

Aggregationsverhalten von Carotinoiden in Membranen unilamellarer Liposomen

Synthese, Präparation, Charakterisierung,
UV/VIS- und CD-Spektroskopie

Inaugural-Dissertation

zur

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



vorgelegt von

Diplom-Chemiker Michael Korger

aus Mönchengladbach

Düsseldorf 2005

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

Referent: Universitätsprofessor Dr. H.-D. Martin

Korreferent: Universitätsprofessor Dr. W. Stahl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2005

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin danke ich für die Vergabe des Themas,
seine Hilfeleistungen und den mir überlassenen Freiraum
bei der Gestaltung dieser Arbeit.

Was wir wissen,
ist ein Tropfen,
was wir nicht
wissen – ein Ozean.

Sir Isaac Newton (1643-1727)

Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein (1879-1955)

Abkürzungen

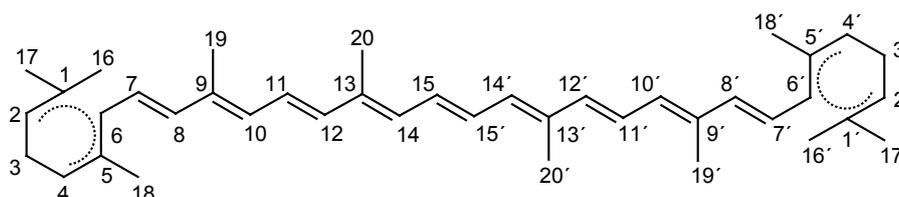
Abb.	Abbildung
AFM	atomic force microscope (Atom-Kraftmikroskop)
AIBN	Azoisobutyronitril, 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril)
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
<i>CV</i>	Carotinoidverhältnis $Car_{\text{end}}/Car_{\text{ein}}$ bei der Präparation der Liposomen
d	Dublett (NMR)
d. h.	das heißt
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
Deform.	Deformationsschwingung
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylcholin
engl.	englisch
ESR (EPR)	Elektronenspinresonanz (elektronenparamagnetische Resonanz)
<i>EV</i>	Einlagerungsverhältnis Car/Lipid in den Liposomen
Gl.	Gleichung
IUV	mittlere unilamellare Vesikel
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert(e)
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
LHC	light-harvesting complex (Lichtsammelkomplex)
LUV	große unilamellare Vesikel
m	Multiplett (NMR)
M	mol/l
mesh	Maschenzahl (Anzahl der Maschen je Zoll linear)
MLV	multilamellare Vesikel
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
o. Ä.	oder Ähnliche(s)
p. a.	pro analysi (analysenrein)

Abkürzungen

R	Regressionskoeffizient
R_f	Retentionsfaktor (retention factor)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
<i>s-cis/s-trans</i>	single bond cis/trans (hier: Konformation an 6-C, 7-C)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
Sdp.	Siedepunkt
sh	shoulder (Bandenschulter im UV/VIS-Spektrum)
Smp.	Schmelzpunkt
SUV	kleine unilamellare Vesikel
symm.	symmetrisch(e)
t	Triplett (NMR)
T_m	Phasenübergangstemperatur eines Lipids, m für melting (schmelzen)
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
u. a.	unter ander(e)m
UV	Bereich ultravioletter Strahlung (10 – 400 nm)
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbarer Spektralbereich (400 – 800 nm)
z. B.	zum Beispiel

Bei UV/VIS-Absorptionsdaten ohne Angabe von $\lg \epsilon$ entspricht der **fett** gedruckte Wert dem absorptionsstärksten Maximum.

