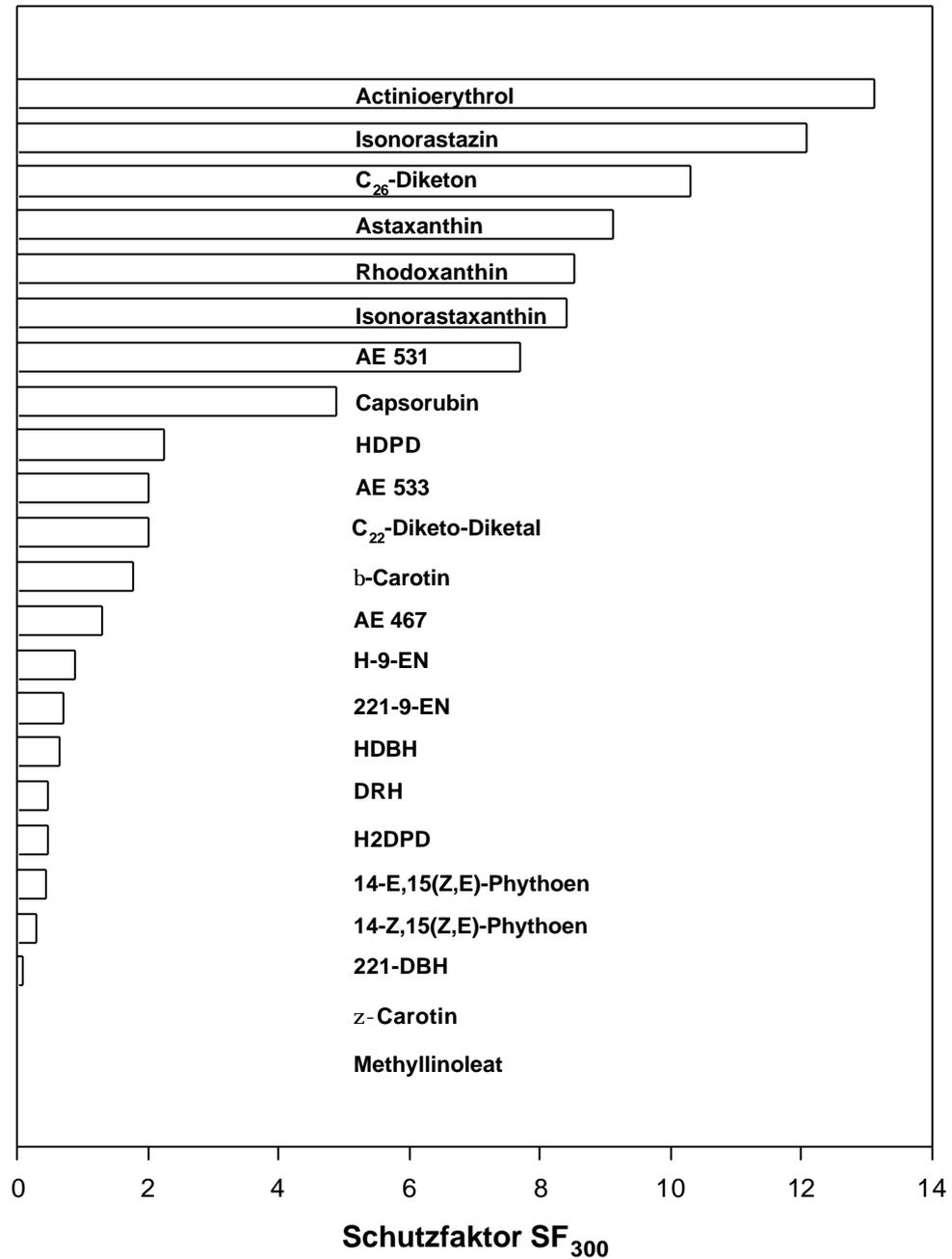
### 3.7.2. Methyllinoleat

Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse des Methyllinoleatsystems, geordnet nach steigender Aktivität an. Substanzen, die innerhalb des zufälligen Fehlers nicht unterscheidbar sind, werden in der vierten Spalte gekennzeichnet:

Nr.	Substanz	% Peroxid nach 5h	absoluter Fehler	nicht eindeutig unterscheidbar von
1	Methyllinoleat	7.96	0.30	2
2	ζ-Carotin <b>101</b>	7.94	0.36	1
3	221-DBH <b>113</b>	7.32	0.15	-
4	13-Z-P <b>103</b>	6.15	0.39	-
5	13-E-P <b>102</b>	5.49	0.15	6
6	221DPD <b>115</b>	5.45	0.02	5
7	DRH <b>118</b>	5.40	0.06	5,6
8	HDBH <b>112</b>	4.82	0.20	9
9	221-9-EN <b>117</b>	4.69	0.20	8
10	H-9-EN <b>116</b>	4.24	0.06	-
11	AE467 <b>110</b>	3.47	0.08	-
12	β-Carotin <b>1</b>	2.88	0.12	-
13	C <sub>22</sub> -Diketo-Diketal <b>107</b>	2.66	0.06	14
14	AE533 <b>108</b>	2.64	0.11	13,15
15	HDPD <b>114</b>	2.44	0.10	14
16	Capsorubin <b>95</b>	1.35	0.08	-
17	AE531 <b>109</b>	0.92	0.03	-
18	Isonorastaxanthin <b>105</b>	0.84	0.03	19
19	Rhodoxanthin <b>104</b>	0.84	0.08	17, 18 ,20
20	Astaxanthin <b>4</b>	0.79	0.04	18, 19
21	C <sub>26</sub> -Diketon <b>96</b>	0.70	0.01	-
22	Isonorastazin <b>106</b>	0.61	0.01	-
23	Actinioerythrol <b>111</b>	0.56	0.01	-
24	D-L-α-Tocopherol <b>30</b>	0.18	0.01	-

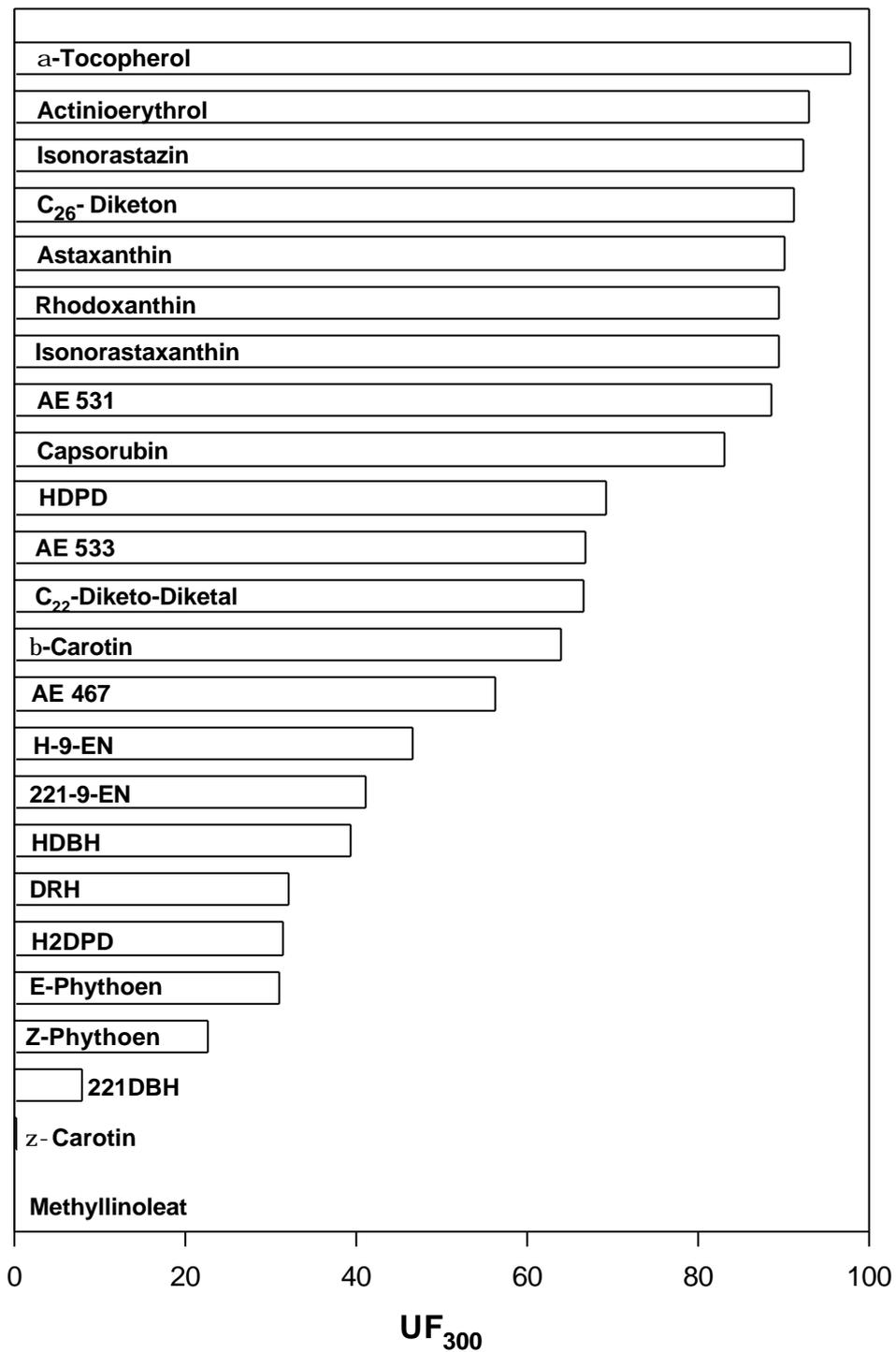
**Tabelle 7:** Gebildete Peroxidmengen im Methyllinoleatsystem

Die ermittelten Schutzfaktoren für die untersuchten Verbindungen sind folgende:



**Abbildung 201:** Schutzfaktoren im Methylinoleatsystem (ohne  $\alpha$ -Tocopherol, SF<sub>300</sub> = 42.3)

Die Unterdrückungsfaktoren  $UF_{300}$  betragen:



**Abbildung 202:** Unterdrückungsfaktoren  $UF_{300}$  im Methyllinoleatsystem

**3.7.3. Cumol****a1) generelle Messungen:**

Substanz	RAK 2*10e-4M	RAK 1*10e-3M	RAK 2*10e-3M
$\beta$ -Carotin <b>1</b>	82.5 $\pm$ 1.9	33.2 $\pm$ 1.1	13.8 $\pm$ 0.1
Lycopin <b>119</b>	88.9 $\pm$ 0.1	42.4 $\pm$ 2.0	16.0 $\pm$ 0.2
Astaxanthin <b>4</b>	72.2 $\pm$ 2.1	26.4 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 0.3
C <sub>26</sub> -Diketon <b>96</b>	-----	24.7 $\pm$ 1.0	-----
C <sub>32</sub> -Diketon <b>97</b>	-----	26.7 $\pm$ 1.5	-----
BHT <b>6</b>	82.7 $\pm$ 0.9	37.2 $\pm$ 2.3	1.4 $\pm$ 0.2 53.3 $\pm$ 3 <sup>a)</sup>
$\alpha$ -Tocopherol <b>30</b>	92.9 $\pm$ 0.1	25.2 $\pm$ 0.3	-2.7 $\pm$ 0.2 37.1 $\pm$ 0.2 <sup>a)</sup>
BHT-CAR <b>59</b>	55.3 $\pm$ 1.3	4.1 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2 19.0 $\pm$ 0.5 <sup>a)</sup>

**Tabelle 8:** Ergebnisse für das Cumolsystem nach 300min Reaktionszeit, normiert auf die Reaktion ohne Antioxidanzugabe = 100 (RAK= relative Antioxidanzkonzentration, <sup>a)</sup> Reaktionszeit = 570 min)

Im Rahmen des zufälligen Fehlers sind folgende Verbindungen bei manchen Konzentrationen nicht unterscheidbar: 1)  $\beta$ -Carotin/BHT (2\*10e-4M); 2) Astaxanthin, C<sub>26</sub>-Diketon, C<sub>32</sub>-Diketon,  $\alpha$ -Tocopherol (1\*10e-3M)

**a2) spezielle Messungen, die nur bei einzelnen Substanzen durchgeführt wurden:**

Substanz	RAK 5*10e-3M	RAK 5*10e-4M (760 torr)	RAK 2*10e-3M (760 torr)
$\beta$ -Carotin <b>1</b>	2.0 $\pm$ 0.4	-----	-----
Astaxanthin <b>4</b>	-----	57.0 $\pm$ 2.3 <sup>a)</sup> 62.7 $\pm$ 2.5 <sup>b)</sup>	7.0 $\pm$ 0.3 <sup>a)</sup> 7.6 $\pm$ 0.3 <sup>b)</sup>

**Tabelle 9:** Ergebnisse für das Cumolsystem nach 300min Reaktionszeit, normiert auf die Reaktion ohne Antioxidanzugabe = 100 (RAK= relative Antioxidanzkonzentration,

a) normiert auf das Ergebnis des Referenzexperimentes bei 760 torr, b) normiert auf das Ergebnis des Referenzexperimentes bei 150 torr)

**b1) Schutzfaktoren SF<sub>300</sub>:**

Substanz	RAK 2*10e-4M	RAK 1*10e-3M	RAK 2*10e-3M
$\beta$ -Carotin <u>1</u>	0.21	2.14	6.25
Lycopin <u>119</u>	0.13	1.36	5.25
Astaxanthin <u>4</u>	0.39	2.79	13.29
C <sub>26</sub> -Diketon <u>96</u>	-----	3.05	-----
C <sub>32</sub> -Diketon <u>97</u>	-----	2.75	-----
BHT <u>6</u>	0.21	1.69	70.43 0.88 <sup>a)</sup>
$\alpha$ -Tocopherol <u>30</u>	0.08	2.97	<sup>b)</sup> 1.69 <sup>a)</sup>
BHT-CAR <u>59</u>	0.81	23.39	33.48 4.26 <sup>a)</sup>

**Tabelle 10:** Schutzwerte SF<sub>300</sub> im Cumolsystem nach 300min Reaktionszeit, normiert auf die Reaktion ohne Antioxidanzugabe = 100 (RAK= relative Antioxidanzkonzentration, <sup>a)</sup> Reaktionszeit = 570 min; <sup>b)</sup> die reduktive Wirkung des  $\alpha$ -Tocopherols bewirkt, daß die im Reaktionssystem a priori vorhandenen Peroxide reduziert werden. Deswegen erhält man einen negativen Meßwert für die Peroxidbildung. Die Errechnung des Schutzfaktors aus einem negativen Wert macht aber keinen Sinn und wird deswegen nicht durchgeführt.)

**b2) Schutzfaktoren SF<sub>300</sub> bei den speziellen Messungen :**

Substanz	RAK 5*10e-3M	RAK 5*10e-4M (760 torr)	RAK 2*10e-3M (760 torr)
$\beta$ -Carotin <u>1</u>	49 ± 0.4	-----	-----
Astaxanthin <u>4</u>	-----	0.75 <sup>a)</sup> 0.59 <sup>b)</sup>	13.29 <sup>a)</sup> 12.16 <sup>b)</sup>

**Tabelle 11:** Schutzfaktoren SF<sub>300</sub> im Cumolsystem nach 300min Reaktionszeit, normiert auf die Reaktion ohne Antioxidanzugabe = 100 (RAK= relative

Antioxidanskonzentration, <sup>a)</sup>normiert auf das Ergebnis des Referenzexperimentes bei 760 torr, <sup>b)</sup>normiert auf das Ergebnis des Referenzexperimentes bei 150 torr)

**c1) Unterdrückungsfaktoren UF<sub>300</sub>:**

Substanz	RAK 2*10e-4M	RAK 1*10e-3M	RAK 2*10e-3M
$\beta$ -Carotin <b>1</b>	17.5	66.8	86.2
Lycopin <b>119</b>	11.1	57.6	84.0
Astaxanthin <b>4</b>	27.3	73.6	93.3
C <sub>26</sub> -Diketon <b>96</b>	-----	75.3	-----
C <sub>32</sub> -Diketon <b>97</b>	-----	73.3	-----
BHT <b>6</b>	17.3	62.8	98.6 46.5 <sup>a)</sup>
$\alpha$ -Tocopherol <b>30</b>	7.1	74.8	102.7 <sup>b)</sup> 62.9 <sup>a)</sup>
BHT-CAR <b>59</b>	44.7	95.9	97.1 81.0 <sup>a)</sup>

**Tabelle 12:** Unterdrückungsfaktoren UF<sub>300</sub> im Cumolsystem nach 300 min Reaktionszeit, normiert auf die Reaktion ohne Antioxidanszugabe = 100 (RAK= relative Antioxidanskonzentration, <sup>a)</sup> Reaktionszeit = 570 min; <sup>b)</sup> die reduktive Wirkung des  $\alpha$ -Tocopherols bewirkt, daß die im Reaktionssystem a priori vorhandenen Peroxide reduziert werden. Deswegen erhält man einen Unterdrückungsfaktor, der größer als 100% ist.)

**c2) Unterdrückungsfaktoren UF<sub>300</sub> bei den speziellen Messungen:**

Substanz	RAK 5*10e-3M	RAK 5*10e-4M (760 torr)	RAK 2*10e-3M (760 torr)
$\beta$ -Carotin <b>1</b>	49 ± 0.4	-----	-----
Astaxanthin <b>4</b>	-----	0.75 <sup>a)</sup> 0.59 <sup>b)</sup>	13.29 <sup>a)</sup> 12.16 <sup>b)</sup>

**Tabelle 13:** Schutzwerte SF<sub>300</sub> im Cumolsystem nach 300min Reaktionszeit, normiert auf die Reaktion ohne Antioxidanszugabe = 100 (RAK= relative Antioxidanskonzentration, <sup>a)</sup>normiert auf das Ergebnis des Referenzexperimentes bei 760 torr, <sup>b)</sup>normiert auf das Ergebnis des Referenzexperimentes bei 150 torr)

### **3.7.4. Prooxidativität**

Es gibt prinzipiell zwei große Definitionen von Prooxidativität:

- a) Prooxidativität liegt vor, wenn die Geschwindigkeit einer Oxidation durch Zugabe einer Substanz (Prooxidans) höher ist, als ohne Zugabe dieser Substanz. [79]
- b) Prooxidativität liegt vor, wenn die Erhöhung der Zugabemenge eines Antioxidans die Reaktion nicht weiter unterdrückt, sondern die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. [Bei dieser Definition wäre es besser statt von Prooxidativität von konzentrationsbedingter, reduzierter Antioxidativität zu sprechen.]

Zusätzlich hierzu wurde in dieser Arbeit der Begriff der „Krypto-Prooxidativität“ geprägt (S. 82): Krypto-Prooxidativität ist bedingt durch das Einwirken eines Antioxidans in den Mechanismus. Die Wirkungsweise dieser Substanz, bzw. von deren Abbauprodukten, zeigt zunächst einen antioxidativen Effekt auf das beobachtete System. Geht man von einem Experiment aus, in dem die Zugabe einer Substanz die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber einem Experiment ohne Zugabe dieser Substanz absenkt, so steigt bei einer „krypto-prooxidativen Substanz“ die Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf stärker an, als ohne Zugabe dieser Substanz. Es liegt also ein System vor, in dem die zugegebene Substanz (bzw. deren Abbauprodukte) sowohl antioxidative, als auch prooxidative Eigenschaften aufzeigt. Die Aussage über prooxidatives bzw. antioxidatives Verhalten hängt in diesen Systemen von Beobachtungszeitpunkt ab.

#### **3.7.4.1. Kritische Diskussion von Burton und Ingold**

Die schon mehrfach zitierte Publikation von Burton und Ingold [7], in welcher über die antioxidativen Eigenschaften des  $\beta$ -Carotins und dessen prooxidative Eigenschaften bei hohen Drücken und  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen berichtet wurde, ist über die Jahre zu einem Dogma in der Antioxidansforschung geworden. Unterstützung zu diesen Thesen lieferten die CARET und ATBC Studien. (S. 5)

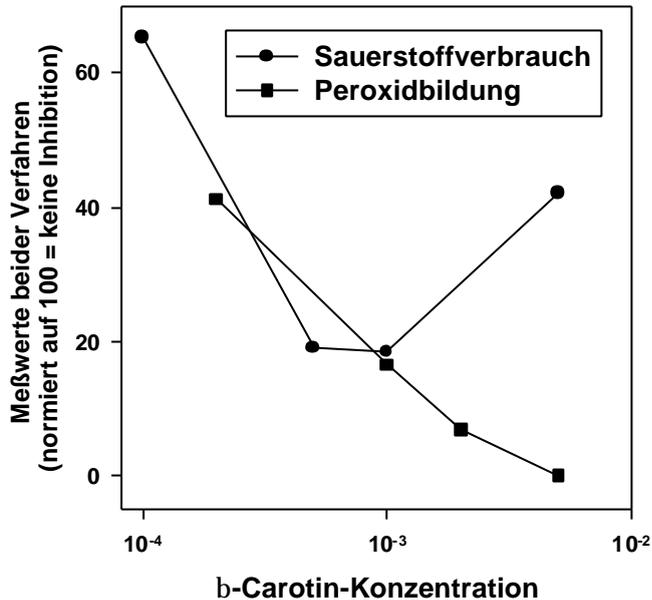
Seitdem wird versucht das vermeintlich schädliche Verhalten von  $\beta$ -Carotin zu erklären und quantifizieren. Vollständig zufriedenstellende Ergebnisse sind bis heute nicht verfügbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die von Burton und Ingold gefundenen Effekte auf einer verfahrensbedingten Fehlinterpretation der Meßergebnisse beruhen: In dem oben erwähnten Verfahren wird nur der Verbrauch des Sauerstoffs während der Reaktion betrachtet. Abb. 4 auf Seite 5 zeigt, daß die Sauerstoffaufnahme mit Erhöhung der Carotinoidkonzentration zunächst abfällt. Dies ist logisch, da die erhöhte Zugabe von einem Antioxidans die Reaktion mit Sauerstoff stoppen soll. Damit ist die verminderte Sauerstoffaufnahme verbunden. Erhöht man die Konzentration weiter, so steigt die Sauerstoffaufnahme wieder an. Dieser Effekt tritt verstärkt beim Lycopin und  $\beta$ -Carotin auf [11], wird aber bei den Ketocarotinoiden nicht beobachtet. Dort sinkt die Sauerstoffaufnahme mit Erhöhung der Konzentration immer weiter.

Aber auch beim  $\beta$ -Carotin kann man nicht von Prooxidativität im Sinne der Definition a) sprechen. Die Sauerstoffaufnahme bei  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$   $\beta$ -Carotin und 150 torr ist zwar höher als bei  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$   $\beta$ -Carotin, aber immer noch deutlich unterhalb der Sauerstoffaufnahme in einem Experiment ohne Zugabe von  $\beta$ -Carotin. Es handelt sich also um reduzierte Antioxidativität. Damit wäre es nicht einsichtig, von einer schädlichen Wirkung von  $\beta$ -Carotin zu sprechen, da die Antioxidativität immer noch vorhanden ist. Das Druckmeßverfahren von Burton und Ingold berücksichtigt nur die Sauerstoffaufnahme, die Oxidation des Substrates kann mit dem gegebenen Verfahren nicht untersucht werden. Dies ist aber die entscheidende Meßgröße zur Einordnung von prooxidativen und antioxidativen Effekten.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren der Peroxidbestimmung mittels HPLC kann diese Lücke füllen. Man erhält die Daten, welche dem Verfahren von Burton und Ingold verschlossen bleiben. Zwar wird mit einem anderen Substrat (Cumol) statt mit Methylolinoleat gearbeitet und die Temperatur ist etwas höher ( $37^\circ\text{C}$  statt  $30^\circ\text{C}$ ), aber dies ändert nichts an dem Ergebnis, daß man bei  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$   $\beta$ -Carotin beobachtet. Dies wurde von C. Ruck [11] gezeigt.

Der folgende Graph zeigt in einem Diagramm die Ergebnisse beider Meßverfahren. Die Peroxidbildung ohne Zugabe von Antioxidans wurde auf 100% normiert und die Meßwerte für die Temperatur  $37^\circ\text{C}$  entsprechend auf eine Reaktionstemperatur von  $30^\circ\text{C}$ , gemäß  $k = k_0 \cdot e^{(E/RT)}$ , heruntergerechnet. Hier sieht man deutlich die Fehlinterpretation von Burton und Ingold:



**Abbildung 203:** Vergleich der Messungen von Burton und Ingold mit den Ergebnissen dieser Arbeit

Bei der Konzentration  $1 \cdot 10^{-4}$  M  $\beta$ -Carotin wurde keine Messung der Peroxidbildung durchgeführt, da die zeitliche Auflösung des Meßverfahrens dazu nicht geeignet ist.

Bei der obigen Abbildung muß man beachten, daß die zur Unterscheidung der Substanzen benutzte Meßgröße auf der willkürlichen Festlegung der Menge des gebildeten Peroxides nach 5 Stunden beruht. Man sieht im Graphen eine gute Übereinstimmung der Meßwerte beider Verfahren bei den Konzentrationen  $2 \cdot 10^{-4}$  M und  $1 \cdot 10^{-3}$  M, was zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme mit der Bildung des Peroxides bei diesen Konzentrationen in guter Näherung gekoppelt ist. Dies kann aber auch nur zufällig durch die Normierung der Meßwerte bedingt sein. Der tatsächliche Zusammenhang zwischen Sauerstoffverbrauch und Peroxidbildung kann zu einer Verschiebung der Meßwerte entlang der Abszisse führen. Dies würde aber nicht die Aussagekraft der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ändern: Bei höheren Konzentrationen von  $\beta$ -Carotin wird die Peroxidbildung weiter zurückgedrängt, während die Sauerstoffaufnahme ansteigt. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß bei hohen Konzentrationen der Abbau des  $\beta$ -Carotins überproportional viel Sauerstoff verbraucht. Der Abbau des Substrates ist aber nicht betroffen.

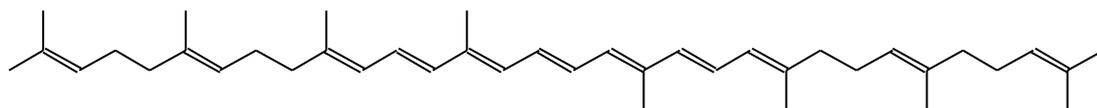
Der Verbrauch des Sauerstoffs während des Abbaus von  $\beta$ -Carotin liegt bei ca. 7 mol Sauerstoff pro mol  $\beta$ -Carotin [54]. Auch zeigten die Ergebnisse für den Abbau  $\beta$ -

Carotin im Methyllinoleatsystem, daß die Abbaureaktion einer Kinetik höherer Ordnung gehorchen muß. Dies ist typisch für eine Kettenreaktion mit Verzweigung. Die Erhöhung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration erhöht die statistische Wahrscheinlichkeit dieser Verzweigungsreaktion und damit die Zahl der möglichen Produkte mit Sauerstoff. So ist es nicht verwunderlich, daß die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs stark ansteigt. Der Abbau des  $\beta$ -Carotin in viele kleine sauerstofftragende Fragmente wurde bereits von Mordt ausführlich untersucht [54].

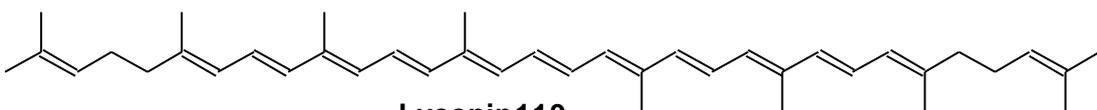
Astaxanthin ist eine Substanz, die bei höheren Konzentrationen keine überproportionale Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs aufweist. [11]. Neuere Ergebnisse von Sell [80] zeigen, daß die Reaktion des Sauerstoffs mit Astaxanthin viel geordneter abläuft als beim  $\beta$ -Carotin. Die Produktverteilung ist dort wesentlich selektiver.

### **3.7.4.2. „Krypto-Prooxidative“ Substanzen**

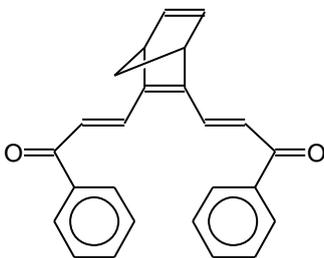
Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die antioxidativen Eigenschaften von 38 Substanzen bestimmt. Dabei wurden bei fünf Substanzen „krypto-prooxidative“ Effekte beobachtet:



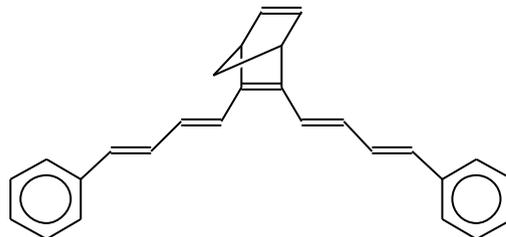
**z-Carotin (Tetrahydrolycopin) 101**



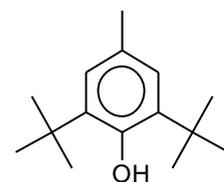
**Lycopin 119**



**221-DBH 113**



**221-DPD 115**

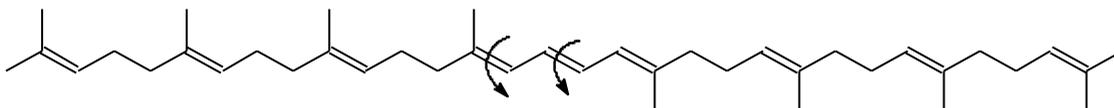


**BHT 6**

**Abbildung 204:** Polyene mit „krypto-prooxidativen“ Eigenschaften

Man sieht direkt, daß die strukturellen Unterschiede der Substanzen einen direkten Vergleich unmöglich machen. Deswegen werden zunächst die Lycopinderivate eingehender untersucht:

Neben den zwei krypto-prooxidativen Derivaten wurden zwei weitere Lycopinderivate untersucht, welche dieses Verhalten nicht zeigen:



**Abbildung 205:** 13-E,15(Z,E)-Phythoen **102** und 13-Z,15(Z,E)-Phythoen **103**

Die Reihenfolge des antioxidativen Potentials dieser Verbindungen ist Lycopin **119** > **102** > **103** >  $\zeta$ -Carotin **101**. Die strukturellen Modifikationen bewirken zwei gegensätzliche Reaktivitätstendenzen:

- Erhöhung der statistischen Abstraktionswahrscheinlichkeit durch die Vergrößerung der Zahl der allylständigen Doppelbindungen. Lycopin **119** besitzt 8 sekundäre allylische Wasserstoffatome,  $\zeta$ -Carotin **101** 16 und **102/103** jeweils 24. Gleichzeitig aber sinkt mit der Verkürzung des zentralen  $\pi$ -Systems die reaktive Abstraktionswahrscheinlichkeit an den allylisch zu diesem System stehenden Wasserstoffatomen.
- Absenkung der Additions Wahrscheinlichkeit durch Verkürzung des zentralen, konjugierten  $\pi$ -Systems. Lycopin **119** besitzt 11 dieser Doppelbindungen,  $\zeta$ -Carotin **101** 7 und **102/103** jeweils nur noch 3.

Wie man der oben aufgestellten Reihe entnehmen kann, sind diese Effekte aber nicht direkt mit der antioxidativen Reaktivität korrelierbar. Daraus kann man schließen, daß die Stärke dieser Effekte unterschiedlich sein muß. Nach DFT-Rechnungen von Bernadi [15] ist eine Addition von Tripletsauerstoff an das Polyensystem des Lycopins **119** möglich. Beim  $\zeta$ -Carotin **101** ist diese Möglichkeit zwar immer noch gegeben, aber die Reaktionswahrscheinlichkeit ist wesentlich geringer. Dasselbe gilt für die Addition von Radikalen. Bei **102/103** dürfte eine Addition von Tripletsauerstoff nicht mehr erlaubt sein. Auch in der Literatur findet man keine Beispiele für einen solchen Prozeß.

Die Verbindungen **102/103** reagieren damit praktisch nur über Abstraktion als alternative Route für die Abstraktion am Methyllinoleat. Dies zeigt sich im langsamen Abbau und dem relativ schlechten antioxidativen Potential der Verbindungen. Das

$\zeta$ -Carotin **101** zeigt einen schwachen antioxidativen und einen schwachen prooxidativen Effekt. Weiterhin ist diese Verbindung die instabilste von allen untersuchten Lycopinderivaten. Hier muß man auch mögliche Additionseffekte berücksichtigen. Sowohl die Abstraktion, als auch die Addition können das entstehende Intermediat nicht genügend stabilisieren. Anscheinend reicht die Kettenlänge des zentralen  $\pi$ -Systems nicht dazu aus. Beim  $\zeta$ -Carotin **101** befindet man sich in einem Grenzbereich.

Das Lycopin **119** selber zeigt dann einen mittelmäßigen antioxidativen Effekt und im weiteren Verlauf der Reaktion einen sehr starken prooxidativen Effekt. Daraus läßt sich schließen, daß die Verlängerung des  $\pi$ -Systems beide Effekte verstärkt. Die prooxidative Komponente dürfte aber nicht durch die Addition begründet werden, da ansonsten alle Carotinoide Krypto-Prooxidativität aufweisen müßten. Somit wird Krypto-Prooxidativität bei Polyenen durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms in Allylposition zum zentralen  $\pi$ -System ausgelöst. Ein weiteres Argument für diese These liefert das  $\beta$ -Carotin. Dort liegt in der 4-Position des Ringes dieselbe potentielle Hauptabstraktionsposition vor wie beim Lycopin **119**. Beim  $\beta$ -Carotin wird aber zu keinem Zeitpunkt des Experimentes ein direkter prooxidativer Effekt wahrgenommen. Eine möglich Erklärung für diesem Befund ist folgende: Durch die Verdrillung zwischen Ring und Kette wird beim  $\beta$ -Carotin die Konjugation des  $\pi$ -Systems teilweise unterbrochen. Dies zeigt sich auch in dessen Absorptionsmaximum, verglichen zu Lycopin **119**. Dies bedeutet, daß durch die Unterbrechung auch die Abstraktionswahrscheinlichkeit der Wasserstoffatome in der 4-Position sinkt. Sollte es wirklich dann zu dieser Abstraktion kommen, muß sich das freie Elektron nicht zwangsläufig direkt in die Polyenkette bewegen. Es ist auch möglich, daß sich der Ring vom restlichen System abkoppelt und die Allylresonanz hauptsächlich im Ring stattfindet. Trotzdem ist die Delokalisation des Elektron in die Kette immer noch möglich, wenn auch in stark abgeschwächter Form.

Diese Überlegungen können auch die Reaktivität des  $\beta$ -Carotins gegenüber den Ketocarotinoiden erklären. Nach den in dieser Arbeit präsentierten Rechnungen bewirkt die Einführung einer terminalen Ketogruppe keine nennenswerte Stabilisierung der möglichen Abstraktions- und Additionsintermediate. Die Ketogruppe wirkt aber gleichzeitig auch als „Schutzgruppe“, da durch ihre Einführung die

Wasserstoffabstraktion an den zum  $\pi$ -System endständig stehenden Wasserstoffatomen durch eine Sauerstoffüberkappung vollständig unterbunden werden.

Das  $\beta$ -Carotin kann man also als prooxidativ relativ zu dem Ketocarotinoiden einordnen. Der prooxidative Effekt wird aber durch den starken antioxidativen Effekt dieser Substanz so stark überkompensiert, daß er relativ zum untersuchten Substrat nicht direkt nachweisbar ist.

Weitere Argumente für die hier aufgestellten Thesen liefern die Ergebnisse für 221DBH **113** und 221DPD **115**: In beiden Substanzen findet man Krypto-Prooxidativität. Die entsprechenden Schwesterverbindungen HDBH **112** und HDPD **114** weisen diese Effekte nicht auf. Dort ist die isolierte Doppelbindung im Bicyclus hydriert. Es zeigt sich also, daß eine Erhöhung der Abstraktionsmöglichkeit eines Wasserstoffatoms in Allylposition zu einem konjugierten  $\pi$ -System oder die Additionsmöglichkeit von Radikalen, bedingt durch die exponierten isolierten Doppelbindungen, das antioxidative Potential einer Verbindung abschwächen kann. Gleichzeitig sieht man, daß endständige Ketogruppen diesen Effekt nicht kompensieren können.

221DPD **115** besitzt außerdem eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Verbindungen **GB1-GB5**. Die Polykettenlänge ist identisch. Bei diesen Verbindungen wurden keine „krypto-prooxidativen“ Effekte wahrgenommen. Dort sind weder sekundäre noch tertiäre Allylpositionen oder isolierte Doppelbindungen vorhanden. Aber auch dort sah man, daß die Einführung von potentiellen Abstraktionspositionen sich negativ auf die Antioxidativität einer Verbindung auswirkt.

Interessant ist, daß ein krypto-prooxidativer Effekt bei 221-9-En **117** (S.143) nicht auftritt. Die hohe strukturelle Ähnlichkeit mit  $\beta$ -Carotin legt den Schluß nahe, daß die Abstraktion zwar eine gewisse Prooxidativität bewirken muß, was sich im wesentlich schlechteren antioxidativen Verhalten von **117** bemerkbar macht, diese aber durch das antioxidative Grundpotential der  $\beta$ -Carotin-Struktur überkompensiert wird.

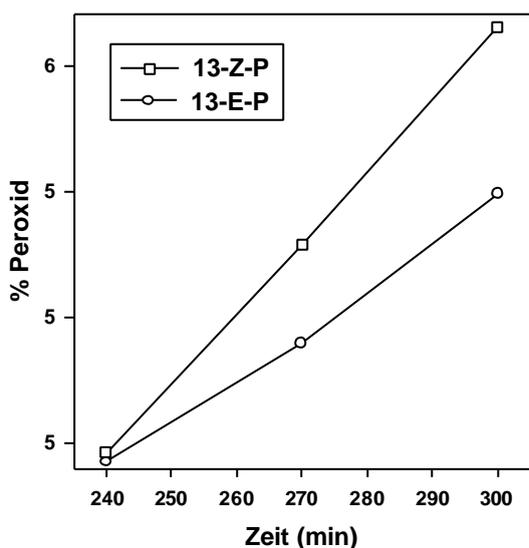
BHT ist strukturell mit keiner der anderen Verbindung verwandt. Deswegen ist es schwer Aussagen über die möglichen Mechanismen von dessen Krypto-Prooxidativität zu treffen. Man muß beim BHT berücksichtigen, daß dessen Antioxidativität auf der Stabilisierung eines Phenylradikals beruht (S.8). Solange BHT vorhanden ist, werden

Radikale von ihm abgefangen. Nach dem vollständigen Verbrauch liegen im Reaktionssystem immer noch lebende Radikale vor. Diese sind zwar relativ reaktionsträge, können aber wieder in die Reaktion eingreifen, sobald alternative Reaktionspfade ausgeschöpft sind. Das BTH-Radikal kann also wieder die Kettenreaktion aktivieren. Bei diesem Prozeß wird zwar das BHT wiedergewonnen, aber in so geringen Mengen, daß die Konzentration nicht ausreicht, um eine Antioxidativität zu gewährleisten. Es wäre interessant, genauer zu untersuchen, ob die Reaktivität des BHT's ein Oszillationsverhalten aufweist. Dazu wären Messungen mit noch höheren Konzentrationen und Meßzeiten nötig.

### 3.7.5 Konfigurationseffekte

Zur Untersuchung von Konfigurationseffekten auf die antioxidativen Eigenschaften wird noch einmal auf die Ergebnisse für 13-E-P 102 und 13-Z-P 103 eingegangen. Diese isomerenreinen Verbindungen wurden mir freundlicherweise von Dr. J. Paust von der BASF-AG zur Verfügung gestellt.

Die Graphen der Peroxidbildung in Gegenwart dieser Substanzen sind bis zu einer Reaktionszeit von 240 min praktisch deckungsgleich und zeigen ab diesem Zeitpunkt eine Aufspaltung:

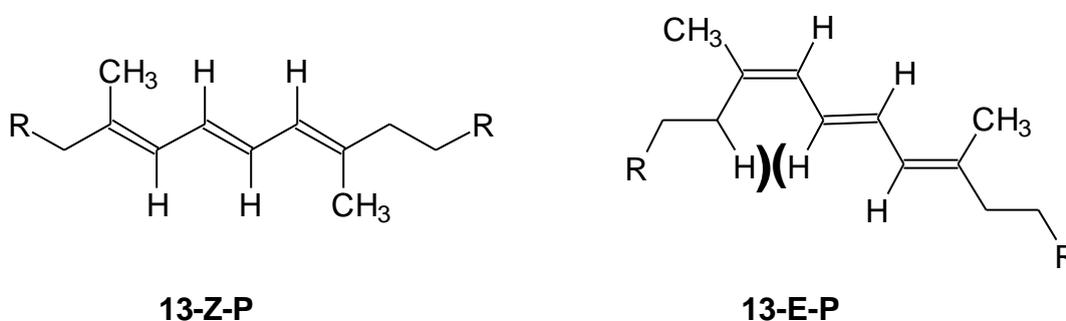


**Abbildung 206:** Ausschnittsvergrößerung der Meßgraphen für 13-E-P 102 und 13-Z-P 103

Dieser Effekt ist auch in den Derivatigraphen zu beobachten. Während beim 13-E-P 102 nach ca. 120 Minuten sich die Reaktionsgeschwindigkeit an der Untergrenze der

Geschwindigkeit der Referenzreaktion einpendelt, steigt die Geschwindigkeit beim 13-Z-P **103** weiter an. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, daß ab einer bestimmten Grenzkonzentration die Mechanismen für den antioxidativen Effekt der beiden Substanzen auseinanderdriften. Ein Zusammenhang zwischen Abbauraten der Reinsubstanzen und diesem Effekt ist nicht vorhanden. Der Abbau beider Verbindungen ist im Rahmen des zufälligen Fehlers identisch.

Zum Versuch einer dieser oben beschriebene Effekte, wird zunächst eine Diskussion über die thermodynamischen Stabilitäten basierend auf sterischen Faktoren in den Strukturen von 13-E-P **102** und 13-Z-P **103** geführt. Aus Gründen der Übersicht werden in der folgenden Abbildung nur die Mittelteile der Moleküle abgebildet.



**Abbildung 207:** Geometrie der Mittelteile von 13-Z-P **103** und 13-E-P **102**. Die Klammern deuten die Stollpressung zwischen den beiden Wasserstoffatomen an. Die *s-E*-Konformation von 13-E-P **102** ist sterisch gesehen sogar noch ungünstiger und wird deswegen nicht in die Diskussion aufgenommen. Die Reste R sind die Kohlenstoffketten, welche zu 13-Z-P **103** und 13-E-P **102** führen.

13-Z-P **103** steht also unter höherer sterischer Spannung als 13-E-P **102**. Zur Überwindung dieser Spannung wird dieses Molekül, sobald es in einer radikalischen Form vorliegt (z.B. nach der Addition von Sauerstoff oder der Abstraktion eines Wasserstoffatoms) zuerst versuchen in die *E*-Form überzugehen. Bei diesem Prozeß geht durch die Verdrillung die Stabilisierungsenergie, welche durch das konjugierte System vorliegt zeitweise verloren. Die Bildung des Radikals ist durch die vinyloge Verlängerung des Allylsystems erleichtert, die Stabilisierung aber durch die ungünstige Konfiguration abgesenkt. Deswegen stabilisiert sich das entstehende Radikal zunächst durch Abstraktion von Wasserstoff und hält somit die Kettenreaktion aufrecht. Die relativ hohe Konzentration von 13-Z-P **103** zu diesem Zeitpunkt (ca. 50%) begünstigt

diesen Reaktionspfad. Deswegen besitzt 13-Z-P **103** schlechtere antioxidative Eigenschaften als 13-E-P **102**.

Bei den anderen untersuchten Verbindungen konnten diese Effekte nicht untersucht werden, da dort die all-*E*-Verbindungen verwendet wurden, bzw. keine eindeutig reinen Diastereomerenpaare verfügbar waren.

### **3.7.5. Aktivität und Lebensdauer**

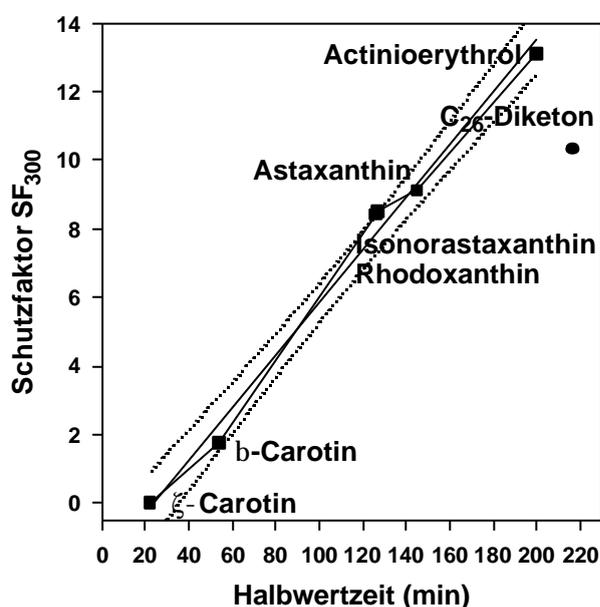
a) Im Rahmen des meßtechnischen Verfahrens konnten im Methyllinoleatsystem für die folgenden Verbindungen Halbwertszeiten der Lebensdauern während der Reaktion ermittelt werden. Dazu wurden Fitfunktionen dritter Ordnung verwendet:

Nr.	Substanz	SF <sub>300</sub>	Halbwertszeit (min)
<b>101</b>	ζ-Carotin	1.546*10e-3	22
<b>113</b>	221-DBH	0.087	144
<b>103</b>	13-Z,15(Z,E)-Phytoen	0.293	216
<b>102</b>	13-e,15(Z,E)-Phytoen	0.449	229
<b>115</b>	221DPD	0.461	56
<b>112</b>	HDBH	0.652	kein Abbau
<b>115</b>	221-9-En	0.697	51
<b>116</b>	H-9-En	0.875	40
<b>1</b>	β-Carotin	1.766	54
<b>107</b>	C <sub>22</sub> -Diketo-Diacetal	1.994	461
<b>114</b>	HDPD	2.252	88
<b>105</b>	Isonorastaxanthin	8.423	126
<b>104</b>	Rhodoxanthin	8.519	127
<b>4</b>	Astaxanthin	9.132	145
<b>96</b>	C <sub>26</sub> -Diketon	10.316	217
<b>111</b>	Actinioerythrol	13.106	200
<b>30</b>	D-L-α-Tocopherol	42.289	445

**Tabelle 14:** ermittelbare Halbwertszeiten einiger untersuchter Substanzen im Methyllinoleatsystem

Auf den ersten Blick scheint kein Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit der untersuchten Verbindungen und deren antioxidativer Aktivität zu bestehen. Dies liegt daran, daß in der oberen Tabelle Substanzen miteinander verglichen werden, welche mechanistisch vollkommen anders reagieren. Es wurde bereits gezeigt, daß die Norborn(adi)en-Polyene auf Grund der HOMO-Konjugation bzw. durch die erhöhte Abstraktionswahrscheinlichkeit von Wasserstoffomen andere Reaktionspfade einschlagen müssen als die übrigen Polyene. Auch die untersuchten Phythoene müssen nach den Überlegungen aus Kapitel 3.7.4.2. mechanistische Besonderheiten bezüglich ihrer Antioxidativität aufweisen. Das C<sub>22</sub>-Diketo-Diacetal **107** kann in seine Methoxygruppen ähnlich wie Ether reagieren und zur Peroxidbildung beitragen, ohne daß das Polyensystem beeinflußt wird. D-L- $\alpha$ -Tocopherol ist ein phenolisches Antioxidans, welches gänzlich mechanistisch anders funktioniert als ein polyenisches.