Die Nummerierung der Kohlenstoffatome der Carotinoide erfolgt nach folgendem Schema in Analogie zur IUPAC Carotinoid-Nomenklatur^[1]:



Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN	1
1.1. Carotinoide.....	1
1.1.1. Vorkommen und Bedeutung.....	1
1.1.2. Funktionen in biologischen Systemen.....	4
1.1.3. Aggregation von Farbstoffen.....	8
1.1.3.1. Excitonenmodell nach <i>Davydov</i>	9
1.1.3.2. Aggregation von Carotinoiden	12
1.2. Lipide.....	15
1.2.1. Phospholipide – Zusammensetzung und Struktur	15
1.2.2. Phospholipide als Membranbausteine	16
1.2.3. Physikalische Struktur von Liposomen	18
1.2.4. Membranfluidität und Phasenübergangstemperatur	19
1.2.5. Carotinoide in Membranen.....	21
1.3. Zielsetzung.....	24
2. HAUPTTEIL	25
2.1. Synthese.....	25
2.1.1. Syntheseeziele	25
2.1.2. Alicyclische Xanthophylle	25
2.1.2.1. Wittig-Olefinierung zu Zeaxanthin 6	25
2.1.2.2. Acetylierung der Sechsringxanthophylle	27
2.1.2.3. Darstellung des Luteindimethylethers 20	28
2.1.2.4. Das 2,2'-Dinorcarotinoid Actinioerythrol 26	29
2.1.2.5. Derivate des Actinioerythrols.....	31
2.1.3. Aromatische Carotinoide.....	33
2.1.3.1. 3,3'-Dimethoxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin 35	33
2.1.3.2. Versuche zur Darstellung eines phenolischen Carotinoids	35
2.1.3.3. 2,2'-Dihydroxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin 48	39

2.1.3.4.	Acetylierung des phenolischen Carotinoide 48	41
2.2.	Präparation der unilamellaren Vesikel	42
2.2.1.	Auswahl der geeigneten Präparationsmethode	42
2.2.2.	Extrusionsmethode	43
2.2.3.	Auswahl des geeigneten Phospholipids	44
2.2.4.	Durchführung der Vesikelpräparation	47
2.2.5.	Charakterisierung der carotinoidbeladenen DPPC-Vesikel	47
2.2.5.1.	Bestimmung der Carotinoidkonzentration	48
2.2.5.2.	Bestimmung der durchschnittlichen DPPC-Konzentration	50
2.3.	UV/VIS-Spektroskopie	52
2.3.1.	Astaxanthin 9	54
2.3.2.	Astaxanthindiacetat 19	58
2.3.3.	Canthaxanthin 8	62
2.3.4.	Actinioerythrol 26	65
2.3.5.	Actinioerythroldiacetat 27	69
2.3.6.	Violerythrin 28	72
2.3.7.	Zeaxanthin 6	75
2.3.8.	Lutein 7	80
2.3.9.	Zeaxanthindiacetat 17	84
2.3.10.	Luteindiacetat 18	86
2.3.11.	<i>m</i> -Hydroxyphenyl-Carotinoid 48	90
2.3.12.	<i>m</i> -Acetoxyphenyl-Carotinoid 49	94
2.3.13.	<i>p</i> -Methoxyphenyl- und <i>p</i> -Benzoyloxyphenyl-Carotinoid 35 und 40	97
2.4.	CD-Spektroskopie	102
2.4.1.	Exciton-gekoppelter Circular dichroismus	105
2.4.2.	CD-Spektroskopie an Carotinoidaggregaten	107
2.4.3.	Aufnahme der CD-Spektren	108
2.4.3.1.	(3 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-Astaxanthin 9a	108
2.4.3.2.	Lutein 7	111
2.4.3.3.	Luteindiacetat 18	115
2.4.3.4.	Luteindimethylether 20	117

2.5. Elektronenmikroskopie	120
2.6. Diskussion der Ergebnisse	123
2.6.1. H-Aggregatebildner in der Lipidmembran	123
2.6.2. J-Aggregatebildner in der Lipidmembran	128
2.6.3. Funktionelle Bedeutung der Hydroxycarotinoide <i>in vivo</i>	131
3. ZUSAMMENFASSUNG	133
4. EXPERIMENTELLER TEIL	135
4.1. Allgemeines	135
4.2. Präparation und Charakterisierung der Liposomen	137
4.2.1. Versuchsbeschreibungen	137
4.2.1.1. Präparation der unbeladenen Vesikel	137
4.2.1.2. Präparation der mit Carotinoiden beladenen Vesikel	137
4.2.1.3. Extrusion.....	138
4.2.1.4. Farbttest zur Bestimmung der Lipidkonzentration	139
4.2.1.5. Bestimmung der Carotinoidkonzentration in den Liposomen.....	139
4.2.1.5.1. HPLC (mit DAD)-Methode	140
4.2.1.5.2. UV/VIS-Methode	140
4.3. Danksagung	141
4.4. Synthese	143
4.4.1. Versuchsbeschreibungen	143
5. LITERATURVERZEICHNIS	179
Anhang (verwendete Carotinoide)	187