Eine graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen SF<sub>300</sub> und Halbwertszeit ergibt für die übrigen Verbindungen:



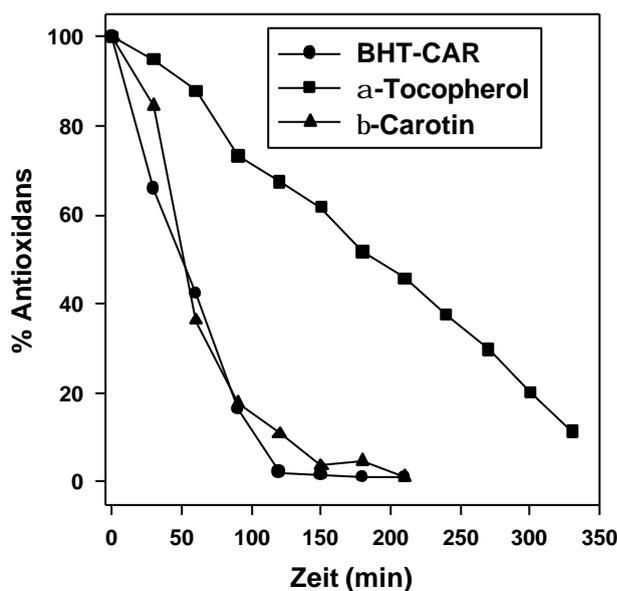
**Abbildung 208:** Zusammenhang zwischen Halbwertszeit und Schutzfaktor SF<sub>300</sub>

Wie man direkt erkennt, steigt die antioxidative Aktivität mit der Halbwertszeit der Verbindung an. Dies ist verständlich, da eine längere Lebensdauer der antioxidativen Komponente auch einen längeren Schutz gewähren kann. Das C<sub>26</sub>-Diketon **96** paßt nicht in das allgemeine Bild hinein. Seine Lebensdauer ist deutlich höher als die von Actinioerythrol **111**, trotzdem ist es ein schlechteres Antioxidans. Man muß aber

berücksichtigen, daß das C<sub>26</sub>-Diketon **96** eine kürzere Polykettenlänge aufweist als die übrigen Substanzen. Damit ist es strukturell zwar immer noch sehr eng mit den anderen Verbindungen verwandt, muß aber nicht zwingend dem selben Mechanismus gehorchen. Die gepunkteten Linien deuten das Intervall an innerhalb welchem sich der zufällige Fehler bezüglich zur Regressionsgeraden bewegt. Damit sieht man, daß ein relativ guter linearer Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit und dem Faktor SF<sub>300</sub> besteht (lineare Regression: Ordinatenabschnitt: -1.765, Steigung: 0.0764, Korrelationskoeffizient: 0.990).

Der Zusammenhang zwischen Halbwertszeit und Schutzfaktor ist ein wertvolles Hilfsmittel zur Unterstützung der Mechanismusaufklärung der Wirkungsweise von polyenischer Antioxidantien. Substanzen die Innerhalb des im Graphen eingezeichneten Intervalls liegen, dürften nach identischen oder sehr ähnlichen Mechanismen reagieren.

b) Im Cumolsystem konnten auf Grund der Reaktionsbedingungen nur bei  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Tocopherol und BHT-CAR Werte für den Abbau des Antioxidans während der Reaktion ermittelt werden. Aus Übersichtsgründen werden zunächst nur die Graphen für  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Tocopherol und BHT-CAR bei der Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$  miteinander verglichen:



**Abbildung 209:** Abbaukurven für  $\beta$ -Carotin, BHT-CAR und  $\alpha$ -Tocopherol bei  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$  im Cumolsystem

Der Kurvenverlauf ähnelt den Ergebnissen des Methylinoleatsystems. Während beim  $\beta$ -Carotin der Abbau sehr rasch ist und eher einen logarithmischen Verlauf aufweist, baut sich  $\alpha$ -Tocopherol linear ab. Berücksichtigt man die Derivatigraphen für die Peroxidbildung dieser Verbindungen (3.6.2.3. und 3.6.4.3.) so sieht man, daß beim  $\beta$ -Carotin während des ganzen Reaktionsintervalls eine kontinuierliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit zu verzeichnen ist. Ähnliche Effekte werden auch bei den anderen polyenischen Antioxidantien beobachtet. Beim  $\alpha$ -Tocopherol beginnt der Anstieg in der Peroxidbildung erst zu dem Zeitpunkt an dem das ganze Antioxidans verbraucht ist. Polyenische Antioxidantien verlangsamen nur die Peroxidation. Dies bedeutet für den Mechanismus, daß die entscheidenden Reaktionsschritte zwar schneller sind als die Peroxidbildung des Substrates, aber nicht so schnell, daß sie einen hundertprozentigen Schutz gewähren. Die statistische Wahrscheinlichkeit der Peroxidation wird nur gesenkt und nicht deaktiviert. Beim  $\alpha$ -Tocopherol ist die Reaktivität gegenüber der Peroxidbildung so hoch, daß diese komplett unterdrückt wird. Der Abbau von BHT-CAR verläuft ähnlich wie beim  $\beta$ -Carotin. Trotzdem ist diese Verbindung ein besseres Antioxidans. Dies kann nur damit erklärt werden, daß die Abbauprodukte des BHT-CAR wesentlich wirksamer sind als beim  $\beta$ -Carotin. Hier zeigt sich die mindestens zweistufige Wirksamkeit des BHT-CAR. Das Diphenol wird im ersten Schritt zu eine vinylog verlängerten Chinon oxidiert. Diesen Effekt sieht man bei der Isolierung von BHT-CAR. Bei der säulenchromatographischen Reinigung fällt ein blaues Produkt an, welches massenspektroskopisch auch als das postulierte Chinon identifiziert werden konnte.

Beim  $\beta$ -Carotin deutet sich ein Effekt an, der beim Astaxanthin deutlich erkennbar wird: Bei einer genügend hohen Konzentration an Antioxidans treten bei den Abbaugraphen dieser Verbindungen „Plateaubildungen“ auf. Hierbei handelt es sich um Bereiche in denen der Abbau der reinen Verbindungen teilweise zum Erliegen kommt. (s. 3.6.3.4.). Dieser Effekt ist nur dadurch Erklärbar, daß die Abbauprodukte des Astaxanthins selber Antioxidantien sind, welche höhere Wirksamkeit besitzen als die Ausgangsverbindung selber. Durch die erhöhte Reaktivität sind diese Abbauprodukte aber auch wesentlich empfindlicher gegenüber Sauerstoff, so daß sie schnell abgebaut werden und der Abbau des Astaxanthins nicht mehr zu stoppen ist.

### 3.7.6. Druckeffekte

In Kapitel 3.6. wurde gezeigt, daß die Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes von 150 torr auf 760 torr die Reaktionsgeschwindigkeit nur um 9% erhöhte.

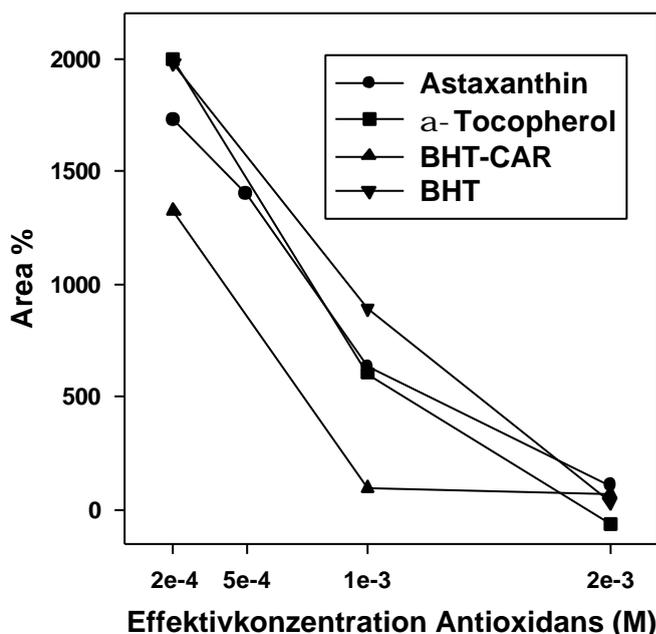
Bei den Messungen in Kapitel 3.6.3.2. zeigte sich, daß bei der verwendeten Konzentration von Astaxanthin ( $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) der Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes zu vernachlässigen ist. Bezogen auf das Referenzexperiment bei 760 torr steigt die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Zugabe von Astaxanthin nicht an.

Bei 3.6.3.4. steigt die Reaktionsgeschwindigkeit während der Reaktion stärker an als im Referenzexperiment, nach Ende des Reaktionsintervalls sind aber die Reaktionsgeschwindigkeit für 150 torr und 760 torr Sauerstoffpartialdruck wieder annähernd identisch.

Dies bedeutet, daß hohe Drücke möglicherweise krypto-prooxidative, aber keine echten prooxidativen Effekte auslösen.

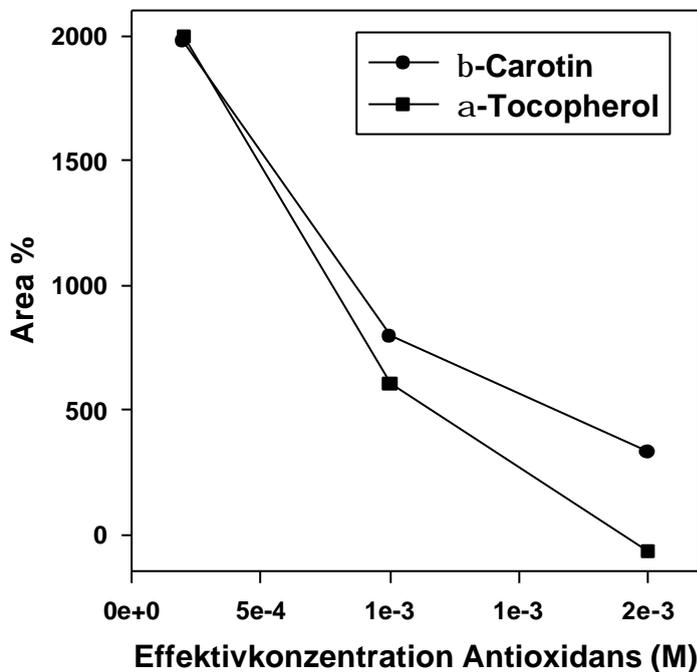
### 3.7.7. Phenolische Antioxidantien

Die Ergebnisse der Messungen zeigen ganz deutlich, daß phenolische Antioxidantien grundsätzlich andere Wirkungsmechanismen besitzen müssen als die polyenischen:



**Abbildung 210:** Vergleich der Aktivitäten der untersuchten phenolischen Antioxidantien mit Astaxanthin

Vergleicht man die Wirkung von Astaxanthin mit der von BHT und  $\alpha$ -Tocopherol, so sieht man, daß diese Verbindung bis zur Konzentration  $8 \cdot 10^{-4} \text{M}$  ein besseres Antioxidans ist. Erst bei den höheren Konzentrationen findet dann ein Wechsel in der Aktivität statt. Die phenolischen Antioxidantien sind in diesem Bereich besser wirksam. Beim  $\beta$ -Carotin zeigt sich eine ähnliche Tendenz: Während bei der Konzentrationen  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$  im Rahmen des zufälligen Fehlers keine Unterscheidung zwischen der Wirksamkeit von  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol möglich ist, zeigt  $\alpha$ -Tocopherol bei höheren Konzentrationen eine wesentlich bessere Wirksamkeit:



**Abbildung 211:** Vergleich der Aktivitäten von  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol bei verschiedenen Konzentrationen

Damit wäre erwiesen, daß die Wirksamkeit von phenolischen Antioxidantien erst bei hohen Konzentrationen einsetzt. Bei den niedrigen Konzentrationen im untersuchten Reaktionssystem sind BHT und  $\alpha$ -Tocopherol nur im mittelmäßig wirksamen Bereich einzuordnen.

Es hat sich gezeigt, daß bei den Phenolen die Wirksamkeit mit dem Vorhandensein gekoppelt ist. Während man bei den Polyenen deutliche Hinweise darauf hatte, daß die Abbauprodukte selbst auch Antioxidantien sind, wurde dieser Effekt bei den Phenolen nicht beobachtet. Bei den Messungen mit BHT zeigte sich sogar, daß die

Reaktionsgeschwindigkeit zu einem Zeitpunkt, an dem alles Antioxidans verbraucht war deutlich über der des Referenzexperimentes lag. Damit wäre bewiesen, daß wenigstens beim BHT die Abbauprodukte prooxidative Eigenschaften zeigen. Natürlich ist zu berücksichtigen, daß die entscheidende Meßgröße (der Peroxidgehalt nach 5 Stunden) rein willkürlich festgelegt wurde. Es kann also gut sein, daß nach entsprechend langen Reaktionszeiten die polyenischen Antioxidantien wieder die Oberhand gewinnen.

In dynamischen Systemen, wie z.B. im menschlichen Körper, in denen Antioxidantien ständig durch die Nahrung nachgeliefert werden können, sollten die Polyene eine bessere Schutzwirkung zeigen, da sie in kleinen Konzentrationen wirksamer sind, als die Phenole. Es muß nur wenig Antioxidans in das System eingeführt werden, um die Schutzwirkung zu optimieren. Dies ist in physiologischen Systemen sehr wichtig, da dort noch Phänomene wie Resorption und Transport berücksichtigt werden müssen.

Um durch die ständige Zufuhr eine deutliche Verbesserung der Schutzwirkung zu erzielen, sollten die Verbindungen eine Aktivität besitzen, die höher liegt, als die von  $\beta$ -Carotin, da dieses bei  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$  dieselbe Wirksamkeit wie  $\alpha$ -Tocopherol besitzt.

In statischen Systemen, z.B. beim Schutz von Kunststoffen in der Technik sind die Phenole zu bevorzugen, da sie in hohen Konzentrationen zugesetzt werden können und in diesem Bereich eine bessere Schutzwirkung auf lange Sicht entfalten können.

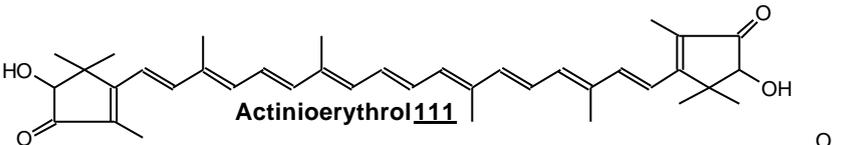
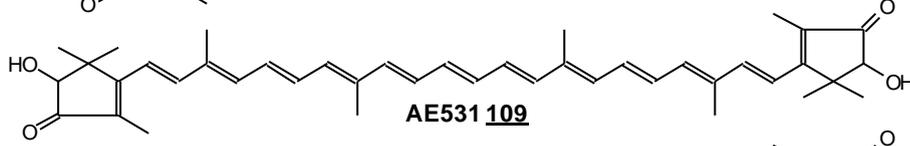
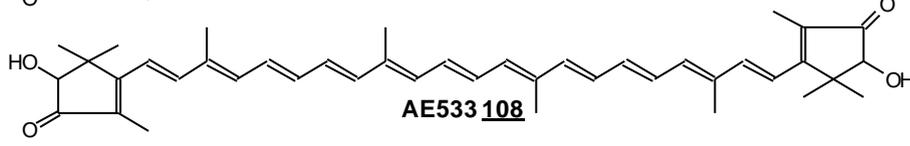
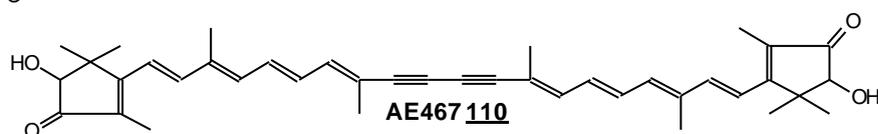
Die Verbindung BHT-CAR ist in beiden Systemen einsetzbar. Sie vereint die Eigenschaften von polyenischen und phenolischen Antioxidantien. Bei den Konzentrationen  $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$  und  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  ist sie deutlich besser als alle anderen untersuchten Verbindungen. Bei der Konzentration  $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$  zeigt sie im Langzeitversuch eine wesentlich bessere Wirksamkeit als das  $\alpha$ -Tocopherol. Bei kurzen Reaktionszeiten ist ihre Wirksamkeit nur unwesentlich schlechter als die von  $\alpha$ -Tocopherol. Dies liegt aber auch daran, daß  $\alpha$ -Tocopherol in hohen Konzentrationen als Reduktionsmittel für bereits vorhandene Peroxide wirken kann. Dieser Effekt verzerrt die Ergebnisse. Bei beiden Verbindungen wird die ohne Antioxidanzusatz nach 5 Stunden erreichte Peroxidmenge auf unter 3% reduziert.

In den Untersuchungen wurden Cumollösungen verwendet, deren Peroxidgehalt zwischen 5% und 10% der nach 5 Stunden ohne Zusatz von Antioxidans gebildeten

Peroxidmenge lag. Die Ausgangskonzentration beeinflusst die Peroxidbildung nicht. Das als Reduktionsmittel wirkende  $\alpha$ -Tocopherol senkt dann in den ersten 3 Stunden diesen Peroxidgehalt auf 3% - 5%, je nach Ausgangskonzentration ab. Da bei der Verwendung der anderen Antioxidantien sich die Peroxidkonzentration innerhalb dieses Intervalls nur im Rahmen des zufälligen Fehlers änderte, kann man für  $\alpha$ -Tocopherol das gleiche annehmen. Die Peroxidation bleibt also statisch. Dies bedeutet, daß während der Zeit in der die Reduktion der Peroxide registriert wird, sich kein weiteres Peroxid bildet. Damit wäre gezeigt, daß der hervorragende antioxidative Effekt vom  $\alpha$ -Tocopherol wirklich auf der Unterbrechung der Kettenreaktion beruht. Die Zerstörung der bereits vorhandenen Peroxide ist ein positiver Nebeneffekt.

Hiermit wäre auch wieder die dem  $\alpha$ -Tocopherol überlegene Wirksamkeit von BHT-CAR gezeigt. Man könnte vermuten, daß BHT-CAR nach langen Reaktionszeiten besser wirkt als  $\alpha$ -Tocopherol, weil dieses durch die Reduktion der Peroxide aufgebraucht wird. Nach den obigen Überlegungen ist aber die reduzierte Menge des Peroxides so klein, daß auch nach langen Reaktionszeiten genug  $\alpha$ -Tocopherol vorhanden ist, um die Kettenreaktion zu stoppen. Der Verbrauch des  $\alpha$ -Tocopherols beruht damit tatsächlich auf der Inhibition der Kettenreaktion und nicht auf der Reduktion der Peroxide.

### 3.7.8. Kettenlänge, Methylgruppenstellung- und Anzahl

Substanz	% Peroxid
 <p style="text-align: center;"><b>Actinioerythrol 111</b></p>	0.56 ± 0.01
 <p style="text-align: center;"><b>AE531 109</b></p>	0.92 ± 0.03
 <p style="text-align: center;"><b>AE533 108</b></p>	2.64 ± 0.11
 <p style="text-align: center;"><b>AE467 110</b></p>	3.47 ± 0.08

**Tabelle 15:** Antioxidative Aktivität von Actinioerythrol und seinen Derivaten

Die Ergebnisse für Actinioerythrol **111** und seine Derivate zeigen, daß strukturelle Modifikationen innerhalb der Polyenkette zu dramatischen Effekten bezüglich des antioxidativen Potentials von polyenischen Antioxidantien führen können. Die Zahl der Methylgruppen ist in allen Molekülen gleich. Deswegen muß die unterschiedliche Reaktivität auf deren Stellungen zurückgeführt werden. Beim Actinioerythrolderivat A467 **110** kommt noch zusätzlich der Einfluß der Dreifachbindungen hinzu.

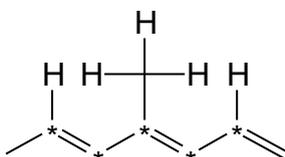
Nach der Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der allylischen Methylgruppen können sich die entstehenden Radikale über die folgende Anzahl von carbonischen Doppelbindungen stabilisieren: Actinioerythrol **111**: 11, 9, 7; AE531 **109**: 13, 11, 5; AE 533 **108**: 13, 11, 8; AE467 **110**: 12, 10, 5. Wäre die durch die Verlängerung der Polyenkette bedingte Stabilisierung über 13 oder 11 Doppelbindungen der Grund für die Verschlechterung des antioxidativen Effektes, so hätten AE531 **109** und AE533 **108** dieselbe Aktivität, da sie beide dieselben Strukturelemente enthalten. Damit scheiden diese Erklärungen aus. Der entscheidende Punkt muß die Stellung der beiden zentralen Methylgruppen sein.

Betrachtet man Actinioerythrol und AE533 **108**, so haben diese beiden Verbindungen sehr ähnliche Methylgruppenstellungen. Eine Abstraktion an den zentralen Methylgruppen führt zu Radikalen, welche über 7 bzw. 8 Doppelbindungen stabilisiert sind. Dieser geringe Unterschied in der Stabilität der entstehenden Radikale kann auch nicht die Ursache für das schlechte antioxidative Potential von AE533 **108** sein.

Aus diesen Überlegungen kann man folgern, daß für die hier gewählten Beispiele elektronische Gründe nicht entscheidend sein dürften. Eine Betrachtung der Sterik der Polyenkette liefert eine zufriedenstellende Erklärung:

Berücksichtigt man die Untersuchungen über die Abbauprodukte von  $\beta$ -Carotin, so sieht man, daß die Hauptreaktion die Epoxidierung der Doppelbindung des Ringes ist [54]. Damit wäre gezeigt, daß Additionsreaktionen innerhalb der Kette nur sekundärer Natur sind. Dies hängt mit der Struktur der Polyenkette zusammen. Der Angriff des Sauerstoffs erfolgt orthogonal zur Polyenkette. Dabei müssen sterische Hinderungen überwunden werden. Da Actinioerythrol **111** und  $\beta$ -Carotin abgesehen von den Ringen eine identische Polyenkette besitzen, sind in beiden Molekülen die sterischen Parameter für diesen Angriff fast identisch. Beim Actinioerythrol **111** ist keine Verdrillung zwischen Ring und Kette vorhanden. Dies bedeutet, daß dort noch

zusätzlich der Angriff auf die Doppelbindung des Ringes erschwert ist. Dies ist auch ein Teil der Erklärung für dessen hervorragenden antioxidativen Effekt und langsamen Abbau. Die sterische Abschirmung der Methylgruppen erschwert also den Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Kette.



**Abbildung 212:** sterischer Einfluß von Methylgruppen auf die Polyenkette. Mit \* gekennzeichnete Kohlenstoffatome liegen im Wirkungsradius der Methylgruppe

Vergleicht man das in Abb. 212 gezeigte Strukturelement mit Actinioerythrol **111**, so sieht man direkt, daß die Zahl und Stellung der Methylgruppen ausreicht, um die gesamte Polyenkette sterisch abzuschirmen. Zwar ist die sterische Abschirmung des Kohlenstoffatoms an dem explizit ein Wasserstoffatom eingezeichnet ist nur schwach, aber die Abschirmung erfolgt von zwei Seiten.

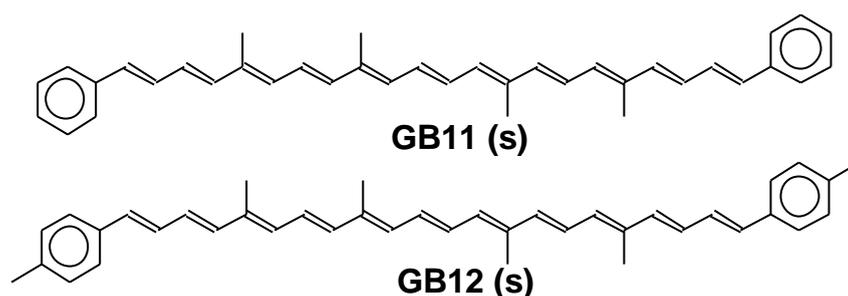
Beim AE531 **109** sind die mittleren Methylgruppen noch eine Bindung weiter von den äußeren Methylgruppen der Kette entfernt. Dies erleichtert zwar den Angriff, gibt die entsprechende Additionsposition aber nicht vollständig frei. Zusätzlich befindet sich die zentrale Doppelbindung nicht mehr im sterischen Abschirmungsbereich der zentralen Methylgruppen. Hier ist also ein Angriff sehr gut möglich. Deswegen sinkt das antioxidative Potential ab.