1. Einleitung und Grundlagen

1.1. Carotinoide

1.1.1. Vorkommen und Bedeutung

Die Carotinoide bilden eine der wichtigsten Gruppen von natürlichen Pigmenten. Sie sind in der Natur weit verbreitet und in nahezu allen Familien des Pflanzen- und Tierreiches wie auch im menschlichen Körper zu finden. Dem lateinischen Namen der Karotte, *Daucus carota* („wilde Möhre“), verdankt diese Substanzklasse ihren Namen. Bis heute wurden über 700 Carotinoide, deren Farbe von gelb über orange bis dunkelrot reicht, aus natürlichen Quellen isoliert^[2]. Sie bewirken die auffällige Farbgebung von Blumen wie Stiefmütterchen oder Eschscholtzien (Goldmohn) und vielen Früchten wie Karotten, Mais, Tomaten, Zitrusfrüchten, Hagebutten oder Paprika. Weiterhin kommen sie in Mikroorganismen und Tieren, z. B. in Hummern, Krabben, Forellen und Lachs vor^[3]. Auch für die rotbraunen Farben des Herbstlaubes sind Carotinoide zusammen mit Flavonoiden verantwortlich, die erst gegen Ende der Vegetationsperiode nach Abbau der grünen Chlorophyllpigmente im Blatt in Erscheinung treten. Einige Bakterien und höhere Pflanzen (Algen, Pilze) können Carotinoide *de novo* synthetisieren, während der tierische und menschliche Organismus sie nicht selbst aufbauen, sondern nur die mit pflanzlicher Nahrung aufgenommenen metabolisch umwandeln kann. Obwohl die Carotinoide auch in mehrheitlich nicht zur Photosynthese befähigten Bakterien und Pilzen gebildet werden, vollzieht sich ihre Biosynthese in den größten Mengen in den photosynthetisch aktiven Geweben von Pflanzen und Algen^[2]. Dabei wird ausgehend vom Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA, „aktivierte Essigsäure“) sukzessiv das Kohlenstoffgerüst nach folgendem Schema aufgebaut:



Durch Claisen-Esterkondensation zweier Acetyl-CoA-Moleküle und anschließender Aldoladdition eines weiteren solchen C₂-Bausteins entsteht unter Abspaltung je eines Moleküls CoA ein verzweigtes C₆-Kohlenstoffskelett, das in einem nächsten zweistufigen Schritt biochemisch zu Mevalonsäure (3,5-Dihydroxy-3-methylpentansäure)

reduziert wird. Nach Phosphorylierung und Abspaltung von Kohlendioxid und Wasser entsteht 3-Methyl-3-butenyldiphosphat (Isopentenylidiphosphat, IDP), das gewissermaßen einen aktivierten C₅-Isoprenbaustein darstellt und in einer enzymatisch katalysierten Umlagerung 3-Methyl-2-butenyldiphosphat (Dimethylallyldiphosphat, DMADP) bildet.