Beim AE533 **108** ist die zentrale Doppelbindung wieder sterisch abgeschirmt wie beim Actinioerythrol. Dafür ist die Entfernung zwischen den zentralen und peripheren Methylgruppen um eine weitere Bindung, verglichen mit AE531 **109**, angestiegen. Die sterische Abschirmung sinkt also dort weiter. Beim AE533 **108** werden also zwei neue, nicht sterisch abgeschirmte Angriffspositionen geschaffen, während es bei AE531 **109** nur eine komplett entschärfte Bindung vorliegt. Deswegen sinkt das antioxidative Potential des AE533 **108** relativ zu AE531 **109** noch weiter.

Man muß zusätzlich berücksichtigen, daß die Verschiebung der Methylgruppen in der Kette auch die Planarität der Kette teilweise aufhebt. Damit werden weitere Verdopplungen möglich, die zur Destabilisierung der Kette führen können.

Beim AE467 **110** sind die Stellungen der Methylgruppen identisch mit AE531 **109**. Dieser Faktor bewirkt, daß AE467 **110** sogar noch schlechtere antioxidative Eigenschaften als  $\beta$ -Carotin besitzt.

Wie gezeigt wurde, kann die Verlängerung der Polyenkette in Verbindung mit Verschiebung der Methylgruppen die antioxidative Wirksamkeit eines polyenischen Antioxidans stark beeinträchtigen. Dies ist nicht zwangsläufig der Fall. Betrachtet man die Verbindungen **GB11** und **GB12**, so sieht man, daß auch dort ein verlängertes Polyensystem, verglichen mit  $\beta$ -Carotin, vorliegt. Trotzdem besitzen diese Verbindungen hervorragende Eigenschaften, welche im Bereich von Astaxanthin liegen:



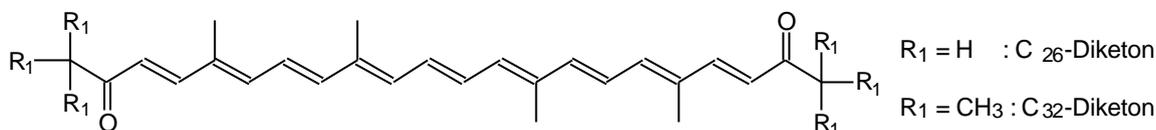
**Abbildung 213:** Struktur von **GB11** und **GB12**

Wie man aber direkt sieht, sind die Positionen der Methylgruppen innerhalb der Kette unverändert geblieben. Auch damit wäre wieder gezeigt, daß diese Positionen entscheidend für einen guten antioxidativen Effekt sind. Die Länge der Polyenkette ist in diesem Fall nur von sekundärer Bedeutung.

Die Zahl der Methylgruppen hat auch einen nennenswerten Einfluß auf die Aktivität von polyenischen Antioxidantien. Dieser Zusammenhang wurde im Kapitel 3.6.9. ausführlich diskutiert. Eine Vergrößerung der Anzahl der Methylgruppen senkt die antioxidative Wirksamkeit ab.

Die Verkürzung des Polyensystems kann den antioxidativen Effekt auch abschwächen, dies zeigte sich in Kapitel 3.7.4.2. Die dort besprochenen Effekte hängen aber nicht zwangsläufig mit dem verkürzten Polyensystem, sondern eher mit der Erschaffung von neuen Allylposition zusammen. Die dadurch erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffabstraktionen senkt die Antioxidativität merklich ab.

Die einzigen Verbindungen, bei welchen zwar die Kette verkürzt wurde, aber keine neuen Abstraktionspositionen erschaffen wurden oder sich Zahl und Stellung der Methylgruppen änderte waren die beiden Diketone C<sub>26</sub>-Diketon und C<sub>32</sub>-Diketon:



**Abbildung 214:** Struktur von C<sub>26</sub>-Diketon **96** und C<sub>32</sub>-Diketon **97**

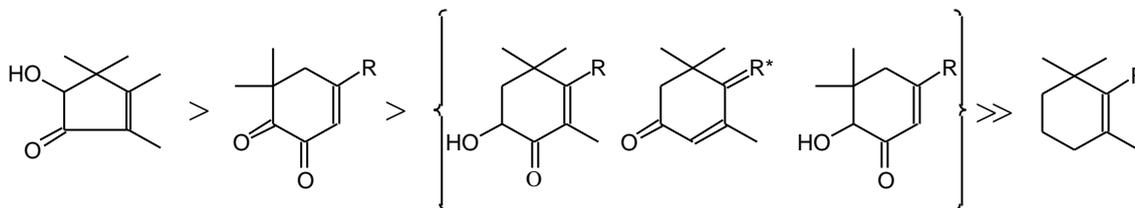
Es handelt sich um mittels zweier fehlender Doppelbindungen verkürzte Astaxanthinchromophore bzw. den Chromophor des Capsorubins. Die Eigenschaften dieser Verbindungen sind trotz der kürzeren Polyenkette erstaunlich: Im Methyllinoleatsystem ist das C<sub>26</sub>-Diketon **96** dem Astaxanthin in seinen antioxidativen Eigenschaften überlegen. Im Cumolsystem müssen die Eigenschaften von Astaxanthin, C<sub>26</sub>-Diketon **96** und C<sub>32</sub>-Diketon **97** als identisch angenommen werden, da dort die Auflösung des Verfahrens nicht ausreicht, um eine außerhalb des zufälligen Fehlers vorliegende Unterscheidung vorzunehmen.

Das C<sub>26</sub>-Diketon **96** liegt also trotz seiner kürzeren Polyenkette im Wirkungsbereich des Astaxanthins. Dies bedeutet, daß die Polyenkettlänge mindestens um zwei Doppelbindungen verkürzt werden darf, ohne die antioxidative Wirksamkeit zu beeinträchtigen. Damit zeigt sich wieder, daß die Länge der Kette nicht zwangsläufig die Hauptursache für hohe Antioxidativität ist. Entscheidend für die hohe Wirksamkeit des C<sub>26</sub>-Diketons **96** ist anscheinend seine hohe Planarität gegenüber Astaxanthin. Dort sind Ring und Kette etwas verdreht, so daß die elektronischen Eigenschaften des Astaxanthins etwas abgeschwächt werden. Somit ist das C<sub>26</sub>-Diketon in seinen Eigenschaften nicht besser als Astaxanthin, sondern Astaxanthins Wirksamkeit liegt unterhalb von seinen theoretischen Möglichkeiten.

Der Wirksamkeitsvergleich von C<sub>26</sub>-Diketon **96** und C<sub>32</sub>-Diketon **97** zeigt, daß die Wasserstoffabstraktion in  $\alpha$ -Stellung zur Ketogruppe keinen Einfluß auf die antioxidativen Eigenschaften der Verbindungen hat.

### 3.7.9. Weitere polyenische Antioxidantien

Abschließend wird hier noch die Reaktivität einiger Ketocarotinoide untereinander und mit  $\beta$ -Carotin verglichen werden. Dazu werden die Endgruppen dieser Verbindungen aufgeführt, da sich die Substanzen nur dort unterscheiden:



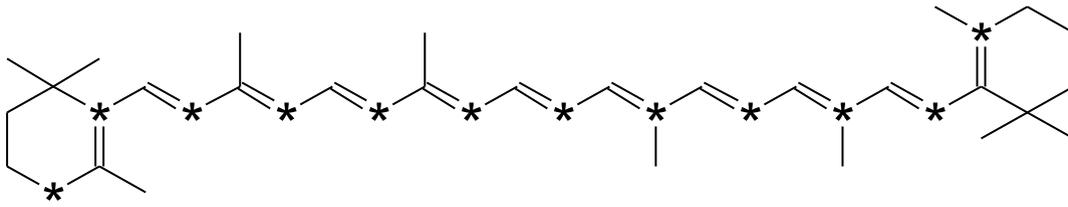
**Abbildung 215:** Endgruppen von Actinioerythrol **111**, Isonorastazin **106**, Astaxanthin **4**, Rhodoxanthin **104**, Isonorastaxanthin **105** und  $\beta$ -Carotin **1**, geordnet nach abfallender antioxidativer Aktivität. Die sich in der geschweiften Klammer befindlichen Verbindungen sind im Rahmen des zufälligen Fehlers in ihren Reaktivitäten nicht unterscheidbar.

a) Eine der Hauptfragestellungen zur antioxidativen Aktivität von Carotinoiden ist Begründung für die hohe Aktivität des Astaxanthins verglichen mit  $\beta$ -Carotin:

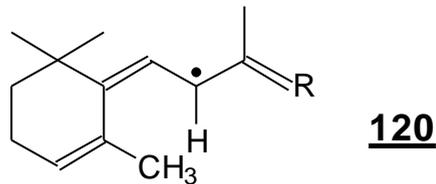
Alle Substanzen besitzen Methylengruppen in Allylstellungen zu Ketogruppen oder zum Polyensystem. Diese sind somit potentielle Wasserstoffabstraktionspositionen für reaktive Radikale. Nur beim  $\beta$ -Carotin kann sich das entstehende Radikal über klassische Grenzformeln in der Polyenkette verteilen. Bei allen anderen Verbindungen bleibt das freie Elektron im Ring. Die Besonderheit der 4-Position im Jononring zeigt sich auch in der präparativen Literatur [81]. Dort sieht man, daß Wohl-Ziegler Bromierungen selektiv diese Position angreifen. Dies ist verständlich, da es sich um die einzige sekundäre Allylposition im gesamten Molekül handelt. Auch Britton et al. [82] machen das Vorhandensein dieser Abstraktionsposition für die relativ schlechte antioxidative Wirksamkeit von  $\beta$ -Carotin verantwortlich.

Bei den Abbauprodukten des  $\beta$ -Carotins findet man neben den hauptsächlich gebildeten Epoxiden auch vermehrt langkettige Apocarotinoide [54]. Peroxide des  $\beta$ -Carotins in 4-Position wurden bis jetzt noch nicht nachgewiesen. Dies bedeutet, daß diese entweder nicht gebildet werden oder so instabil sind, daß sie nicht detektiert werden können.

Nach der Abstraktion des Wasserstoffatoms entsteht ein sehr langes, mesomeriestabilisiertes Polyenylsystem:



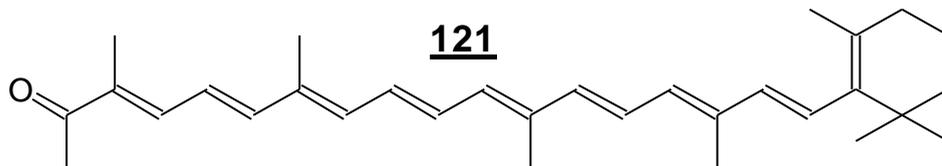
**Abbildung 216:** Mögliche Positionen (\*) eines freien Elektrons innerhalb der Polyenkette nach der Abstraktion eines Wasserstoffatoms in 4-Position im Jonon-Ring  
Sobald sich eine Grenzformel ausbildet, bei welcher sich das Elektron außerhalb des Ringes befindet, steht die Verbindungsstelle zwischen Ring und Kette unter sehr hoher sterischer Spannung:



**Abbildung 217:** Mögliches Intermediat **120** von  $\beta$ -Carotin nach der Wasserstoffabstraktion in 4-Position im Jonon Ring.

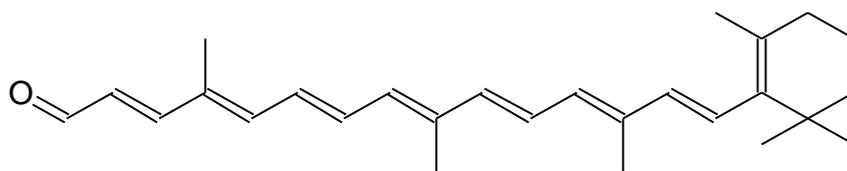
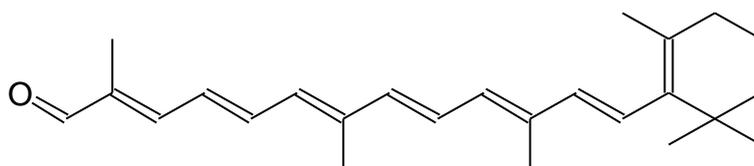
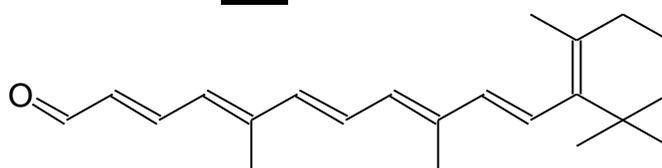
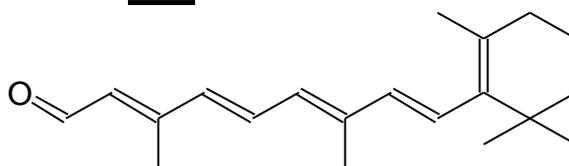
Durch die Retrostruktur und die ungünstige Z-Doppelbindung wird die Stollpressung im Molekül so erhöht, daß Ring und Kette noch stärker verdrillt werden. Im Unterschied zum  $\beta$ -Carotin wird hier aber noch zusätzlich das erste Kohlenstoffatom der Kette gegenüber der restlichen Kette mitverdrillt. Gleichzeitig wird der orthogonale Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies auf das Molekül erleichtert, da die sterische Abschirmung des Ringes weniger gegeben ist.

Das Reaktionsprodukt zerfällt, und es bildet sich das erste wichtige Abbauprodukt, das  $\beta$ -Apo-8'-Carotenal:



**Abbildung 218:** Struktur von  $\beta$ -Apo-8'-Carotenal **121**

Da sich das freie Elektron in der Kette delokalisieren kann, werden natürlich auch entsprechende andere Apo-Carotinoide gebildet:

**b-Apo-10'-Carotenal 122****b-Apo-12'-Carotenal 123****b-Apo-14'-Carotenal 124****b-Apo-15'-Carotenal (Retinal) 5**

**Abbildung 219:** Die nach  $\beta$ -Apo-8'-Carotenal 121 wichtigsten gebildeten Apocarotinoide

Das Auftreten dieser Produkte wurde von Mordì [54] und Bonnie [83] eingehend untersucht und nachgewiesen.

Es zeigt sich, daß nur Produkte gefunden werden, welche aus gesternten Positionen in Abb. 216 entstehen können. Diese Positionen wurden bereits als wahrscheinlichste Aufenthaltsorte des freien Elektrons in der Kette festgelegt.

Betrachtet man die sterische Hinderung der Kette für einen Angriff und die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.7.8. und 3.7.4.2., so ist es nicht unwahrscheinlich, daß der oxidative Zerfall von  $\beta$ -Carotin nicht mit der Addition von Sauerstoff an das Polyensystem

beginnt, sondern durch die Abstraktion des Wasserstoffs in der 4-Position des Jonon-Ringes. Die Argumente die dafür sprechen sind:

- 1) Die Untersuchungen der Actinioerythrolderivate zeigen, daß mit steigender sterischer Entlastung der Polyenkette die antioxidative Wirksamkeit abnimmt. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß die Verteilung der Methylgruppen innerhalb der Polyenkette einen optimalen Schutz gegen den Angriff von Sauerstoff gewährleistet. Der sterische Parameter ist für Actinioerythrol **111** und  $\beta$ -Carotin gleich. Deswegen müßte Actinioerythrol **111** ein ähnliches Verhalten wie  $\beta$ -Carotin zeigen. Dies ist nicht der Fall.
- 2) Nach Untersuchungen von S. Sell [80] findet man bei der thermischen Zersetzung von Astaxanthin keine Apocarotinoide. Die Reaktion dort verläuft viel geordneter als beim  $\beta$ -Carotin. Würde der Mechanismus über eine Addition verlaufen, müßte man auch beim Astaxanthin die entsprechenden kurzkettigen Derivate finden.
- 3) Lycopin **119** ist ein schlechteres Antioxidans als  $\beta$ -Carotin. Dies kann man ebenfalls über die Abstraktion erklären. Nach der Wasserstoffabstraktion befindet sich das Radikal sofort in der Polyenkette. Beim  $\beta$ -Carotin muß zuerst die sterische Hinderung zwischen Ring und Kette durch die Ausbildung der Struktur **120** (Abb. 217) überwunden werden. Somit zerfällt Lycopin schneller und ist damit das schlechtere Antioxidans.

Es scheint zwar, daß das Redoxpotential der entsprechenden Verbindungen auch mit deren Antioxidativität zusammenhängt [84, 85], dies ändert aber nichts an der Tatsache, daß  $\beta$ -Carotin und Lycopin **119** durch die vicinal zum Polyensystem stehende Methylengruppe besondere Eigenschaften besitzen, die den antioxidativen Effekt abschwächen. Die beiden Moleküle sind Ausnahmefälle. Der Normalfall sind die untersuchten Ketocarotinoide bei denen dieses Strukturelement fehlt.

- b) Alle Ketocarotinoide aus Abb. 215 besitzen hervorragende antioxidative Eigenschaften. Eine einheitliche Erklärung für die unterschiedlichen Reaktivitäten zu finden ist auf Grund des vorliegenden Datenmaterials nicht möglich. Trotzdem kann man aus den Ergebnissen gewisse Tendenzen ablesen, die auf den Mechanismus schließen lassen.

Es liegt zunächst die Vermutung nahe, daß die sehr gute Antioxidativität von Astaxanthin und Actinioerythrol **111** damit begründet werden kann, daß die Acyloinstruktur leicht zum Diketon oxidiert werden kann. Diese Oxidation wäre natürlich eine Konkurrenzreaktion zur Peroxidation der Lipide und würde somit die Lipidperoxidation unterdrücken. Dieser Reaktionspfad kann ausgeschlossen werden. Dies zeigt das Meßergebnis für Isonorastazin **106**. Diese Verbindung besitzt ein höheres antioxidatives Potential als ihr korrespondierendes Acyloin Isonorastaxanthin **105**. Wäre die oben genannte Vermutung korrekt, so müßten die Aktivitäten sich genau umgekehrt verhalten.

Betrachtet man die Strukturen von Isonorastaxanthin **105** und Isonorastazin **106**, so sieht man, daß der Unterschied in den Reaktivitäten weder durch Planarisierungseffekte, noch durch Unterschiede in den Wasserstoffabstraktionstendenzen in den Molekülen ausgelöst werden kann. Das unterschiedliche Verhalten muß rein elektronischer Natur sein. Die Diketonstruktur erhöht das Redoxpotential des Isonorastazins gegenüber dem Isonorastaxanthin **105**. Damit ist Isonorastazin **106** schwerer zu oxidieren und damit stabiler. Dies bedeutet, daß es dem Reaktionssystem länger zur Verfügung stehen kann und somit die Peroxidation besser unterdrückt als Isonorastaxanthin **105**.

Es scheint, daß Planarisierungen zwischen Ring und Kette die Antioxidativität verstärken. Dies ergibt sich aus dem Vergleich von Astaxanthin und Actinioerythrol **111**. Die fehlende Methyleneinheit im Actinioerythrol dürfte keine für den Mechanismus wichtigen elektronischen Eigenschaften des Molekül, verglichen mit Astaxanthin, beeinflussen. Die Änderung in den elektronischen Eigenschaften ist rein sterischer Natur. Die Planarisierung des Polyensystems erhöht dessen Redoxpotential, somit ist Actinioerythrol stabiler als Astaxanthin. Dies zeigt sich auch beim Vergleich der Halbwertszeiten beider Verbindung (S. Kapitel 3.7.5.).

Planarisierung des  $\pi$ -Systems findet man auch beim Isonorastaxanthin **105** und Rhodoxanthin **104**. Deren Eigenschaften sind mit denen von Astaxanthin aber identisch. Beim Isonorastaxanthin muß aber berücksichtigt werden, daß eine allylische Methyleneinheit eingeführt wurde. An dieser Stelle sind wieder Abstraktionen möglich. Das entstehende Radikal kann aber nicht in die Kette ausweichen, wie es z. B. beim  $\beta$ -Carotin der Fall ist. Die Methylengruppe ist aber in jedem Fall eine potentielle

Abstraktionsposition an welcher auch Sauerstoffadditionen möglich sind. Damit besitzt das Isonorastaxanthin **105** ein Strukturelement, welches als potentiell cooxidative Komponente wirken kann. Der Aktivitätsgewinn durch die Planarisierung wird durch dieses Strukturelement kompensiert.

Beim Rhodoxanthin **104** wird die Planarisierung durch die Einführung der Retrostruktur erreicht. Die Retrostruktur erhöht aber gleichzeitig die sterische Spannung zwischen Ring und Kette und trägt somit zur Destabilisierung des Moleküls bei. Also findet man hier auch gegenläufige Effekte, welche sich kompensieren. Beim Rhodoxanthin **104** ist das  $\pi$ -System sogar eine Doppelbindung länger als beim Astaxanthin. Damit zeigt sich, daß diese Verlängerung keinen nennenswerten Einfluß auf das antioxidative Potential des Moleküls ausübt.

### **4. Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die in der Problemstellung angesprochenen Fragestellungen und daraus neu entstandene erfolgreich bearbeitet:

#### **1) Apparative Ergebnisse:**

Das von Terao [10] vorgestellte Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität konnte so modifiziert werden, daß es als Routinemeßverfahren einsetzbar ist. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Verwendung von Methylinoleat als Substrat Probleme aufwirft, welche die Ergebnisse beeinflussen können. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß die katalytische Wirkung der Glasoberfläche bei Reaktionen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, einen entscheidenden Einfluß auf die Messungen haben kann. Zur Lösung dieser Probleme wurden der Einfluß der Glasoberfläche und die notwendigen Modifikationsmethoden zur Verifizierung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Zur Umgehung dieser Probleme wurde ein ähnliches Verfahren entwickelt, bei welchem Cumol als Substrat eingesetzt wird. Bei diesem Verfahren treten die oben genannten Effekte nicht auf.

#### **2) Auswertungsmethoden:**

Zur Quantifizierung und Erklärung der antioxidativen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen wurden erstmals auch Derivatvaufragungen der Meßergebnisse verwendet. Diese geben Aufschluß über Reaktionsgeschwindigkeiten und -beschleunigungen und mögliche mechanistische Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Substanzen.

#### **3) Erweiterung des literaturbekannten Datenmaterials**

In der Literatur gab es bis dato keine umfassende Untersuchung der antioxidativen Aktivität von Polyenen und Phenolen. Zwar sind einige der untersuchten Verbindungen ( $\beta$ -Carotin, Lycopin Astaxanthin,  $\alpha$ -Tocopherol) genau untersucht worden, aber es gibt keine zusammenhängende Untersuchung. Alles vorhandene Datenmaterial wurde mit verschiedenen Methoden ermittelt, so daß ein direkter Vergleich unmöglich ist. Auch gab es bis zu dieser Arbeit keine Untersuchungen über die Aktivitäten bestimmter Ketocarotinoide wie Actinioerythrol und Isonorastazin.

Die hier vorliegende Datensammlung ist der Grundstock für eine einheitliche Diskussion des antioxidativen Effektes von Polyenen und Phenolen.

#### **4) „Krypto-Prooxidativität“**

Es wurde ein neuer Effekt gefunden und definiert. Die „Krypto-Prooxidativität“ ist ein Ansatz, welcher das Langzeitverhalten von Antioxidantien näher quantifizieren kann. Auch ist sie ein zusätzlicher Parameter für die Gütebestimmung eines Antioxidans. Es konnte gezeigt werden, daß scheinbar reine Antioxidantien die Reaktion, welche sie eigentlich unterbrechen sollen, auch beschleunigen können.

#### **5) Neue Erkenntnisse über das Burton-Ingold-Phänomen**

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.7.4.1. zeigen, daß die in der Literatur formulierte vermeintlich schädliche Wirksamkeit von  $\beta$ -Carotin im in-vitro Experiment nicht mehr haltbar ist. Auch bei hohen Konzentrationen konnte keine vermehrte Peroxidbildung im Substrat nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß das Burton-Ingold-Phänomen nur durch einen vermehrten Verbrauch des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs durch  $\beta$ -Carotin erklärbar ist. Damit wird gleichzeitig auch wieder die Aussagekraft der ATBC- und CARET-Studien in Frage gestellt. Es ist nötig diese Verfahren noch einmal kritisch zu überdenken und weitere Carotinoide, wie z.B. Astaxanthin näher auf ihre in vivo Eigenschaften zu untersuchen.

Diese Arbeit beweist, daß die Messung des Sauerstoffverbrauchs allein kein geeignetes Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Antioxidantien ist. Der entscheidende Parameter ist die Messung des Substratverbrauches oder der Peroxidbildung. Druckmessungen sind wichtige begleitende Experimente zur Einordnung von Antioxidantien, ihre Aussagekraft muß aber immer kritisch im Zusammenhang mit den komplementären Peroxidmessungen evaluiert werden.

#### **6) Semiempirische Rechnungen für mechanistische Studien**

Die Ergebnisse der PM3-Rechnungen zeigen, daß die Abstraktion in der 4-Position des  $\beta$ -Jonon-Ringes die bevorzugte ist. Dies deckt sich auch mit a priori gemachten Aussagen, wenn man die Grundzüge von Struktur und Reaktivität von Radikalen zu Hilfe nimmt.

Die Rechnungen für die Addition liefern starke Hinweise darauf, daß die 5-Position des Ringes das bevorzugte Angriffszentrum für die Addition von Radikalen ist. Die thermodynamischen Stabilitäten der Produkte lassen diesen Schluß zu. Auch dies bekräftigt die literaturbekanntesten experimentellen Daten von Mordt [54].

Man sieht aber auch, daß die thermodynamischen Stabilitäten von Ketocarotinoid-Sauerstoffaddukten keine gegenüber den reinen Kohlenwasserstoffen erhöhte Stabilisierung aufweisen. Deswegen ist es fraglich, z.B. beim Astaxanthin für die erhöhte Wirksamkeit relativ zu Carotin eine verbesserte Stabilisierung des entstehenden Radikals durch die Carbonylgruppe zu formulieren. Es müssen andere mechanistische Gründe entscheidend sein.

### **7) Halbwertszeiten**

Es konnte nachgewiesen werden, daß bei strukturell sehr ähnlichen Substanzen ein linearer Zusammenhang zwischen deren Schutzfaktoren  $SF_{300}$  und der Halbwertszeit im Reaktionssystem besteht. Pro Minute Verlängerung der Halbwertszeit steigt der Schutzfaktor um 0.08 an. Substanzen, die nicht in diese Auftragung passen müssen nach anderen Mechanismen reagieren. Es wurde erklärt, warum nicht alle der untersuchten Substanzen sich in diese Auftragung einfügen.

Damit wäre bewiesen, daß die Halbwertszeit zwar als Kriterium für die Güte eines Antioxidans anwendbar ist, aber nur bei Verbindungen, welche direkt vom  $\beta$ -Carotin ableitbar sind und ein identisches Polyensystem beinhalten. Die Einordnung dieser Verbindungen ist ein wichtiger Schritt für die Mechanismusaufklärung von polyenischen Antioxidantien, da man nun ein Kriterium besitzt, um Substanzen vergleichen zu können, bei denen ähnliche oder identische mechanistische Verhältnisse vorliegen. Dies ist notwendig zur Erstellung eines globalen Mechanismus, da das Einbeziehen aller Substanzen in eine einheitliche Diskussion schnell zu falschen Schlüssen führen kann.

Das Vorhandensein eines genügend langen Polyensystems ist zwar eine Voraussetzung für Antioxidativität von Polyenen, aber keine Voraussetzung für identische Reaktivität.

### **8) Plateaueffekte**

Es konnte gezeigt werden, daß bei hohen Astaxanthinkonzentrationen der Abbau des Astaxanthins während der Reaktion teilweise unterbrochen wird. Damit ergibt sich ein

wichtiger Hinweis auf die These, daß die Abbauprodukte des Astaxanthins auch wirksame Antioxidantien sind.

### **9) Kettenlänge, Sterik und Abstraktion**

Die Länge der konjugierten Polyenkette ist im Rahmen von  $\pm 2$  Doppelbindungen variierbar, ohne große Unterschiede im antioxidativen Potential zu erzielen. Viel wichtiger ist die Stellung und Anzahl der Methylgruppen. Eine Erhöhung dieser Zahl bedingt eine Erweiterung der Abstraktionsmöglichkeiten von Wasserstoffatomen durch reaktive Radikale. Damit sinkt das antioxidative Potential der entsprechenden Verbindung, da sie nun als Cooxidans in den Mechanismus eingreifen kann.

Auch wurde gezeigt, daß die Position der Methylgruppen sehr wichtig ist. Eine sterische Entlastung der Polyenkette führt zu einer Erweiterung der potentiellen Additionspositionen, welche das antioxidative Potential absenken. Die optimalste Methylgruppenstellung ist diejenige, welche schon von der Natur durch die Biosynthese der Carotinoide vorgegeben ist.

Weiterhin wurden wichtige Hinweise darauf gefunden, daß die Planarität des Polyensystems sich positiv auf die antioxidative Wirksamkeit polyenischer Antioxidantien auswirkt. Verbindungen ohne Verdrillung zwischen Kette und Ring, bzw. ohne Verdrillung in der Kette sind Substanzen, die solche Verdrillungen aufweisen, überlegen.

Zusätzlich ergab sich, daß Z-Konfigurationen in der Polyenkette die Antioxidativität absenken.

### **10) Phenole und Polyene**

Polyene und Phenole besitzen grundsätzlich andere Wirkungsmechanismen. Während bei den Phenolen die antioxidative Eigenschaft direkt an das Vorhandensein der Verbindung selbst gekoppelt ist, konnte gezeigt werden, daß bei den polyenischen Antioxidantien auch die Abbauprodukte selber Antioxidantien sein können. Polyenische Antioxidantien können also mehrstufig wirken.

Auch hat sich gezeigt, daß bei niedrigen Konzentrationen (Antioxidans : Substrat = 1 : 18000) die polyenischen Antioxidantien mit hoher Wirksamkeit den phenolischen ebenbürtig oder überlegen sind. Erst bei höheren Konzentrationen (Substrat :

Antioxdians = 1800 : 1) wechseln diese Eigenschaften. In diesen Bereichen können die phenolischen Antioxidantien die Reaktion vollständig unterdrücken.

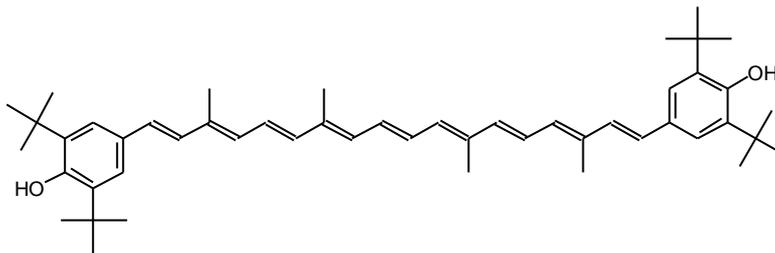
### **11) Flavonoide**

Eine Erhöhung der Zahl der Hydroxygruppen steigert die Antioxidativität eines Flavonoids, ganz besonders gilt dies für die 3- und 6-Position. OH-Gruppen in 5- und 7-Position haben keine oder nur minimale Auswirkungen auf die Antioxidativität. Para-ständige Hydroxygruppen an substituierten Benzolringen in der 2-Position wirken sich ebenfalls in bemerkenswerter Weise positiv auf die Antioxidativität aus.

### **12) Synthetische Ergebnisse**

Im Rahmen der synthetischen Projekte dieser Arbeit konnten folgende präparativen Ergebnisse erzielt werden:

- 1) Es wurde eine neue Route für die Synthese von 1,2,3,3,5,5-Hexamethyl-cyclohex-1-en gefunden. Der bekannte Weg von Mayr. et al. wurde von 5 Stufen auf 3 reduziert. Weiterhin gelang es, diesen Baustein zu einem Phosphoniumsalz umzusetzen, welches eine wertvolle Endgruppe zur Synthese neuartiger Carotinoide ist. Durch die Umsetzung dieser Verbindung mit Crocetininaldehyd wird es möglich sein, 4,4,4',4'-Tetramethyl- $\beta$ -Carotin zu synthetisieren. Diese Verbindung kann entscheidende Ergebnisse für die Aufklärung des Mechanismus der antioxidativen Wirksamkeit von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin bringen.
- 2) Es wurden neue Routen zur Funktionalisierung von Chromanen beschritten. Die erhaltenen Synthons sind ebenfalls wertvolle Bausteine zur Synthese von gekoppelten "Tocopherol-Carotinoiden", von deren Wirksamkeit man sich neue Effekte in der Antioxidantienchemie verspricht.
- 3) Es gelang, ein neuartiges Carotinoid, BHT-CAR, zu synthetisieren. Dessen Reaktivität vereinigt die positiven Eigenschaften polyenischer und phenolischer Antioxidantien und ist zweistufig wirksam. Sein antioxidatives Potential ist das höchste von allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen und gibt neue Impulse für das Design moderner, biologisch aktiver Antioxidantien.



**Abbildung 220:** Struktur von BHT-CAR

### **13) Weitere mechanistische Erkenntnisse**

Die Ergebnisse zeigen noch einmal deutlich, daß die Reaktivität von  $\beta$ -Carotin und Lycopin gegenüber den untersuchten Ketocarotinoiden eine Sonderstellung einnimmt. Diese wird durch die am Polyensystem stehende Methyleninheit begründet. Wasserstoffabstraktionen an dieser Stelle führen die Reaktion auf Pfade, welche das vorhandene antioxidative Potential des  $\beta$ -Carotins absenken. Bei den Ketocarotinoiden ist dies nicht der Fall, da diese erwähnte Position durch die Ketogruppen blockiert ist.

Es konnte gezeigt werden, daß die Bildung der Apocarotinoide beim thermischen Abbau des  $\beta$ -Carotins auch über einen Mechanismus verlaufen kann, der durch die Wasserstoffabstraktion ausgelöst wird. Direkte Additionen von Sauerstoff an das Polyensystem sind also nicht zwangsläufig vorhanden. Es kann sich ebenso gut um eine Addition an ein durch Wasserstoffabstraktion entstandenes Intermediat handeln, sofern abstrahierende Radikale in nennenswerter Konzentration anwesend sind.

Für optimale antioxidative Wirksamkeit von Carotinoiden müssen folgende Strukturregeln beachtet werden: Die Substanz sollte nur die natürliche Anzahl und Stellung der Methylgruppen wie sie im  $\beta$ -Carotin vorkommt enthalten. Die Polykettenlänge sollte ebenfalls nicht länger sein. Ein hohes Redoxpotential und Planarität zwischen Ring und Kette fördern ebenfalls die Antioxidativität. Abstraktionspositionen, bei welchen sich das Radikal in die gesamte Kette delocalisieren kann, sind zu vermeiden.

Mit Hilfe dieser einfachen Strukturregeln sollte es möglich sein, synthetische, polyenische Antioxidantien zu entwickeln, deren Wirkung den natürlichen überlegen ist!

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Allgemeines

Folgende Geräte und Hilfsmittel wurden zur Isolierung und Charakterisierung der Verbindungen verwendet:

Schmelzpunkte:	Thermovar, Fa. Reichert, Wien / Österreich (alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert)
Gaschromatographie:	Hewlett-Packard 5890 A mit Säule SE 30 Injektortemperatur 230°C Aufheizrate 16°C / min von 80°C - 230°C Integrator HP 3390 A, Böblingen
Dünnschichtchromatographie:	Merck DC-Folie, Kieselgel 60 auf Aluminium, Fluoreszenindikator F <sub>254</sub> (0.2mm)
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60, 230-400 mesh, Merck
<sup>1</sup> H-NMR-Spektren:	200 MHz: Bruker AM 200 300 MHz: Varian VXR 300
<sup>13</sup> C-NMR-Spektren	75 MHz: Varian VXR 300
<sup>31</sup> P-NMR-Spektren	200 MHz: Bruker AM 200
IR-Spektren	Perkin Elmer Infrared Spectrometer 710 B
UV/Vis-Spektren	Zeiss DMR 21 M4 Q III
Massenspektren	Varian MAT/CH5; Varian MAT 311 A Ionisierungsenergie 70 eV
GC / MS:	Hewlett-Packard 5890 10m Kapillarsäule HP OV-1-FS Hewlett-Packard 5970, Ionisierungsenergie: 70 eV
Hochauflösende MS	Finnigan MAT 9, Ionisierungsenergie 70 eV
HPLC	Pumpe: Hewlett Packard Chemstation 1050 Detektor: Hewlett Packard 1040M Series II HPLC-DAD-Detector-System Säule: YMC SIL-ASP, 150x6 mm, S-5 µM, 60 Å

HPLC

Laufmittel: n-Hexan:Isopropanol : 99:1

Flow: 2ml/min

An dieser Stelle ist es angebracht allen Angehörigen des Arbeitskreises für die freundliche Aufnahme und stete Hilfsbereitschaft zu danken. Folgenden Damen und Herren danke ich für ihre besondere Unterstützung, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat:

Herrn Prof. Dr. R. Walsh (University of Reading, England) für die Einführung in kinetisches Verständnis, Meßverfahren und Beantwortung von zahlreichen kleinen Fragen, auf die er eine Antwort hatte.

Herrn Dr. Bernhard ("Pernhard") Mayer für alle kleinen und großen Hilfen und die moralische Aufrichtung in den Zeiten als ich glaubte, es würde nicht mehr weitergehen.

Herrn Dr. H. Dickopp für die vielen wertvollen präparativen Tips, welche durch kein Lehrbuch ersetzt werden können und die interessanten Diskussionen über die Dinge welche jenseits der Grenze unserer Vorstellungen liegen.

Herrn Dr. G. Broszeit für die guten Zeiten im Büro und anderswo.

Den Herren Dipl.-Chem J. "Faustino XXX" Benade und Dipl.-Chem S. "Rocco" Sell für die perfekte Zusammenarbeit im Büro und Labor und die ganzen kleinen Geschichten, welche uns widerfahren sind.

Frau Irmgard Menzel für die Messung von IR-Spektren, genaue Einwaagen, viele Zigaretten und ihre Korrekturlesungen und Kritiken privat verfaßter Manuskripte.

Frau M. Beuer und den Herren Dr. P. Tommes und R. Bürgel für die Messungen von NMR und Massenspektren.

Alle Arbeiten, welche mir von Ihnen synthetisierte Substanzen zur Vermessung überlassen haben.

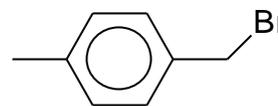
Meiner Frau Yulia, die mir jeden Tag Freude macht und sagte: "Marcus, alles wird gut!" an dem Tag wo ich beinahe den Glauben an mich selbst verlor.

Und schließlich meinen Eltern und meinem Bruder, welche mich die ganzen Jahre immer unterstützt und beraten haben. Ihnen ist meine ewige Liebe, Treue und Dankbarkeit sicher und so groß, daß ich zu viele Seiten füllen müßte um alles aufzuzählen.

## 5.2. Versuchsbeschreibungen

### 5.2.1. Versuch 1 : 4-Methylbenzylbromid

In einem 500 ml Zweihalskolben werden 21.2g (0.2 mol) p-Xylol, 35.6g (0.2 mol) N-Bromsuccinimid und eine Spatelspitze Benzoylperoxid unter gutem Rühren in 300 ml



trockenem Tetrachlormethan suspendiert und zum Sieden erhitzt. Sobald die Reaktion abgeklungen ist und das entstandene Succinimid im Kolben zu Boden fällt, läßt man den Ansatz abkühlen und über Nacht zur vollständigen Kristallisation des Succinimids stehen. Der Feststoff wird abgesaugt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wird das Produkt fraktionierend destilliert.

Ausbeute: 29.9g (82 % der Theorie)

[Lit.[86]: 69.9%]

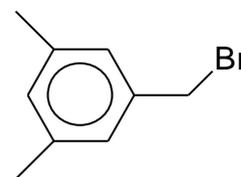
Siedepunkt: 110°C / 14mm

[Lit.[86]: 106°C / 12mm]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [86] überein.

### 5.2.2. Versuch 2 : 3,5-Dimethylbenzylbromid

In einem 500 ml Zweihalskolben werden 24g (0.2 mol) Mesitylen, 35.6g (0.2 mol) N-Bromsuccinimid und eine Spatelspitze Benzoylperoxid unter gutem Rühren in 300ml trockenem Tetrachlormethan suspendiert und zum Sieden erhitzt.



Sobald die Reaktion abgeklungen ist und das entstandene Succinimid im Kolben zu Boden fällt, läßt man den Ansatz abkühlen und über Nacht zur vollständigen Kristallisation des Succinimids stehen. Der Feststoff wird abgesaugt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wird das Produkt fraktionierend destilliert.

Ausbeute: 25.2 g (64% der Theorie)

[Lit.[87]: 53%]

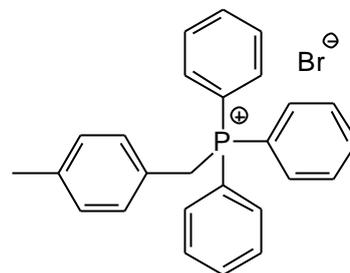
Siedepunkt: 102°C / 9mm

[Lit.[87]: 100-103 C / 8-10mm]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [87] überein.

**5.2.3. Versuch 3 : 4-Methylbenzyltriphenylphosphoniumbromid**

20.2g (0.11 mol) 4-Methylbenzylbromid und 36.7g Triphenylphosphin (0.14 mol) werden in 150 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man läßt über Nacht abkühlen, saugt das ausgefallene Produkt ab, wäscht mit Dimethylformamid nach und trocknet es im Ölpumpenvakuum.



Ausbeute: 45.2 g (92% der Theorie)

[Lit.[88]: 98%]

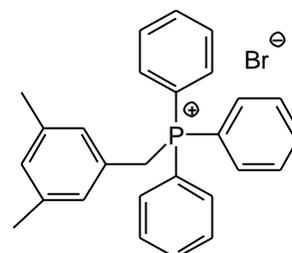
Schmelzpunkt: 276-278°C

[Lit.[88]: 256-258°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [88] überein.

**5.2.4. Versuch 4 : (3,5-Dimethylbenzyl)-triphenylphosphoniumbromid**

19.8g (0.1 mol) 3,5-Dimethylbenzylbromid und 36.7g Triphenylphosphin (0.14 mol) werden in 300 ml absolutem Toluol gelöst und 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man läßt über Nacht abkühlen, saugt das ausgefallene Produkt ab, wäscht mit Toluol nach und trocknet es im Ölpumpenvakuum.



Ausbeute: 43.8 g (95% der Theorie)

[Lit.[89]: 93%]

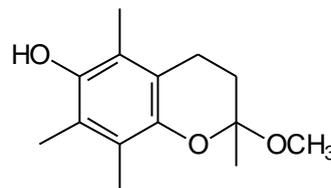
Schmelzpunkt: 324-328°C

[Lit.[89]: 325-330°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [89] überein.

**5.2.5. Versuch 5: 2-Methoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-ol**

In einem 2l Dreihalskolben mit Innenthermometer, Rückflußkühler, Tropftrichter und Schutzgaszuleitung werden unter Argonatmosphäre 152g (1.0 mol) Trimethylhydrochinon und 150 ml Orthoameisensäuremethylester bei 0-5°C (Eis/Kochsalzbad) unter starkem



Rühren in 600 ml abs. Methanol gelöst. Anschließend werden 2 ml konz. Schwefelsäure hinzugegeben. Danach werden 120 ml (2.0 mol) Methylvinylketon so langsam hinzuge tropft, daß die Innentemperatur 10°C nicht überschreitet.

Nach ca. 30-60 min beginnt das Produkt als gelb-beiger Feststoff auszufallen. Man rührt noch 48-72h bei Raumtemperatur (GC-Kontrolle). Anschließend kühlt man das Reaktionsgemisch auf 5-10°C herunter und saugt das Präzipitat ab, wäscht es mehrmals mit kleinen Mengen auf 0°C vorgekühltem Methanol und trocknet das Produkt an der Ölpumpe bei 30-40°C Wasserbadtemperatur.

Ausbeute: 193.4 g (82% der Theorie)

[Lit. [35]:104% (sic!)]

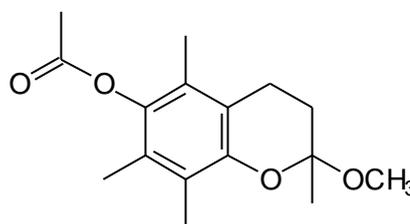
Schmelzpunkt: 124-126°C

[Lit. [35]:125-126°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [35] überein.

**5.2.6. Versuch 6: 6-Acetoxy-2-methoxy-2,5,7,8-teramethyl-chromen**

94.4g (0.4 mol) **38** werden unter Argonatmosphäre in 120 ml Pyridin gelöst und mit 180 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 60-120 min ist das Edukt vollständig umgesetzt. (GC-Kontrolle). Anschließend wird der Reaktionsansatz auf 2l Eis gegossen und 3-5h bei Raumtemperatur gerührt.



a) Gewöhnlich fällt das Produkt als kolloidaler Niederschlag aus. Das Präzipitat wird abgesaugt und die wäßrige Lösung noch 3 mal mit 200 ml Methylenchlorid extrahiert. Die Produktfraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel am

Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Feststoff wird mehrmals mit Eiswasser gewaschen und anschließend an der Ölpumpe bei ca. 30-40°C Wasserbadtemperatur getrocknet.

b) Fällt das Produkt nicht aus, so wird die wäßrige Phase 5 mal mit 400 ml Methylenchlorid extrahiert. (Aufarbeitung erfolgt dann äquivalent zu a)

Ausbeute 110.9g (92% der Theorie)

[Lit. [35]:103% (sic!)]

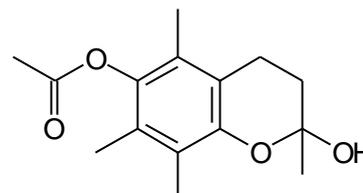
Schmelzpunkt 70-72°C

[Lit.[35]: 71-72.5°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [35] überein.

### **5.2.7. Versuch 7: 6-Acetoxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-ol**

55.6g (0.2 mol) des Acetals **39** werden in 200 ml Wasser, 250 ml Aceton und 2 ml konz. Salzsäure suspendiert. Von dieser Reaktionslösung destilliert man nun so lange das Lösungsmittel ab bis die Übergangstemperatur 95° C überschreitet.



Man kühlt die Lösung unter starkem Rühren mit einem Eisbad ab und gibt währenddessen 100 ml Aceton mittels eines Tropftrichters zu. Innerhalb von 2-3h kristallisiert das Produkt als weiße Kristalle. Die Lösung wird über nach weiter gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit einer 10%igen Lösung von Aceton in Wasser gewaschen und anschließend an der Ölpumpe bei 50-60°C Wasserbadtemperatur getrocknet.

Ausbeute : 45.5g (86% der Theorie)

[Lit. [35]:90%]

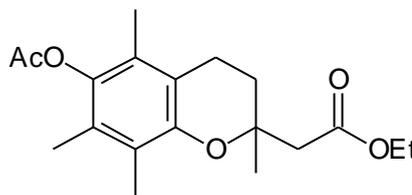
Schmelzpunkt: 125°C

[Lit. [35]: 124-126°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [35] überein.