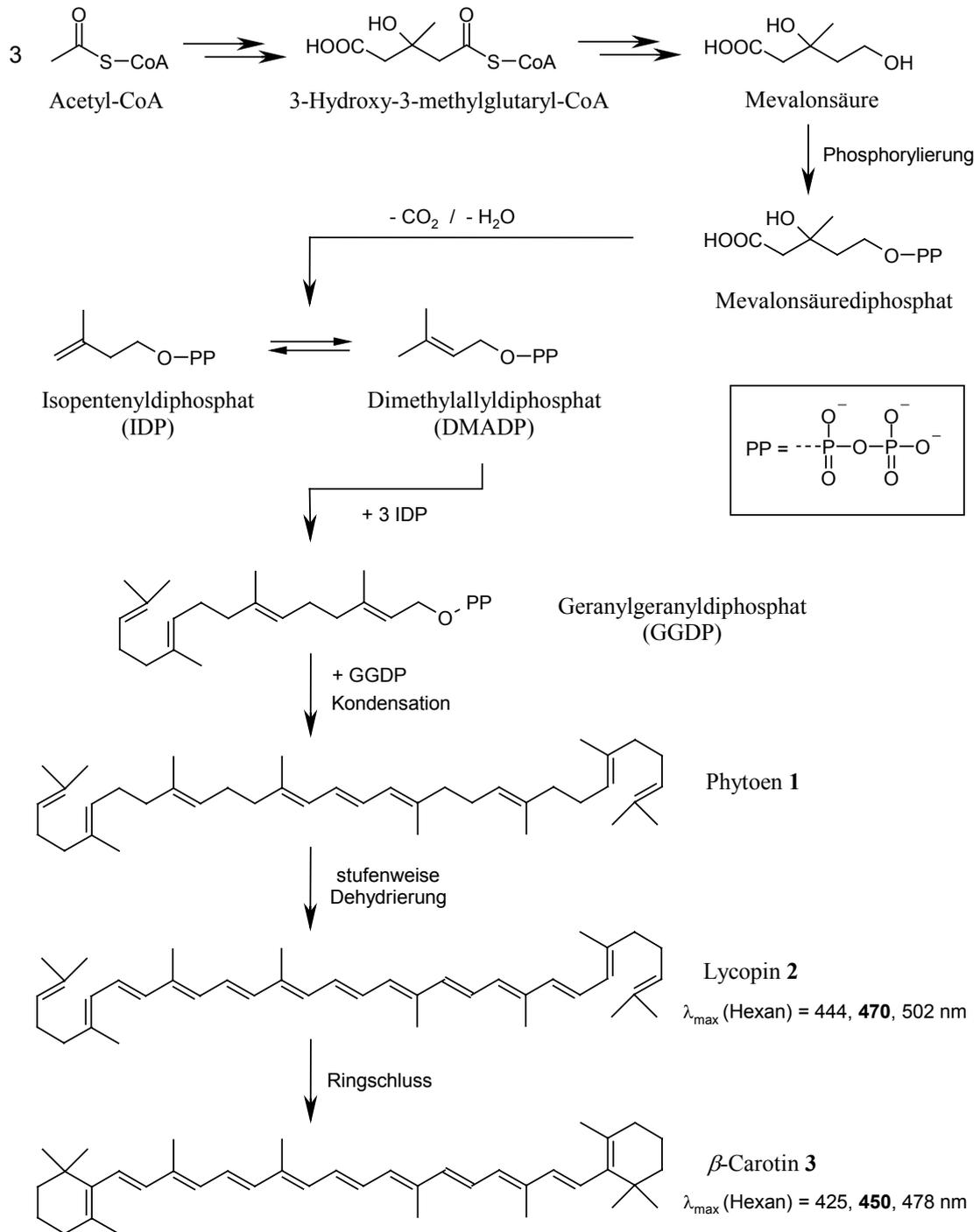


Abb. 1: Biosyntheseweg zu Lycopin 2 und β -Carotin 3 (Hauptabsorptionsmaxima **fett**)

Durch sequentielle Kondensation von DMADP mit 3 Molekülen IDP wird der C₂₀-Baustein Geranylgeranyldiphosphat (GGDP) synthetisiert, der anschließend über Kopf-an-Kopf-Kondensation zu Phytoen **1** dimerisiert, womit das C₄₀-Carotinoidegerüst ausgebildet ist (Abb.1)^[2,4]. Phytoen **1** ist noch farblos, denn von seinen neun Doppelbindungen sind nur drei konjugiert. Nach schrittweiser Dehydrierung entsteht schließlich Lycopin **2**, der rote Hauptfarbstoff der Tomate und Hagebutte. Sein Chromophor, das Polyensystem von elf konjugierten, in der Regel (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen, ist der Grund für seine Farbe. Es ist dabei der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang, der die Absorption von sichtbarem Licht bewirkt. Über einen Ringschluss ist u. a. β -Carotin **3** zugänglich. Dieses liegt in einer um etwa 40° verdrillten 6-*s-cis*-Konformation vor, wobei die endocyclischen Doppelbindungen an C-5,6 aus der Ebene der Polyenkette herausgedreht sind, um die sterische Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe an C-5 im Ring und dem Wasserstoffatom an C-8 zu minimieren^[5]. Dies hat eine im Vergleich zum Lycopin **1** hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 20 nm zur Folge, da eine Überlappung der p-Orbitale beträchtlich vermindert wird und so der Beitrag der Ringdoppelbindungen zum delokalisierten π -Elektronensystem gering ist. Seine größte Bedeutung findet β -Carotin **3** als Nahrungs-