### **5.2.8. Versuch 8: (6-Acetoxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman-2-yl)-Essigsäureethylester**

Zu einer Suspension von 9.2g 60%igem Natriumhydrid (0.23 mol) in 300 ml abs. Tetrahydrofuran werden unter Argonatmosphäre 50.0 g (0.22 mol) Phosphonoessigsäuretriethylester



langsam zu getropft. Anschließend wird die Mischung 60 min unter Rückfluß gekocht. Danach werden 26.4g (0.10 mol) des Hemiacetals **40** in kleinen Portionen hinzugegeben. Dieses Gemisch wird 18h bei Raumtemperatur gerührt und dann noch einmal 4h lang unter Rückfluß gekocht.

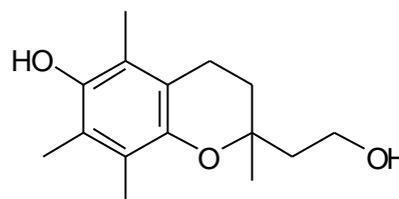
Die Lösung wird mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und anschließend mit Wasser gründlich gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels fällt das gewünschte Zwischenprodukt als braunes Öl an.

Auf Isolierung und Charakterisierung des Zwischenproduktes wurde verzichtet.

Die Rohausbeute beträgt 29.8 g

### **5.2.9. Versuch 9: (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman-2-yl)-Ethanol**

In einem 500 ml Dreihalskolben werden 17.1g (0.45 mol) Lithiumaluminiumhydrid in 250ml abs. Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre suspendiert. Dann werden 29.8g **42** (ca. 0.09 Mol, da Rohprodukt), gelöst in 150ml abs. Tetrahydrofuran innerhalb von 90 min hinzugegetropft. Anschließend wird die Lösung 24h refluxiert.



Der Ansatz wird vorsichtig auf Eis gegossen und mit 20%iger Salzsäure neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer nimmt man den Rückstand mit Diethylether auf. Aus dieser etherischen Lösung kristallisiert der Alkohol **43** als weißer

Niederschlag aus. Man saugt den Niederschlag ab und trocknet anschließend das Produkt im Vakuum.

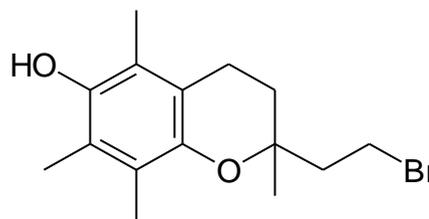
Ausbeute : 19.7g (79% der Theorie) über 2 Stufen [Lit. [33]: 53.9%]

Schmelzpunkt 133-135°C [Lit. [33]: 131-133°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [33] überein.

### **5.2.10 Versuch 10: 2-(2-Bromethyl)-3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-6-ol**

13.6g (0.05 mol) Triphenylphosphin werden unter Stickstoffatmosphäre in 100 ml abs. Dichlormethan gelöst. Anschließend werden 8g Brom (0.05mol) langsam zugetropft. Man läßt 30 min nachrühren und gibt dann 12.5g (0.05 mol)



**43**, suspendiert in 50 ml abs. Dichlormethan, hinzu. Der Reaktionsansatz wird danach 5 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Nach dem Abkühlen wird die Lösung zweimal mit 2n Natriumcarbonatlösung und einmal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittel erhält man ein Öl, aus welchem nach Umkristallisation aus Methanol nach 5 Stunden im Kühlschrank das gewünschte Produkt ausfällt.

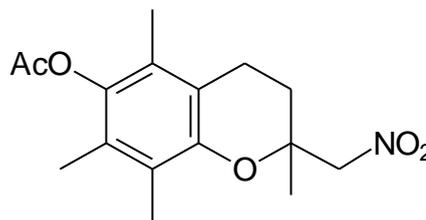
Ausbeute : 8.2g (59% der Theorie) [Lit. [36]:55-70%]

Schmelzpunkt 120°C [Lit. [36]: 120°C]

Die physikalischen Daten stimmen mit der Literatur [36] überein.

### 5.2.11. Versuch 11: (6-Acetoxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman2-yl)-Nitromethan

26.4g **40** (0.1 mol) werden in 300 ml Nitromethan gelöst. Dazu gibt man 8.4g Piperidin (0.1 mol) und kocht die Lösung so lange unter Rückfluß, bis bei der Reaktionskontrolle mittels GC kein Edukt mehr detektierbar ist (18-48h).



Sollte nach 15 h der Umsatz unter 10% liegen werden weitere 8.4g Piperidin hinzugegeben. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das entstandene Öl auf 500 ml Wasser gegeben, mit 300 ml Diethylether versetzt und die organische Phase nach 1 Stunde Rühren abgetrennt. Die wäßrige Phase wird noch dreimal mit jeweils 100 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels fällt das Produkt in Form von beigen Kristallen an, die aus n-Hexan / Essigsäureethylester umkristallisiert werden.

$C_{16}H_{21}NO_5$  (M=307.34 g/mol)

**Ausbeute:** 23.9g (78% der Theorie)

**Schmp.:** 125 °C

$^1H$ -NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

$\delta$  [ppm] = **1.49** (s, 3 H, O-C-CH<sub>3</sub>), **1.90-2.14** (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), **1.99** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.04** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.08** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.32** (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C=O), **2.68** (t, 2 H, J= 6.3Hz ,Ar-CH<sub>2</sub>), **4.54** (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>)

**IR (KBr):**

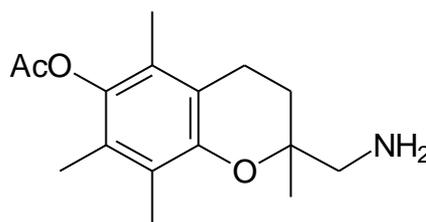
$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = **2935** (C-H), **1746** (C=O), **1551** (C-NO<sub>2</sub>), **1216** (C-O)

**MS (70eV):**

$m/z$  (%) = **307** [M<sup>+</sup>] (17), **265** (100), **191** (29), **164** (31), **135** (11), **121** (11), **91** (11), **55** (13), **43** (73)

### 5.2.12. Versuch 12: (6-Acetoxy-2,5,7,8-Tetramethyl-Chroman2-yl)-Aminomethan

6.2g (0.02 mol) **45** werden in einem Gemisch aus 100ml Methanol und 300 ml Essigsäureethylester gelöst und nach Zugabe von 3g Palladium auf Kohlenstoff bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck bis zu



einer Wasserstoffaufnahme von 1.4 l hydriert. Anschließend filtriert man vom Katalysator ab. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels erhält man das Produkt als weißen Feststoff.

$C_{16}H_{23}NO_3$  (M=277.35 g/mol)

**Ausbeute:** 5.3g (96.5% der Theorie)

**Schmp.:** 62 °C

$^1H$ -NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

d [ppm] = **1.16** (s, 3 H, O-C-CH<sub>3</sub>), **1.62-1.85** (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), **1.91** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **1.94** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **1.95** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.26** (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C=O), **2.55-2.64** (m, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>), **2.78** (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)

**IR (KBr):**

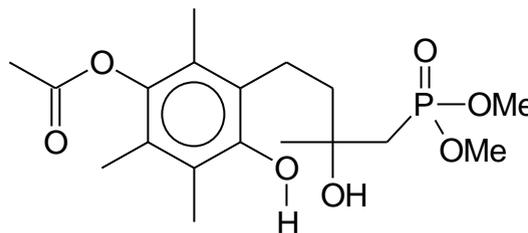
$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = **3388** (N-H), **2930** (C-H), **1753** (C=O), **1212** (C-O)

**MS (70eV):**

m/z (%) = **277** [M<sup>+</sup>] (16), **247** (53), **205** (55), **189** (10), **86** (25), **70** (71), **43** (60)

### 5.2.13. Versuch 13: Essigsäure-3-[4-(dimethoxy-phosphoryl)-3-hydroxy-3-methyl-butyl]-4-hydroxy-2,5,6-trimethyl-phenylester

Unter Argonatmosphäre werden (0.21 mol) Methanphosphonsäuredimethylester langsam zu einer Suspension von 8.8g (0.22 mol) 60%igen Natriumhydrid in Mineralöl in 300 ml Tetrahydrofuran unter



Eiskühlung langsam zugetropft. Nach dem Abklingen der Reaktion wird der Ansatz noch eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Anschließend gibt man portionsweise 26.4g (0.1 mol) **40** hinzu und refluxiert 24h.

Nach dem Abkühlen wird der Ansatz vorsichtig auf Eis gegossen und mit 20%iger Salzsäure neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer nimmt man den Rückstand mit Dichlormethan auf.

Die Reinigung erfolgt über Säulenchromatographie (Hexan: Essigester 3:1)

**C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>PO<sub>7</sub>** (M=388.42 g/mol)  
**Ausbeute:** 21 g (54% der Theorie)  
**Schmp.:** 143-145°C  
**R<sub>f</sub> : 0.6**

**<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

d [ppm] = **1.44** (s, 3 H, HO-C-CH<sub>3</sub>), **1.74-1.95** (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), **2.01-2.28** (m, 2H, CH<sub>2</sub>-P), **2.06** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.08** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.21** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.36**(s, 3H, CH<sub>3</sub>-C=O), **2.68-2.89** (m, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>), **3.76-3.84** (2d, 6H, J=11Hz, O=P-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), **3.87** (s, 1H, HO-C-CH<sub>3</sub>), **7.63** (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR<sub>75</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

d [ppm] = **20.50** (CH<sub>3</sub>-C=O), **21.70** (Ar-CH<sub>2</sub>), **28.82** (CH<sub>3</sub>-C-COH), **36.4** (CH<sub>2</sub>-P), **41.82** (Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), **52.5** (O=P-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), **70.72** (CH<sub>3</sub>-C-OH), **122.46** (C<sub>5</sub>, arom.), **124.26** (C<sub>3</sub>, arom.), **124.99** (C<sub>2</sub>, arom.), **126.81** (C<sub>6</sub>, arom.), **141.08** (C<sub>1</sub>, arom.), **150.41** (C<sub>4</sub>, arom.), **169.73** (CH<sub>3</sub>-C=O)

$^{31}\text{P}$ -NMR<sub>200</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

$\delta$  [ppm] = 28.35

IR (KBr):

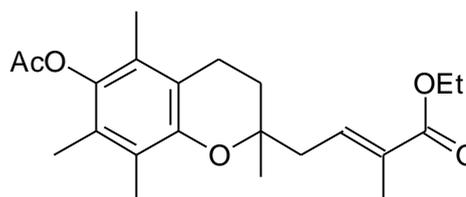
$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3515 (O-H), 3268 (O-H), 2969 (C-H), 1751 (C=O), 1460, 1372, 1213

MS (70eV):

$m/z$  (%) = 388 [M<sup>+</sup>] (18), 370 (8), 328 (100), 203 (34), 165 (30), 124 (11), 43 (12)

#### 5.2.14. Versuch 14: 4-(6-acetoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)-2-methyl-but-2-ensäureethylester

Zu einer Suspension von 6.0g 80%igem Natriumhydrid (0.2 mol) in 400 ml abs. Tetrahydrofuran werden unter Argonatmosphäre 52.8 g (0.2 mol) C<sub>5</sub>-Esterphosphonat 52 langsam



zu getropft. Anschließend wird die Mischung 60 min unter Rückfluß gekocht. Danach werden 26.4 g (0.1 mol) des Hemiacetals 40 in kleinen Portionen hinzugegeben. Dieses Gemisch wird 18h bei Raumtemperatur gerührt und dann noch einmal 4 h lang unter Rückfluß gekocht.

Die Lösung wird mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und anschließend mit Wasser gründlich gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels fällt das gewünschte Zwischenprodukt als braunes Öl an, welches mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: reines Methylenchlorid) gereinigt wird.

**C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>** (M=374.47 g/mol)

**Ausbeute:** 16.1g (43 % der Theorie)

**Schmp.:** 56 °C

**R<sub>f</sub> : 0.4**

$^1\text{H-NMR}_{300}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta$  [ppm] = **1.28** (s, 3 H, O-C- $\underline{\text{CH}}_3$ ), **1.28-1.32** (t, 3H,  $J=7.1$  Hz, O- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), **1.81-1.95** (s, 3 H, C=C- $\underline{\text{CH}}_3$ ; m, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ ), **1.98** (s, 3 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_3$ ), **2.03** (s, 3 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_3$ ), **2.11** (s, 3 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_3$ ), **2.32** (s, 3H,  $\underline{\text{CH}}_3$ -C=O), **2.49** (d, 2 H,  $J=7.2$  Hz, C=C- $\underline{\text{CH}}_2$ ), **2.62** (t, 2 H,  $J=6.9$  Hz, Ar- $\underline{\text{CH}}_2$ ), **4.20** (q, 2H,  $J=7.1$ , O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\text{CH}_3$ ), **6.91** (t, 1H,  $J=7.2$  Hz,  $\underline{\text{H}}$ -C=C)

IR (KBr):

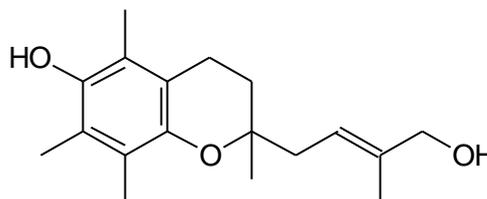
$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = **2975** (C-H), **1755** (C=O), **1703** (C=O), **1224** (C-O)

MS (70eV):

m/z (%) = **374** [ $\text{M}^+$ ] (16), **332** (19), **247**(67), **205** (100), **165** (44), **121** (12), **43** (66)

### 5.2.15. Versuch 15: 2-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-2,5,7,8-tetra-methyl-chroman-6-ol

In einem 500ml Dreihalskolben werden 3.8g (0.1 mol) Lithiumaluminiumhydrid in 250ml abs. Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre suspendiert. Dann werden 7.5g **53** (0.02 mol), gelöst in 150 ml abs. Tetrahydrofuran innerhalb



von 90 min hinzuge tropft. Anschließend wird die Lösung 24h refluxiert.

Der Ansatz wird vorsichtig auf Eis gegossen und mit 20%iger Salzsäure neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bleibt das Produkt als schwarzbraunes Öl zurück. Umkristallisieren dieser Verbindung aus Hexan/Essigsäureethylester resultiert in weiß-beigen Kristallen. Alternativ ist auch säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Methylenchlorid) möglich.

Ausbeute : 4.8g (83%)

$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_5$  (M=290.40 g/mol)

Ausbeute: 5.3g (96.5% der Theorie)

Schmp.: 106-108 °C

R<sub>f</sub>: 0.5

<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS): d [ppm] = **1.21** (s, 3 H, O-C-CH<sub>3</sub>), **1.61** (s, 3 H, C=C-CH<sub>3</sub>), **1.72-1.88** (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), **2.05** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.08** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.12** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **2.31** (t, 2 H, J=6.5 Hz, Ar-CH<sub>2</sub>), **2.58** (t, 2H, J=6.9 Hz, CH<sub>2</sub>-C=C), **3.95** (s, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), **5.57** (t, 1H, J=6.9 Hz, CH<sub>2</sub>-CH=C)

IR (KBr):

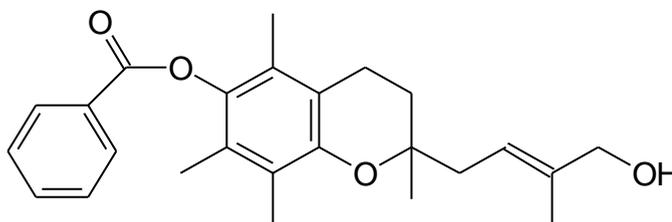
ν [cm<sup>-1</sup>] = **3334** (O-H), **2927** (C-H), **1451** (C=C), **1252** (C-O, etherisch), **1084**

MS (70eV):

m/z (%) = **290** [M<sup>+</sup>] (14), **205** (100), **165** (54), **121** (15), **91** (10), **43** (55)

### 5.2.16. Versuch 16: Benzoessäure-2-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl-ester

In einem 100 ml Zweihalskolben werden unter Argonatmosphäre 5.8g (0.02 mol) **54** in 50 ml abs. Methylenechlorid gelöst. Dann werden unter



Eiskühlung 1.6g abs. Pyridin (0.02 mol), gelöst in 20 ml Methylenechlorid langsam zugetropft. Man läßt 30 Minuten nachrühren und tropft dann 2.5g (0.02 mol) Benzoylchlorid gelöst in 20 ml abs. Methylenechlorid hinzu. Man läßt 2h nachrühren und schüttet den Ansatz auf 200g Eis. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Phase noch dreimal mit 50 ml Methylenechlorid extrahiert.

Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird das Produkt säulenchromatographisch (Ether. Methylenechlorid 50:50) gereinigt.

**C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>** (M=394.508 g/mol)

**Ausbeute:** 4.2g (52 % der Theorie)

Schmp.: 67 °C

R<sub>f</sub>: 0.7

<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ [ppm] = 1.24 (s, 3 H, O-C-CH<sub>3</sub>), 1.73 (s, 3 H, C=C-CH<sub>3</sub>), 1.78-1.87 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.09 (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.15 (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.32-2.43 (m, 2 H, C-CH<sub>2</sub>-C=C), 2.62 (t, 2 H, J= 6.7 Hz, Ar-CH<sub>2</sub>), 4.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-OH) 5.73 (t, 1H, J= 6.5 Hz, CH=C), 7.40-8.08 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)

IR (KBr):

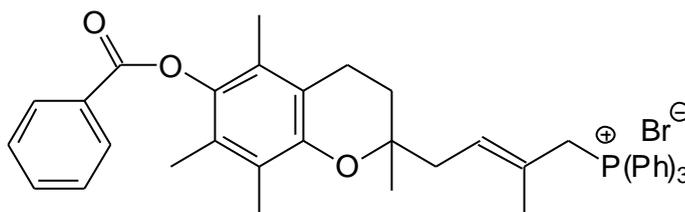
ν [cm<sup>-1</sup>] = 3501 (O-H), 3037 (C-H, arom.), 2973 (C-H), 2928 (C-H), 1715 (C=O), 1452 (C=C), 1273 (C-O, etherisch)

MS (70eV):

m/z (%) = 394[M<sup>+</sup>] (49), 271 (8), 205 (100), 165 (27), 136 (18), 105 (49), 77 (39), 51 (10)

### 5.2.17. Versuch 17: [4-(6-acetoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)-2-methyl-but-2-enyl]triphenylphosphoniumbromid

3.2g **56** (8 mmol) werden in 50 ml Methylenchlorid gelöst, mit 5.5g Triphenylphosphoniumhydrobromid (16 mmol) versetzt und 48 Stunden refluxiert. Anschließend wird das



Lösungsmittel am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingengt und das entstandene Phosphoniumsalz in 500 ml Diethylether durch langsames Zutropfen ausgefällt. Das weiße Salz wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

C<sub>43</sub>H<sub>44</sub>PO<sub>3</sub>Br (M=719.72 g/mol)

Ausbeute: 3.1 g (61% der Theorie)

Schmp.: 228 °C

$^1\text{H-NMR}_{300}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta$  [ppm] = 1.12 (s, 3 H, O-C- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.61 (s, 3 H, C=C- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.52-1.58 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ ), 1.93 (s, 3 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 2.02 (s, 3 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 2.06 (s, 3 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 2.11-2.29 (m, 2 H,  $\underline{\text{CH}}_2$ -C=C), 2.45-2.55 (m, 2 H, Ar- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 4.54-4.69 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2$ -P), 5.56-5.61 (m, 1H,  $\underline{\text{CH}}=\text{C}$ ), 7.43-8.95 (m, 20H, arom. Protonen)

$^{31}\text{P-NMR}_{200}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

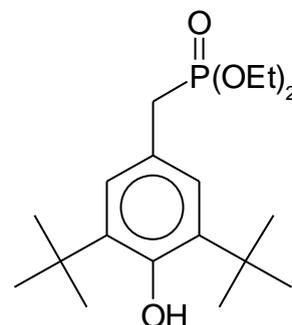
$\delta$  [ppm] = 22.45

MS (70eV):

$m/z$  (%) = 639 [ $\text{M}^+ - \text{Br}^-$ ] (100), 371 (11), 329 (13), 307 (21), 289 (15), 262 (18)

### 5.2.18. Versuch 18: (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-benzyl)-Phosphon-säurediethylester

22g BHT (0.1 mol) werden in 500 ml abs. Tetrachlormethan gelöst und mit 17.7g (0.1mol) N-Bromsuccinimid versetzt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Benzoylperoxid unter Bestrahlung mit einer UV-Lampe wird die Suspension unter gutem Rühren bis zum Abklingen der Reaktion refluxiert. Man filtriert das entstandene Succinimid ab, wäscht die organische Phase noch zweimal mit Wasser nach und zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab.



Zu dem entstandenen Öl werden vorsichtig (!) 16.6g (0.1 mol) Triethylphosphit hinzuge tropft. Die Reaktion verläuft sehr heftig und das gewünschte Produkt bleibt als gelb/weißer Feststoff übrig und wird aus Hexan/Essigester umkristallisiert.

Ausbeute : 28.7g (80.6%) über 2 Stufen

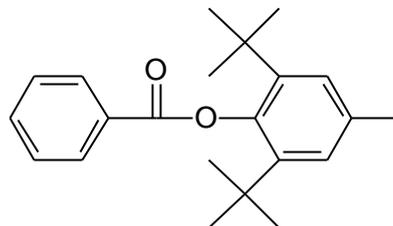
Schmelzpunkt 122°C

[Lit. [90]: 122°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [90] überein.

### **5.2.19. Versuch 19: Benzoessäure-(2,6-di-tert.-butyl-4-methyl-phenyl)-ester**

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Rückflußkühler, Begasungshahn und Blasenähler werden unter Argonatmosphäre 8g (0.20 mol) Natriumhydrid in 250 ml abs. Tetrahydrofuran suspendiert. Anschließend werden 44g (0.2 mol)



2,5-Di-tert.-butyl-4-methyl-Phenol gelöst in 150 ml

abs. Tetrahydrofuran innerhalb von 60 min hinzuge tropft. Die Lösung wird dann so lange refluxiert bis im Blasenähler keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird (ca. 3h). Nun tropft man 35g (0.25 mol) Benzoessäurechlorid innerhalb von 30 min hinzu und rührt noch 12h bei Raumtemperatur nach

Man gibt 3 ml dest. Wasser hinzu und wartet bis der entstehende Niederschlag sich vollständig abgesetzt hat. Der Reaktionsansatz wird filtriert und mit gesättigter Ammoniumchloridlösung neutralisiert und anschließend mit dest. Wasser mehrmals gründlich gewaschen.

Nach Entfernung des größten Teils des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird die Lösung in 600 ml Ethanol gegossen. Innerhalb von 12h fällt das Produkt als weiße Kristalle aus, wird abfiltriert, mehrmals mit Ethanol nachgewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute : 51.2 g (79%)

[Lit. [91]:72%]

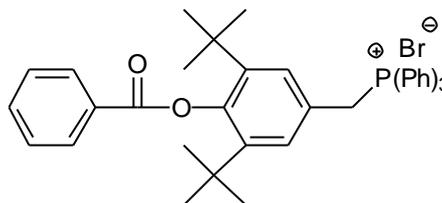
Schmelzpunkt 173-174°C

[Lit. [91]: 171.5-172.5°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [91] überein.

### 5.2.20. Versuch 20: (4-Benzoyloxy-3,5-di-tert.-butyl-benzyl)-Triphenylphosphoniumbromid

In einem 500ml Einhalskolben mit Rückflußkühler und Blasenähler werden 32.4g (0.1 mol) **63** in 300 ml Tetrachlormethan gelöst und mit 18g N-Bromsuccinimid versetzt und zum Sieden erhitzt.