und Futtermittelzusatz, nicht nur aufgrund seiner gelb-orange färbenden Eigenschaft (vgl. Margarine und Limonade), sondern auch wegen seiner wichtigen physiologischen Bedeutung für Mensch und Tier als Provitamin A.

Zu den weiteren, noch im Blutserum und Plasma vorkommenden Carotinoiden gehören neben α -Carotin **4** die an C-3 bzw. C-3' mit

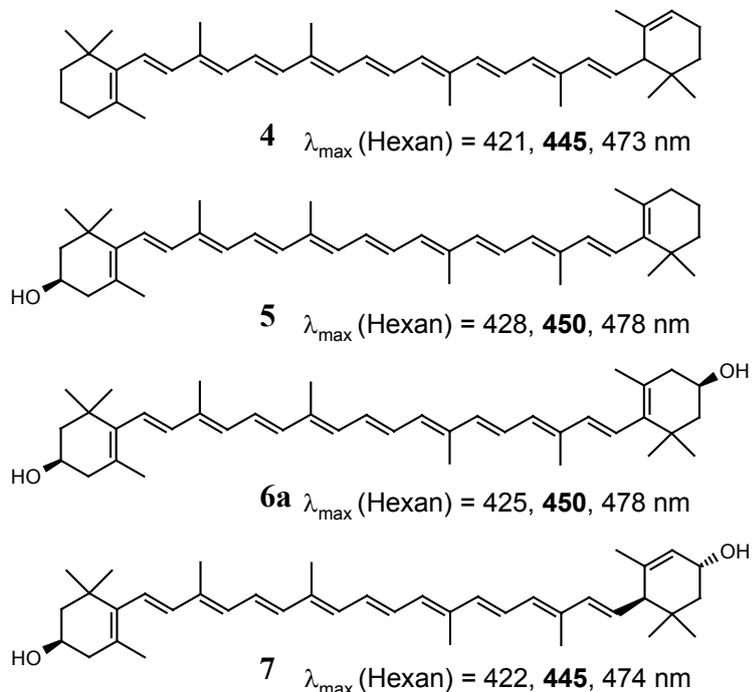


Abb. 2: Carotinoide im Humanblut: α -Carotin **4**, β -Crytoxanthin **5**, (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a**, Lutein **7** (Hauptabsorptionsmaxima **fett**)

Hydroxygruppen funktionalisierten Derivate β -Cryptoxanthin **5**, (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** und Lutein **7**, die als sauerstoffhaltige Abkömmlinge zu den Xanthophyllen gezählt werden. Die Hauptquellen von β -Cryptoxanthin **5** sind tropische und Zitrusfrüchte, während der Mensch (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** vor allem mit dem gelben Mais und der Paprika, Lutein **7** mit grünem Gemüse wie Spinat, Erbsen oder grünen Bohnen zu sich nimmt^[2]. Die

Ketoxanthophylle Canthaxanthin **8** und Astaxanthin **9** sind dagegen häufig im Tierreich anzutreffen, nämlich bei Krebs- und Krustentieren oder auch als Farbpigmente in den Vogelfedern des Flamingos oder roten Ibis^[1]. Im

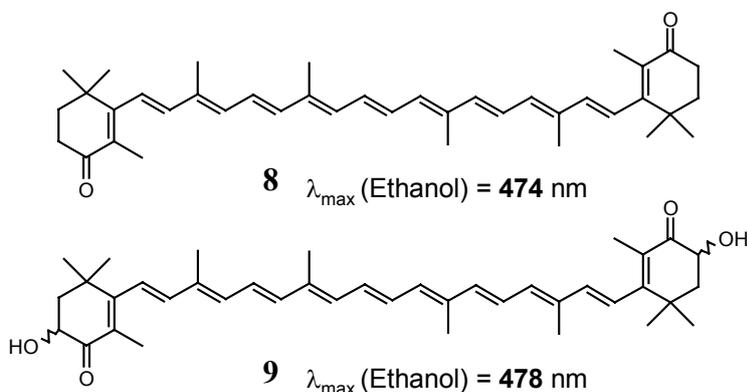


Abb. 3: Ketocarotinoide Canthaxanthin **8**, Astaxanthin **9**

Hummer ist Astaxanthin **9** an den Proteinkomplex α -Crustacyanin gebunden und erzeugt somit eine blaue Farbe ($\lambda_{\max} = 632 \text{ nm}$). Nach den bisher neusten Erkenntnissen liefert die Aggregation zu Astaxanthin-Dimeren in den β -Crustacyanin-Untereinheiten (acht davon aggregieren zum α -Crustacyanin) durch Excitonen-Wechselwirkung den größten Beitrag zur Bathochromie^[6]. Erst beim Kochen nach vollständiger irreversibler Denaturierung des Proteins wird das Carotinoid freigesetzt und die Farbe ändert sich nach orangerot. Dehydratisierung des Komplexes bewirkt ebenfalls diesen Farbumschlag und ist reversibel^[7].

1.1.2. Funktionen in biologischen Systemen

Im Pflanzenreich fungieren Carotinoide als lichtsammelnde Pigmente bei der Photosynthese in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten^[8,9]. Um die Photosynthese effizient zu betreiben, muss das Sonnenlicht in den Lichtsammelkomplexen (LHCs) in einem großen Wellenlängenbereich absorbiert werden, um die gewonnene Energie dann an das eigentliche Photoreaktionszentrum weiterzuleiten. Die grünen Chlorophyllpigmente zeigen im sichtbaren Spektralbereich von 480 – 550 nm eine Absorptionslücke,

die von den Carotinoiden geschlossen wird, um eine maximale Sammlung von Energie auch bei niedrigen Lichtintensitäten zu ermöglichen^[4]. Im Lichtsammelkomplex IIb (LHC IIb) beispielsweise sind zwei Moleküle Lutein 7 in einer genau definierten Ausrichtung zusammen mit Chlorophyllpigmenten nichtkovalent an ein Apoprotein gebunden^[10]. Neben der biologischen Antennenfunktion haben Carotinoide auch eine notwendige strukturelle Bedeutung bei dem Zusammenbau und der Stabilisierung des Photosystems II und gewisser Lichtsammelkomplexe in Photobakterien und grünen Pflanzen^[11]. Die dritte sehr wichtige Funktionalität der Carotinoide in der Flora ist im Schutz vor vom Chlorophyll sensibilisierten Photooxidationen begründet. Foote und Denny entdeckten 1968, dass diese Schutzfunktion der Carotinoide nicht allein auf ihre Fähigkeit zurückgeführt werden kann, den Triplettsensibilisator Chlorophyll (³Sens*) zu quenchen, der aus dem nach Lichtanregung entstandenen Singulettzustand (¹Sens*) über Intersystem Crossing (ISC) entsteht und den für die lebende Zelle toxischen Singulett-Sauerstoff (¹O₂*) generiert^[12] (Abb. 4).