Damit die Reaktion einsetzt ist es nötig eine Spatelspitze Dibenzoylperoxid hinzuzugeben und die Reaktionslösung mit einer UV-Lampe zu bestrahlen. Wenn die Reaktion beendet ist, filtriert man das oben schwimmende Succinimid ab und wäscht die organische Phase mehrmals gründlich mit dest. Wasser. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels bleibt das Produkt als rotes Öl zurück.

Das Rohprodukt wird unter Argonatmosphäre in 150 ml abs. Methylenchlorid gelöst. Zu dieser Lösung werden 34.1g Triphenylphosphin (0.1 mol) portionsweise hinzugegeben. Anschließend wird noch 5h nachgerührt.

Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer fast vollständig entfernt und die restliche Lösung vorsichtig in 500 ml Diethylether eingetrofft. Das Produkt fällt als weißer Feststoff aus.

**C<sub>40</sub>H<sub>42</sub>PO<sub>2</sub>Br** (M= 665.667 g/mol)

**Ausbeute:** 60.0 g (90% der Theorie)

**Schmp.:** > 320°C

**<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

d [ppm] = **1.08** (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **5.27-5.34** (d, 2H, J= 13.6 Hz, CH<sub>2</sub>-P), **7.57-8.23** (m, 17H, arom. H)

**<sup>31</sup>P-NMR<sub>200</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

d [ppm] = s, **24.97**

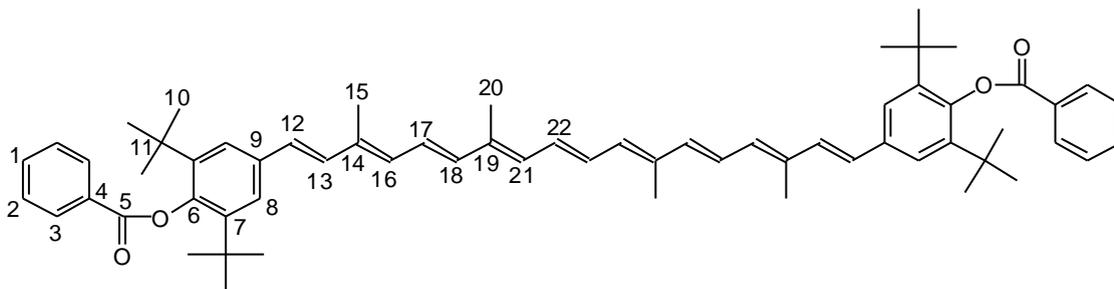
**IR (KBr):**

$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = **3056** (C-H, arom.), **2962** (C-H), **1734** (C=O), **1437**, **1263** (C-O), **1112**

MS (70eV):

$m/z$  (%) = 585 [ $M^+ - Br^-$ ] (100), 262 (17), 183 (10), 105 (75), 77 (17)

**5.2.21. Versuch 21: 1,18-Bis-(4'-Benzyloxy-3',5'-di-tert.-Butyl)-3,7,12,16-tetra-methyl-nona-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanen**



13.2 g (20 mmol) **64** werden in 100 ml abs. Methanol gelöst. Anschließend tropft man 1.1 g (20 mol) Natriummethanolat, gelöst in 50 ml abs. Methanol hinzu. Man rührt eine Stunde nach und gibt portionsweise 1.5g (5 mmol) Crocetindialdehyd **29** hinzu. Die Lösung wird nun 24-48h Stunden refluxiert (HPLC-Kontrolle).

Der Ansatz wird auf Eiswasser gegossen, mit ges. Ammoniumchloridlösung neutralisiert, mit Methylenchlorid extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bleibt ein rotes Öl über, welches durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: reines Methylenchlorid) gereinigt wird.

Die oben verwendete Numerierung entspricht nicht der aus der systematischen Nomenklatur. Die Zahlen sind nur als Orientierungshilfe für die Zuordnung der NMR-Signale gedacht. Aufgrund der Symmetrie des Moleküls ist nur eine Hälfte beziffert. Die Nummern der symmetrieäquivalenten Atome der anderen Hälfte werden bei der Auswertung durch einen hochgestellten Strich gekennzeichnet.

$C_{64}H_{76}O_4$  (M=909.30 g/mol)

Ausbeute: 3.3 g (73 % der Theorie)

Schmp.: 123-125°C

$R_f$ : 1.0

**$^1\text{H-NMR}_{300}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**

$\delta$  [ppm] = **1.35** (s, 36 H, 10-H, 10'-H), **2.07** (s, 6H, 15-H, 15'-H), **2.16** (s, 6H, 20-H, 20'-H), **6.31-6.67** (m, 12H, 13-H, 13'-H, 16-H, 16'-H, 17-H, 17'-H, 18-H, 18'-H, 21-H, 21'-H, 22-H, 22'-H) [davon: 6.61 (d, 2H,  $J=15.9$  Hz, 13-H, 13'-H)], **6.86** (d, 2H,  $J=15.9$  Hz, 12-H, 12'-H), **7.42** (s, 4H, 2\*(8-H, 8'-H)), **7.54** (m, 4H, 2\*(2-H, 2'-H)), **7.65** (m, 2H, 1-H, 1'-H), **8.24** (m, 4H, 3-H, 3'-H)

 **$^{13}\text{C-NMR}_{75}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**

$\delta$  [ppm] = **12.81** (15-C, 15'-C), **12.96** (20-C, 20'-C), **31.51** (10-C, 10'-C), **35.45** (11-C, 11'-C), **124.36** (8-C, 8'-C), **127.75** (13-C, 13'-C), **128.80** (2-C, 2'-C), **130.23** (17-C, 17'-C), **130.35** (3-C, 3'-C), **130.44** (4-C, 4'-C), **132.86** (16-C, 16'-C), **133.17** (12-C, 12'-C), **133.44** (1-C, 1'-C), **134.74** (9-C, 9'-C), **135.63** (14-C, 14'-C), **136.56** (19-C, 19'-C), **142.88** (7-C, 7'-C), **147.61** (6-C, 6'-C), **166.71** (5-C, 5'-C) [nicht eindeutig zuordbare, zum Molekül gehörige Signale, bei **125.05**, **132.98**, **128.03** (18-C, 18'-C, 21-C, 21'-C, 22-C, 22'-C)]

**IR (KBr):**

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = **3030** (C-H, arom.), **2963** (C-H), **1740** (C=O), **1262** (C-O), **1187**, **708**

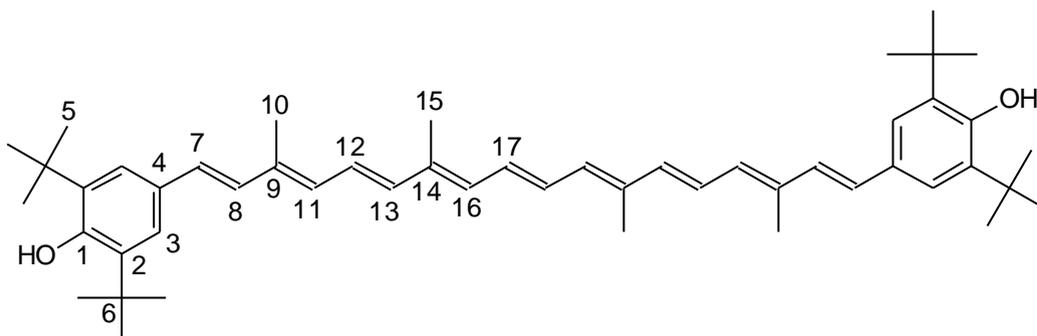
**MS (70eV):**

$m/z$  (%) = **909** [ $\text{M}^+$ ] (5), **803** (5), **315** (3), **106** (7), **105** (100), **77** (6), **57** (6)

**Uv/Vis ( $\text{CHCl}_3$ ):**

$\lambda_{\text{max}}$  [nm] (lg e): **460** sh, **483** (5.04), **516** sh

**5.2.22. Versuch 22: 1,18-Bis-(4'-Hydroxy-3',5'-di-tert.-Butyl)-3,7,12,16-tetra-methyl-nona-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanen**



0.9 g (1 mmol) **65** werden unter Argonatmosphäre in 50ml abs. Methylenchlorid in einem mit Septum verschlossenen Kolben gelöst. Nun werden 10 ml (16 mmol) einer 1.6M Lösung DIBAL mittels einer Spritze in den Kolben gegeben. Man rührt so lange bis mittels HPLC-Kontrolle kein Edukt mehr zu detektieren ist.

Das Reaktionsgemisch wird auf Eiswasser gegossen und vorsichtig mit verd. Ammoniumchloridlösung neutralisiert. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer sofort durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: reines Methylenchlorid) gereinigt.

**Die oben verwendete Numerierung entspricht nicht der aus der systematischen Nomenklatur. Die Zahlen sind nur als Orientierungshilfe für die Zuordnung der NMR-Signale gedacht. Aufgrund der Symmetrie des Moleküls ist nur eine Hälfte beziffert. Die Nummern der symmetrieäquivalenten Atome der anderen Hälfte werden bei der Auswertung durch einen hochgestellten Strich gekennzeichnet.**

$C_{50}H_{68}O_2$  (M=701.09 g/mol)

**Ausbeute:** 547 mg (78 % der Theorie)

**Schmp.:** >95 °C Zersetzung

**R<sub>f</sub> :** 1.0

**$^1\text{H-NMR}_{300}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**

$\delta$  [ppm] = **1.46** (s, 36 H, 5-H, 5'-H), **1.99** (s, 6H, 10-H, 10'-H), **2.04** (s, 6H, 15-H, 15'-H), **6.27-6.69** (m, 12H, 8-H, 8'-H, 11-H, 11'-H, 12-H, 12'-H, 13-H, 13'-H, 16-H, 16'-H, 17-H, 17'-H) [davon: 6.56 (d, 2H,  $J=15.9$  Hz, 8-H, 8'-H)], **6.75** (d, 2H,  $J=15.9$  Hz, 7-H, 7'-H), **7.27** (s, 4H, 2\*(3-H, 3'-H)),

 **$^{13}\text{C-NMR}_{75}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**

$\delta$  [ppm] = **12.83** (10-C, 10'-C), **12.97** (15-C, 15'-C), **30.30** (5-C, 5'-C), **35.27** (6-C, 6'-C), **123.20** (3-C, 3'-C), **128.41** (8-C, 8'-C), **131.00** (7-C, 7'-C), **131.81** (11-C, 11'-C), **132.70** (12-C, 12'-C), **134.40** (4-C, 4'-C), **135.98** (9-C, 9'-C), **136.13** (14-C, 14'-C), **136.558** (2-C, 2'-C), **153.69** (1-C, 1'-C) [nicht eindeutig zuordbare, zum Molekül gehörige Signale, bei **125.20**, **129.71**, **137.44.03** (13-C, 13'-C, 16-C, 16'-C, 17-C, 17'-C)]

**IR (KBr):**

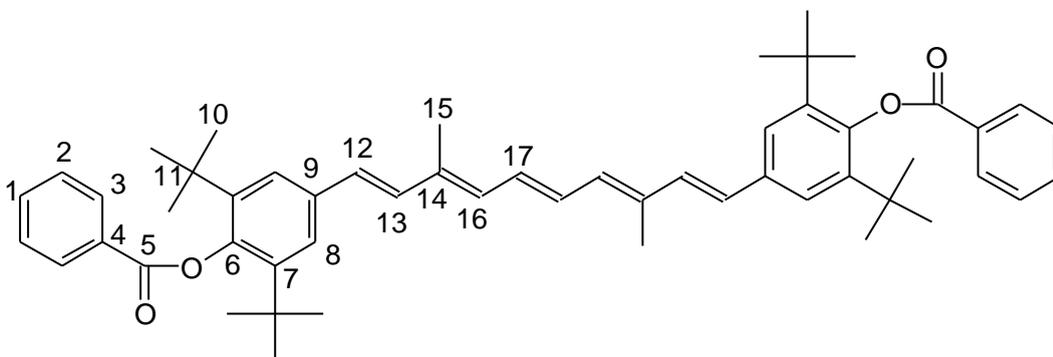
$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = **3637** u. **3441** (O-H), **3027** (C-H, arom.), **2956** (C-H), **2915** (C-H), **1630**, **1438**, **1233** (C-O), **964**

**MS (70eV): war nicht zu erhalten !!**

**Uv/Vis ( $\text{CHCl}_3$ ):**

$\lambda_{\text{max}}$  [nm] ( $\lg \epsilon$ ): **462** sh, **489** (5.06), **523** sh

**5.2.23. Versuch 23: 1,10-Bis-(4'-Benzyloxy-3',5'-di-tert.-Butyl)-3,8-dimethyl-penta-1,3,5,7,9-decanen**



Durchführung und Aufarbeitung : analog Versuch 21

Die oben verwendete Numerierung entspricht nicht der aus der systematischen Nomenklatur. Die Zahlen sind nur als Orientierungshilfe für die Zuordnung der NMR-Signale gedacht. Aufgrund der Symmetrie des Moleküls ist nur eine Hälfte beziffert. Die Nummern der symmetrieäquivalenten Atome der anderen Hälfte werden bei der Auswertung durch einen hochgestellten Strich gekennzeichnet.

$C_{64}H_{76}O_4$  (M=777.10 g/mol)

Ausbeute: 3.3 g (85 % der Theorie)

Schmp.: 138-140°C

$R_f$ : 1.0

$^1H$ -NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

d [ppm] = 1.36 (s, 36 H, 10-H, 10'-H), 2.05 (s, 6H, 15-H, 15'-H), 6.40-6.45 (m, 2H, 16-H, 16'-H), 6.62 (d, 2H, J=15.8 Hz, 12-H, 12'-H), 6.71-6.74 (m, 2H, 17-H, 17'-H), 6.86 (d, 2H, J=15.8 Hz, 13-H, 13'-H), 7.44 (s, 4H, 2\*(8-H, 8'-H)), 7.55 (m, 4H, 2\*(2-H, 2'-H)), 7.64 (m, 2H, 1-H, 1'-H), 8.25 (m, 4H, 3-H, 3'-H)

$^{13}C$ -NMR<sub>75</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

d [ppm] = 12.86 (15-C, 15'-C), 31.52 (10-C, 10'-C), 35.48 (11-C, 11'-C), 124.42 (8-C, 8'-C), 128.02 (13-C, 13'-C), 128.82 (2-C, 2'-C), 130.01 (17-C, 17'-C), 130.39 (3-C,

$3\text{-}\underline{\text{C}}$ , **130.46** ( $4\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $4'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **132.68** ( $16\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $16'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **133.12** ( $12\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $12'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **133.47** ( $1\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $1'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **134.71** ( $9\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $9'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **135.97** ( $14\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $14'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **142.89** ( $7\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $7'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), **147.67** ( $6\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $6'\text{-}\underline{\text{C}}$ ), 166.74 ( $5\text{-}\underline{\text{C}}$ ,  $5'\text{-}\underline{\text{C}}$ )

**IR (KBr):**

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = **2964** (C-H), **1741** (C=O), **1262** (C-O), **1187**, **1061**, **709**

**MS (70eV):**

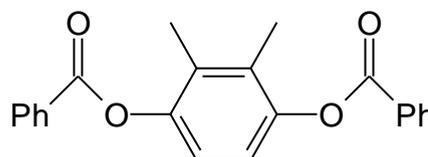
$m/z$  (%) = **777** [ $\text{M}^+$ ] (3), **289** (14), **180** (9), **154** (69), **136** (50), **105** (100), **89** (21), **77** (26), **63** (13), **51** (13)

**Uv/Vis ( $\text{CHCl}_3$ ):**

$\lambda_{\text{max}}$  [nm] (lg e): 390 sh, 416 (4.86), 442 sh

### **5.2.24. Versuch 24: 1,4-Dibenzoyloxy-2,3-Dimethyl-benzol**

13.8g (0.1 mol) 3,4 Dimethylhydrochinon werden in 50 ml abs. Pyridin unter Rühren gelöst. Anschließend werden 12.5g Benzoylchlorid vorsichtig hinzugegeben. Das Produkt fällt nach 2-3 Minuten Reaktionszeit aus. Man löst es in 200 ml Methylenchlorid auf



und wäscht die organische Phase dreimal mit Wasser. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat fällt das Produkt am Rotationsverdampfer als weißer Feststoff aus.

Ausbeute : 32.8g (95%)

[Lit. [92]:78%]

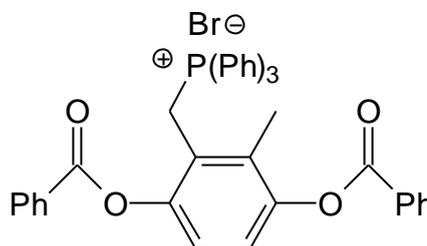
Schmelzpunkt 185°C

[Lit. [92]: 182°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [92] überein.

### 5.2.25 Versuch 25: (3,6-Bis-Benzoyloxy-2-methyl-benzyl)-Triphenylphosphoniumbromid

8.7g (0.025 mol) werden in 300 ml abs. Tetrachlormethan gelöst. Dazu gibt man 4.3g (0.024 mol) N-Bromsuccinimid und eine Spatelspitze Benzoylperoxid. Unter gutem Rühren und Bestrahlung wird der Ansatz unter Rückfluß gekocht bis die Reaktion vollständig ist. Das



entstandene Succinimid wird abgesaugt und die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das rohe Bromid in 100ml abs. Methylenechlorid gelöst und mit 7.9g (0.03 mol) Triphenylphosphin versetzt. Man läßt 24h rühren und engt anschließend das Lösungsmittel auf 20ml ein. Der Rückstand wird dann in 1l Diethylether eingetropf.

Das Produkt fällt dabei als weißer Feststoff aus, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 12.8g (75%)

**C<sub>40</sub>H<sub>32</sub>PO<sub>4</sub>Br** (M=687.59 g/mol)

**Ausbeute:** 11.3g (75% der Theorie)

**Schmp.:** 207°C

**<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

d [ppm] = **1.91** (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), **5.46** (d, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-P), **7.05-8.24** (m, 27H, arom. H)

**<sup>31</sup>P-NMR<sub>200</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

d [ppm] = **21.66** (s)

**IR (KBr):**

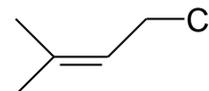
$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = **3057** (C-H, arom.), **1736** (C=O), **1438**, **1264** (C-O), **1063**, **712**

MS (70eV):

m/z (%) = 607 [M<sup>+</sup>-Br<sup>+</sup>] (62), 503 (6), 397 (7), 307 (10), 262 (19), 183 (13), 154 (85), 120 (11), 105 (100), 89 (27), 77 (39), 63 (11)

### 5.2.26. Versuch 26: 1-Chlor-3-Methyl-Buten-2

In einem 500ml Erlenmeyerkolben werden 204g Isopren (3mol), 50 ml Methylenchlorid und 150ml konz. Salzsäure zusammengegeben und 3h bei Raumtemperatur gerührt.



Anschließend trennt man die organisch Phase ab und versetzt diese mit 20g Natriumcarbonat. Das Gemisch wird filtriert und das Filtrat fraktionierend destilliert.

Ausbeute : 244.5g (78% der Theorie)

[Lit. [41]: 65%]

Siedepunkt 112-114°C

[Lit. [41]: 111-113°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [41] überein.

### 5.2.27. Versuch 27: 2,3,3 Trimethyl-butan-2-ol

In einem 1l Dreihalskolben mit Intensivkühler, Tropftrichter und KPG-Rührer werden unter Argonatmosphäre 26.7g (1.1 Mol) Magnesiumspäne mit abs. Ether übergossen. Im Anschluß daran



werden vorsichtig 170g Methyljodid (1.2 mol) so hinzuge tropft, daß die Lösung gelinde siedet. Die Reaktion springt gewöhnlich sofort an. Weiterhin ist es nötig von Zeit zu Zeit das Gemisch während des Zutropfens mit einem Eisbad zu kühlen.

Nach des Zugabe des Methyljodids läßt man noch 30 min nachrühren und tropft anschließend 98 g (1.0 mol) Pinakolon unter Eiskühlung vorsichtig zu der Grignardlösung hinzu. Das Gemisch wird danach noch zwei Stunden refluxiert.

Der Ansatz wird auf Eiswasser gegossen und mit 20%iger Salzsäure neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt; mit Calciumchlorid getrocknet und der Diethylether anschließend vorsichtig am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Produkt fällt als trübe Flüssigkeit an, welche nach kurzer Zeit in gelb-weißen Nadeln kristallisiert..

Ausbeute : 96g (83% der Theorie)

[Lit. [93]:80%]

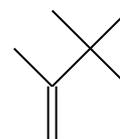
Siedepunkt 130°C

[Lit. [93]:127-129 °C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [93] überein.

### **5.2.28. Versuch 28: 2,3,3-Trimethyl-buten-1**

92.8g **76** (0.8 mol) wird mit dem dreifachen Volumen 85%iger Phosphorsäure versetzt und 60 min refluxiert. Danach wird der Rückflußkühler durch eine Brücke ausgetauscht und solange destilliert bis die Übergangstemperatur über 90°C liegt. Das Destillat wird über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend fraktionierend destilliert.



Ausbeute: 58.3g (59% der Theorie)

[Lit. [41]: 64%]

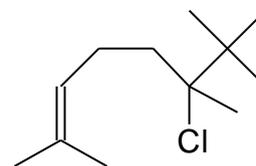
Siedepunkt 77-80°C

[Lit. [41]: 77-80°C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [41] überein.

### **5.2.29. Versuch 29: 6-Chlor-2,6,7,7-tetramethyl-2-octen**

2.1g wasserfreies Zinkchlorid werden in 2.5 ml abs. Diethylether gelöst, auf -78°C gekühlt und mit 45 ml Methylenchlorid verdünnt. Dazu werden nacheinander unter Rühren Lösungen von 9.8g (0.1 mol) **77** und 2.1g (19.9 mmol)



**75** in je 10 ml Methylenchlorid getropft. Nach 24stdg. Stehenlassen bei -78°C wird auf konz. Ammoniak gegossen, die organische Phase zweimal mit wäßrigem Ammoniak gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird das Produkt fraktionierend destilliert.

Ausbeute : 0.5g (12% der Theorie)

[Lit. [41]:66%]

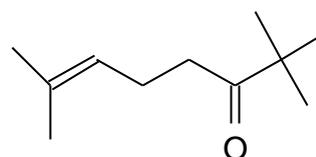
Siedepunkt 58-62°C/0.6 Torr

[Lit. [41]: 55-65°C/0.6 Torr]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [41] überein.

### **5.2.30. Versuch 30: 2,2,7-trimethyl-oct-6-en-3-one**

In einem 500 ml Kolben werden unter Argonatmosphäre 200 ml einer 1.5M Lösung von n-Butyllithium in Hexan vorgelegt und auf -78°C abgekühlt. Danach tropft man 29.4 g (0.3 mol) Pinakolon hinzu. Man rührt 2h nach und



tropft nun 31.3 g (0.3 mol) **75** hinzu. Unter ständigem Rühren läßt man das Gemisch über Nacht auftauen und hydrolysiert vorsichtig mit 3ml dest. Wasser. Die Reaktionslösung wird anschließend mit verd. Ammoniumchloridlösung, dann mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wird mittels fraktionierender Destillation gereinigt.

Ausbeute : 21.6g (43% der Theorie)

[Lit. [94]:48%]

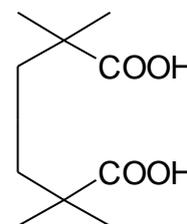
Siedepunkt 91°C/25 torr

[Lit. [94]: 94-95°C / 20 torr]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [94] überein.