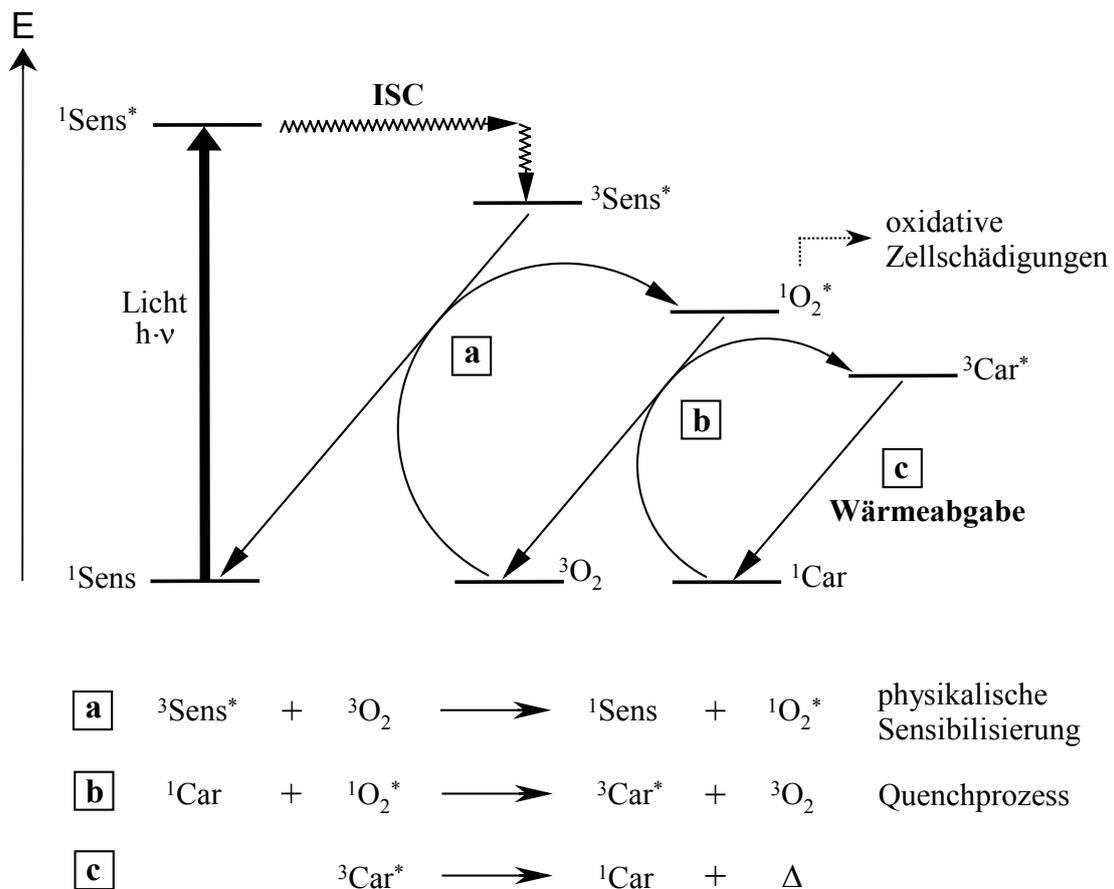


Abb. 4: Modell zur Bildung von Singulett-Sauerstoff durch sensibilisierte Bestrahlung und zur physikalischen Desaktivierung durch Carotinoide

Vielmehr findet eine direkte und effiziente Desaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch Carotinoide im Bereich der Diffusionskontrolle statt, da ihre Triplettenergie ($^3\text{Car}^*$) noch unter der niedrigen Energie des Singulett-Sauerstoffs liegt (94.3 kJ/mol)^[13]. Neben Art und Funktionalisierung der Carotinoidendgruppen bestimmt vor allem die Polykettenlänge der Carotinoide ihr Quenchvermögen, das an das Vorhandensein von mindestens neun oder besser noch elf konjugierten Doppelbindungen gekoppelt ist^[14,15]. Ein großes Augenmerk richtet sich dabei auf das hervorragend wirkende, acyclische Lycopin **2**^[16].

Neben dieser physikalischen Schutzfunktion übernehmen Carotinoide im lebenden Organismus noch weitere antioxidative Aufgaben wie das Abfangen und Desaktivieren von freien Radikalen, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität in der Lage sind, oxidativen Stress zu verursachen, dadurch dass sie biologisch relevante Verbindungen wie Nucleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide chemisch verändern oder zerstören^[17]. Im Jahr 1984 zeigten *Burton und Ingold* an β -Carotin **3**, dass Carotinoide bei verhältnismäßig niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in Lösung als Antioxidantien agieren können, indem sie als Radikalfänger gegenüber Peroxidradikalen unter Ausbildung mesomeriestabilsierter Carotinoidperoxidradikale wirken^[18]. Dieses Verhalten ergänzt sich gut dem des wohl