### **5.2.31. Versuch 31: a,a,a 'a '-Tetramethyladipinsäure**

In ein 5l Becherglas werden 1.2l Wasser, 15ml konz. Schwefelsäure und 102g (1 mol) Pivalinsäure gegeben. Unter sehr starkem Rühren werden 150 ml einer 6.67 M Wasserstoffperoxidlösung und 750 ml einer 1.33M Eisen(II)-Sulfatlösung [hergestellt aus 278g Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat, 55 ml konz. Schwefelsäure und 575 ml Wasser]



gleichzeitig in äquimolaren Mengen aus zwei kalibrierten Büretten innerhalb von 15 min zutropft, so daß die Reaktionstemperatur während der Reaktion bei 35°C liegt (Eisbad!). Nach der Reaktion wird der Ansatz in einen Kolben mit Destillierbrücke

umgefüllt und 500 ml der Lösung abdestilliert. Nach dem Abkühlen fällt das Rohprodukt über Nacht im Kühlschrank aus. Es wird abgesaugt, in 100 ml konz. Ammoniaklösung gelöst und filtriert. Anschließend wird der Ammoniak abgedampft und nach dem Abkühlen 50 ml konz. Salzsäure hinzugegeben. Das Produkt fällt als weiße Nadeln an, die aus Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute :23.8 g (23% der Theorie)

[Lit. [42]: 37% (Rohausbeute)]

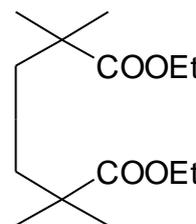
Schmelzpunkt 186-189 °C

[Lit. [42]:188-190 °C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [42] überein.

### **5.2.32. Versuch 32: a,a,a'a'-Tetramethyladipinsäurediethylester**

40.4g (0.2 mol) **88** werden in einem Gemisch aus 600 ml Benzol, 300 ml Ethanol und 10 ml konz. Schwefelsäure so lange am Wasserabscheider erhitzt, bis sich kein Wasser mehr abscheidet. Die Lösung wird mit verdünnter Natriumcarbonatlösung neutralisiert, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Benzol extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und fraktionierend destilliert.



Ausbeute : 41.3g (80.5% der Theorie)

[Lit. [95]: 83.2 %]

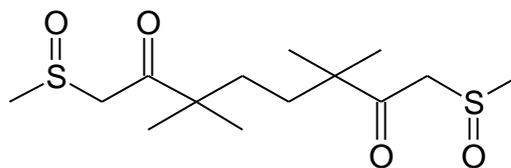
Siedepunkt 97°C / 3 torr

[Lit. [95]: 81-91°C / 1 torr]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [95] überein.

### **5.2.33. Versuch 33: 1,8-Bis-methansulfinyl-3,3,6,6-tetramethyl-octan-2,7-dion**

Zur Entfernung des Parafinöls werden unter Argonatmosphäre 16g (0.4 mol) 60%iges Natriumhydrid mit 300 ml abs. Heptan



übergossen und 30 min bei Raumtemperatur gut gerührt. Man dekantiert das Heptan ab und gibt 250 ml abs. Dimethylsulfoxid hinzu. Die Lösung wird auf 65-70°C erwärmt bis die Gasentwicklung aufhört. Der Reaktionsansatz wird dann mit 250 ml abs. Tetrahydrofuran versetzt und mittels eines Eisbads auf 0-5°C abgekühlt. Nun werden 25.8g (0.1mol) **89** innerhalb von 30 min zugetropft.. Man läßt 1h nachrühren und schüttet die Lösung in 1.5l Wasser. Nach dem Ansäuern auf pH 3-4 und abtrennen der organischen Phase wird die wäßrige Phase fünfmal mit 200 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Dabei fällt das Produkt als gelber Feststoff an. Umkristallisation erfolgt aus Diisopropylether.

**C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** (M=322.4 g/mol)

**Ausbeute:** 18.7g (58% der Theorie)

**Schmp.:** 104-105°C

**<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

**d [ppm] = 1.03-1.06** (4s, 12 H, C-**CH<sub>3</sub>**), **1.23-2.00** (m, 4 H, **CH<sub>2</sub>**-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), **4.00-4.44** (4d, 4H, O=C-**CH<sub>2</sub>**-S=O)

**IR (KBr):**

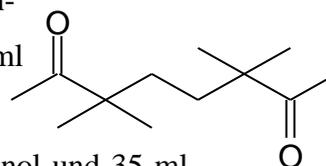
**ν [cm<sup>-1</sup>] = 2973, 2946, 2898** (C-H), **1696** (C=O), **1469, 1261, 1027** (S=O)

**MS (70eV):**

**m/z (%) = 323 [M<sup>+</sup>] (27), 289 (10), 261 (9), 217 (17), 180 (15), 154 (100), 137 (64), 61 (24)**

### **5.2.34. Versuch 34: 3,3,6,6-tetramethyl-octan-2,7-dion**

a) 26.6g 1,8-Bis-methansulfinyl-3,3,6,6-tetramethyl-octan-2,7-dion (0.1 mol) **90** werden in einem Gemisch aus 65 ml abs. Ethanol und 35 ml Eisessig gelöst. Diese Lösung wird



zu einer Suspension von 6.5g Zinkstaub in 65 ml abs. Ethanol und 35 ml

Eisessig langsam zugetropft. Anschließend wird die Lösung noch 12h lang unter

starkem Rühren auf 65°C erhitzt. Danach filtriert man vom Feststoff ab, wäscht diesen noch dreimal mit 50 ml Benzol nach und vereinigt die flüssigen Phasen. Die Lösung wird mit 200 ml Wasser verdünnt, mit festem Natriumcarbonat neutralisiert und erneut filtriert. Die wässrige Phase wird mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumhydrogencarbonat gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt fällt dabei hochrein als farblose Kristalle an.

b) 24.3g (1 Mol) Magnesiumspäne werden unter Schutzgas mit 1.5 l abs. Dibutylether übergossen. Anschließend werden vorsichtig 142g (1 mol) Methyljodid über 90 min vorsichtig zugetropft. Danach wird das Grignardreagenz noch 2h unter Rückfluß gekocht. Zu dieser Lösung werden in der Siedehitze 16.4g  $\alpha,\alpha,\alpha'$ -Tetramethyladipinsäuredinitril **93** gelöst in 200 ml abs. Dibutylether zugetropft. Zur Vervollständigung der Reaktion läßt man das Gemisch noch 3h unter Rückfluß kochen. Der Reaktionsansatz wird nach dem Abkühlen auf 2l Eis gegossen und mit verd. Salzsäure neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt und zweimal mit Wasser nachgewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Dabei fällt das Produkt als farblose Kristalle in hoher Reinheit an.

**C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>** (M=198.30 g/mol)

**Ausbeute:** Variante a) 19.4 g (98% der Theorie)  
Variante b) 11.1 g (56% der Theorie)

**Schmp.:** 58-60°C

**<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

**d [ppm] = 1.11** (s, 12H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>), **1.37** (s, 4H, **CH<sub>2</sub>**), **2.11** (s, 6 H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>),

**IR (KBr):**

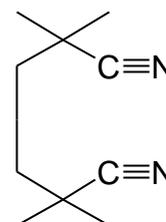
**$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 2974** (C-H), **1701** (C=O), **1473, 1355, 1166**

MS (70eV):

$m/z$  (%) = **198** [ $M^+$ ] (1), **137** (8), **86** (33), **69** (83), **57** (24), **55** (10), **43** (100)

### 5.2.35. Versuch 35: a,a,a'a'-Tetramethyladipinsäuredinitril

In ein 5l Becherglas werden 1.3l Wasser und 83g (1 mol) Pivalinsäurenitril gegeben. Unter sehr starkem Rühren werden 150 ml einer 6.67M Wasserstoffperoxidlösung und 750 ml einer 1.33M Eisen(II)-Sulfatlösung [hergestellt aus 278g Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat, 55 ml konz. Schwefelsäure und 575 ml Wasser] gleichzeitig in äquimolaren Mengen aus zwei kalibrierten Büretten innerhalb von 15 min zugetropft, so daß die Reaktionstemperatur während der Reaktion bei 30°C liegt (Eisbad!). Nach dem Abkühlen fällt das Rohprodukt über Nacht im Kühlschrank aus. Es wird abgesaugt und anschließend aus Methanol umkristallisiert.



Ausbeute :30.4 g (37% der Theorie)

[Lit. [42]: 42% (Rohausbeute)]

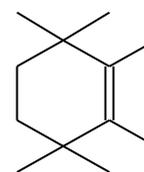
Schmelzpunkt 138 °C

[Lit. [42]:138 °C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [42] überein.

### 5.2.36. Versuch 36: 1,2,3,3,6,6-Hexamethylcyclohex-1-en

Eine Suspension von 25g  $TiCl_3$  (0.16 mol) und 24.3g Zn-Cu-Paar (0.37 mol) in 1200 ml abs. 1,2-Dimethoxyethan wird 3h unter Argonatmosphäre refluxiert. Anschließend werden in der Siedehitze über 36h 6.4g (0.03 mol) 3,3,6,6-Tetramethyl-octan-2,7-dion **91** hinzugetropft.



Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz durch Kieselgel filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und das Produkt fraktionierend destilliert.

Ausbeute : 2.4 g (48% der Theorie)

Siedepunkt: 138 °C

[Lit. [41]: 138 °C]

Spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur [41] überein.

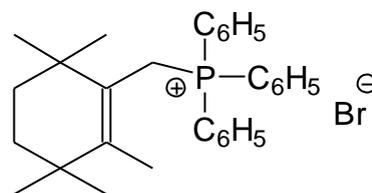
### **5.2.37. Versuch 37: (2,3,3,6,6-Pentamethyl-cyclohex-1-enylmethyl)-triphenylphosphoniumbromid**

2.0g (12 mmol) 1,2,3,3,6,6-Hexamethylcyclohex-1-en

**79** werden in 200 ml abs CCl<sub>4</sub> gelöst. Dann gibt man

2.1g (12 mmol) N-Brom-Succinimid dazu. Die Lösung

wird zum Sieden erhitzt und eine Spatelspitze



Dibenzoylperoxid hinzugegeben. Nach dem Abklingen der Reaktion filtriert man vom entstandenen Succinimid ab, neutralisiert mit verd. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg und wäscht die organische Phase drei mal mit Wasser. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mit 5ml Methylenechlorid aufgenommen. Das Produkt wird anschließend in Diethylether ausgefällt, abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

**C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>PBr** (M=507.51 g/mol)

**Ausbeute:** 4.4 g (72% der Theorie)

**Schmp.:** >180 °C Zersetzung

**<sup>1</sup>H-NMR<sub>300</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

**d [ppm] = 0.82-0.92** (2 s, 12H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>), **1.20-1.27** (m, 4H, **CH<sub>2</sub>**-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), **1.47** (s, 3 H, C=C-**CH<sub>3</sub>**), **4.32-4.41** (d, 2H, J= 15 Hz, **CH<sub>2</sub>**-P), **7.59-8.03** (m, 15H, arom. H)

**<sup>31</sup>P-NMR<sub>200</sub> (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**

**d [ppm] = 20.11** (s)

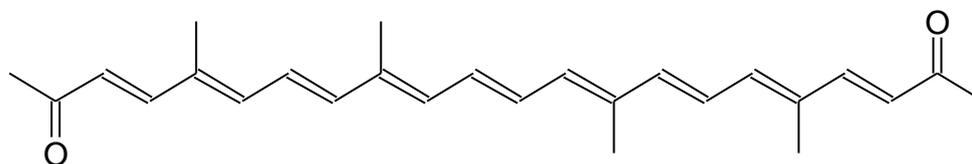
IR (KBr):

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3053 (C-H, arom.), 2911 (C-H), 1587, 1436, 1108, 690

MS (70eV):

m/z (%) = 427 [ $\text{M}^+ - \text{Br}^+$ ] (100), 311 (8), 263 (32), 183 (20), 165 (14), 123 (13), 109 (23), 77 (33), 51 (13)

**5.2.38. Versuch 38: 5, 9, 14, 18-Tetramethyl-docosa-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19-nonaen-2, 21-dion**



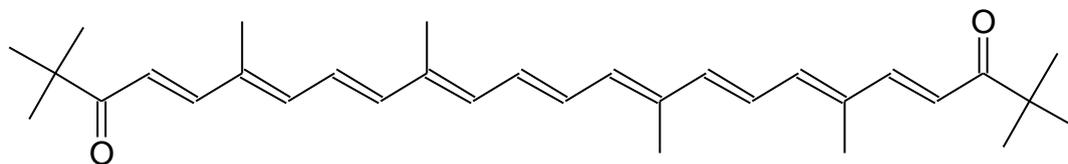
In einem 250ml Zweihalskolben werden 2.96g (0.01 mol) Crocetininaldehyd in 100 ml Aceton und 50 ml Wasser unter Schutzgas suspendiert. Anschließend werden 0.57g (0.1 mol) Kaliumhydroxid, gelöst in 20ml Wasser hinzugegeben. Die Lösung wird bei 50°C gerührt bis kein Edukt mehr über DC nachweisbar ist (Laufmittel: reines Methylenechlorid). Sollte nach 3-6h die Reaktion noch nicht abgeschlossen sein, so gibt man erneut portionsweise 0.5-1.0g Kaliumhydroxid hinzu. Anschließend saugt man das fertige Produkt ab und kocht es mehrmals in Methanol zur Befreiung vom einseitig umgesetzten Edukt ab auf. Man filtriert erneut und erhält die gewünschte Substanz in hochreiner Form und trocknet dies im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute :3.15 g (84% der Theorie)

[Lit. [46]: 35%]

Spektroskopische und physikalische Daten stimmen mit der Literatur [46] überein.

**5.2.39. Versuch 39: 2, 2, 6, 10, 15, 19, 23, 23-Octamethyl-tetracos-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20-nonaen-3, 22-dion**



Durchführung: Analog Versuch 38. Statt Aceton wird hier Pinakolon verwendet.

Ausbeute :3.01 g (81% der Theorie)

[Lit. [46]: 48%]

Spektroskopische und physikalische Daten stimmen mit der Literatur [46] überein.

**6. Literatur**

- [1] W. I. Gruszecki, J. Sielewiesiuk, *Biochim Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 405-412
- [2] K. Strzalska, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys Acta* **1994**, *1194*, 138-142
- [3] J. Jezowska, A. Wolak, W.I. Gruszecki, K. Strzalka, *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1194*, 143-148
- [4] G. Britton in „*Carotenoids in Photosynthesis*“ (Hrsg.: A. Young and G. Britton), Chapman & Hall, London, **1993**, Kapitel 8
- [5] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, 1. Auflage, Pergamon Press Ltd, **1984**, S. 141
- [6] N.I. Krinsky in „*Carotenoids*“ (Hrsg. O.E. Isler), Birkhäuser Verlag, Basel, **1971**, 679-686
- [7] G. W. Burton, K. U. Ingold, *Science* **1984**, 569-573
- [8] Alpha Tocopherol, beta carotene cancer prevention study group (ABTC), *N. Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 1029-1035
- [9] G. S. Omenn, G. E. Goodman, M. D. Thornquist, J. Balmes, M. R. Cullen, A. Glass, J. P. Keogh, F. L. Meyskens, B. Valanis, J. H. Williams, S. Bamhart, M. G. Cherniak, C. A. Brodin, S. Hammar; *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1550-1558
- [10] J. Terao, *Lipids*, **1989**, *24*, 659-661
- [11] C. Ruck, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [12] T. G. Truscot; *J. Photochem. Photobio. B: Biology* **1996**, *35*, 233-235
- [13] T. G. Truscott; *Nutr.* **1997**, *13* (11/12), 992-994
- [14] N. Krinsky; *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, *7*, 617-635
- [15] M. Garavelli, F. Bernadi, M. Olivucci, A. Robb; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10210-10222
- [16] H. Sies; *Angew. Chem.* **1996**, *98*, 1061-1075
- [17] W. Kunze in "Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie", Bnd. 8, **1974**, Verlag Chemie, Weinheim, S. 19-41
- [18] G. Scott in "*Atmospheric Oxidation and Antioxidants*", Elsevier Pub. Comp., Amsterdam 1965
- [19] L. R. Mahoney; *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 555-563

- [20] C. Mordi; *Chem. Ind.* **1993**, 79-83
- [21] H.-D. Martin, C. Jäger, C. Ruck, M. Schmidt, R. Walsh, J. Paust, *J. Prakt. Chem.* **1999**, 341, 302-308
- [22] J. W. Cornforth, J., R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning, G. Popják; *Tetrahedron* **1959**, 5, 311
- [23] M. Sundaralingam, C. Bedell; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 1569
- [24] G. Bucholski, Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2000**
- [25] G. W. Burton, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6472-6477
- [26] D. C. Liebler in „*Subcellular Biochemistry*“, Vol. 30 (Hrsg. Quinn, P. J. und Kagan, V. E.); Plenum Press, New York **1998**, 302
- [27] G. W. Burton, K. U. Ingold; *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 194-201
- [28] J. Winterle, D. Dulin, T. Mill; *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 491-495
- [29] D. C. Liebler, J. A. Burr; *Biochemistry* **1992**, 31, 8278-8284
- [30] V. W. Bowry, R. Stocker; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6029-6044
- [31] P. K. Witting, V. W. Bowry, R. Stocker; *FEBS Lett.* **1995**, 375, 45-49
- [32] G. W. Burton, L. Hughes, K. U. Ingold; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5950-5951
- [33] R. Katzenmeyer, Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1997**
- [34] E. Larsen, J. Abendroth, V. Partali, B. Schulz, H.-R. Sliwka, G. K. Quartey; *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 113-117
- [35] J. W. Scott, F. T. Bizarro, D. R. Parrish, G. Saucy; *Helv. Chim. Acta* **1976**, 59, 291-305
- [36] J. M. Grisar, G. Marciniak, F. N. Bolkenius, J. Verne-Mismer, R. Wagner; *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2880-2886
- [37] P. Bravo, C. Ticozzi, C. Fronza, R. Bernadi, D. Maggi; *Gazz. Chim. Ital.* **1979**, 109, 137
- [38] M. D. Healy, A. R. Barro; *J Organomet. Chem.* **1990**, 381 (2), 165-172
- [39] M. Schmidt, Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1995**
- [40] J. Buddrus; *Angew. Chem.* **1968**, 80, 535-536
- [41] H. Mayr, H. Klein, E. Sippel; *Chem. Ber.* **1983**, 116, 3624-3630
- [42] D. D. Coffman, E. L. Jenner, R. D. Lipscomb; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2864-2870

- [43] J. Decombe, A. Striffling; *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C* **1966**, 263, 1315-1316
- [44] J. E. McMurry, P. Fleming, K. I. Kees, L. R. Krepski; *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3255-3266
- [45] A. G. Andrewes, G. Borch, S. Liaaen-Jensen; *Act. Chem. Scand. Ser. B* **1984**, 38, 10, 871-876
- [46] C. K. Warren, B. C. L. Weedon; *J. Chem. Soc.* **1958**, 3972-3982
- [47] N. J. Allinger, J. T. Sprague; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 3893
- [48] Hyperchem™, Version 3.0 For Windows, ©Hypercube, Inc.
- [49] V. Fock; *Z. Phys.* **1930**, 61, 126
- [50] J. A. Pople, G. A. Segal; *J. Chem. Phys.* **1966**, 44, 3239
- [51] H.-H. Schmidtke; Quantenchemie, 1. Auflage, VCH Weinheim, **1987**, 105-113
- [52] J. A. Pople, D. L. Beveridge, P. Dobosh; *J. Chem. Phys.* **1967**, 47, 2026
- [53] M. J. S. Dewar, W. Thiel; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 4899
- [54] C. Mordi, J.C. Walton, G.W. Burton, L. Hughes, K. U. Ingold, D.A. Lindsay, D. J. Moffat; *Tetrahedron* **1993**, 49 (4), 911-928
- [55] S. Frixel Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [56] D. T. Bostick, D. M. Hercules; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 447
- [57] B. Olsson; *Anal. Chem.* **1982**, 136, 113
- [58] Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker, B. N. Ames; *Anal. Biochem* **1987**, 160, 7
- [59] B. Frei, Y. Yamamoto, D. Niclas, B. N. Ames; *Anal. Biochem* **1985**, 175, 120
- [60] H. Hughes, C. V. Smith, J. O. Tsokos-Luhm, J. R. Mitchel; *Anal Biochem.* **1986**, 152, 107
- [61] F. J. G. M. Van Kuijk, D. W. Thomas, F. J. Stephens, E. A. Dratz; *J. Free Radicals Biol. Med.* **1985**, 1, 215
- [62] M. Mihara, M. Uchiyama; *Anal. Biochem.* **1978**, 86, 271-278
- [63] H. H. Draper, M. Hadley in „*Methods in Enzymology*“, Vol. 186 Part B (Hrsg. L. Packer, A.N. Glazer), S. 421-430; Academic Press, Inc, San Diego, **1990**
- [64] „*Methods in Enzymology*“, Vol. 186 Part B (Hrsg. L. Packer, A.N. Glazer), Academic Press, Inc, San Diego, **1990**

- [65] W. Jordan, H. von Barneveld, O. Gerlich, J. Ullrich in "Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie", Bnd. 18, **1976**, Verlag Chemie, Weinheim, S. 179-180
- [66] G. O. Burr, M. M. Burr; *J. Biol. Chem.* **1929**, 82, 345-367
- [67] U. S. von Euler; *Klin. Wschr.* **1935**, 14, 1182-1182
- [68] P. R. Cullis, M. J. Hope in „Biochemistry of Lipids and Membranes“ (Hrsg. D. E. Vance, J. E. Vance; The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc; Menlo Park California **1985**, 56
- [69] H. W.-S. Chan, G. Levett, *Lipids* **1977**, 12 (1), 99-104
- [70] D. L. Allara, C. White, R. L. Meek; *J. Polym. Sci.* **1976**, 14, 93
- [71] H. W.-S. Chan, G. Levett, *Lipids* **1977**, 12 (10), 837-840
- [72] O. Gräf, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1994**
- [73] B. Kleeschewski, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1997**
- [74] R. Yamauchi, N. Miaki, H. Inoue, K. Kato; *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 708-713
- [75] G. Gao, C. C. Wei, A. S. Jeevarajan, et. al.; *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (13), 5362-5366
- [76] C. Köpsel, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2000**
- [77] I. Schülke, Staatsarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2000**
- [78] Dr. S. Beutner, persönliche Mitteilung
- [79] P. Palozza; *Nutr. Rev.* **1998**, 56 (9), 257-265
- [80] S. Sell, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [81] Entsche; Karrer; *Helv. Chim. Acta* **1958**, 983-985
- [82] A. A. Woodall, S. Wai-Ming Lee, R. J. Weesie, M. J. Jackson, G. Britton; *Biophys. Acta* **1997**, 1336, 33-42
- [83] T. Y. P. Bonnie, Y. M. Choo; *J. Oil Palm Res.* **1999**, 11, 62-78
- [84] H.-D. Martin; S. Beutner; B. Mayer; C. Ruck; M. Schmidt; S. Sell; R. Walsh et al.; *Pure and Appl. Chem.* **1999**, 71, 12, 2253-2262
- [85] J. A. Jeevarajan, L. D. Kispert; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 411 (1-2), 57-66
- [86] G. S. Misra, J. S. Shukla; *J. Ind. Chem. Soc.* **1951**, 28 (5), 277-279
- [87] R. R. Herr, T. Enkoji, P. Dailey; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4229-4230
- [88] Z.-L. Zhou, S. X. Cai, E. R. Withermoore, et. al.; *J. Med. Chem.* **1998**, 42 (15), 2993-3000

- 
- [89] C. Stammel, R. Fröhlich, C. Wolff, H. Wenck, A. de Meijere, J. Mattay; *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 7, 1709-1718
- [90] A. A. Muknoneva, E.N. Cherezova, R. S. Zharkova; *Russ. J. Gen. Chem.* **1994**, 64 (6.2), 947
- [91] G. Stillson, D. W. Sawyer, C. K. Hunt; *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 303-307
- [92] A. Jacob, M. Steiger, A.R. Todd, T. S. Work; *J. Chem. Soc.* **1939**, 542-544
- [93] E. Hedaja, S. Winstein; *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, 59, 2001-2003
- [94] C. D. Kachel, I.D. Rac, A.M. Redwood; *Austr. J. Chem.* **1975**, 28, 2315-2316
- [95] N. S. Leonard, P.M. Mader, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 5388-5389