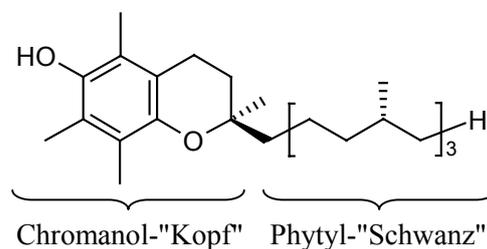


Abb. 5: α -Tocopherol (Vitamin E)

bedeutendsten und wirksamsten biologischen Radikalfängers α -Tocopherol (Vitamin E), das einen Radikalkettenabbruch durch Übertragung des phenolischen Wasserstoffatoms auf die Peroxidradikale unter Ausbildung eines resonanzstabilisierten Phenoxyradikals herbeiführt und auch bei hohen Sauerstoffkonzentrationen effizient ist. Die Radikalfängerwirkung der Carotinoide ist stark von der Struktur der Endgruppen abhängig. So zeigen Carotinoide mit an C-4,4'-Position tragenden Oxo-Gruppen wie Canthaxanthin **8** und Astaxanthin **9** im Vergleich zu β -Carotin **3** eine viel bessere Inhibition der Lipidperoxidation, da die zum entstehenden Radikalpolyensystem in Konjugation stehenden Akzeptorgruppen eine stabilisierende Funktion ausüben^[19,20]. Weiterhin eröffnen beim β -Carotin **3** die zusätzlich allylischen Wasserstoffatome an C-4,4' die Möglichkeit einer Wasserstoffabstraktion durch Radikale, was die Autoxidation von **3** durch Angriff molekularen

Sauerstoffs favorisiert^[21,22]. Zusätzlich wirkt sich eine Koplanarität zwischen Endgruppe und Polyenseitenkette günstig aus^[23]. Interessanterweise treten bei der Messung der Antioxidansaktivität der Carotinoide bezüglich der radikalischen Lipidperoxidation andere Phänomene in Erscheinung, wenn sich die Carotinoide nicht in Lösung, sondern direkt in der Lipidmembran befinden^[24]. Bei Verwendung von sowohl wasser- als auch fettlöslichen Radikalstartern zeichnen sich die polaren Xanthophylle allgemein durch eine große Schutzfunktion aus^[25,26], wobei die Anwesenheit von Hydroxygruppen in C-3,3'-Position wie beim (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a**, obwohl nicht konjugiert zum Chromophor, an Bedeutung gewinnt^[27]. Zusätzlich werden synergistische Effekte z. B. zwischen Lycopin **2** und Lutein **7** beobachtet^[28]. All dies wird auf die unterschiedliche Anordnung und Ausrichtung der Carotinoide in der jeweiligen Lipidmembran zurückgeführt^[29]. Gerade aber diese Aspekte dürfen in physiologischer Hinsicht nicht außer Acht gelassen werden. Weitere Einblicke in die Beschaffenheit solcher Carotinoid-Lipidsysteme sind daher von großer Bedeutung und sollen in dieser Arbeit gewonnen werden.

Die Rolle der Carotinoide in der Krankheitsprävention durch Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies zeigt sich in epidemiologischen Studien, bei denen die Aufnahme von carotinoidreichem Obst und Gemüse mit dem geringeren Risiko, an Arteriosklerose, Krebs, Herz-Kreislaufkrankheiten oder auch altersbedingter Maculadegeneration (AMD) zu erkranken, korreliert ist^[30,31]. Die Hydroxycarotinoide (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** (zusammen mit seinem 3-Epimer *meso*-Zeaxanthin) und Lutein **7** pigmentieren das Zentrum des schärfsten Sehens in der menschlichen Retina: die Macula lutea, auch gelber Fleck genannt^[32]. Neben ihrer antioxidativen Funktion wirken sie dort als Blaulichtfilter und schützen die gegen den energiereichen Anteil des sichtbaren Lichtes besonders empfindlichen Photorezeptoren, deren Degenerierung zur Ausbildung der AMD mit letztendlich resultierender Erblindung führt. Man hat gezeigt, dass eine dichte Maculapigmentierung, erreichbar durch Aufnahme von **6a** und **7** mit dunkelgrünem Blattgemüse^[33] oder als Nahrungsmittelzusätze^[34], sowohl die Retina als auch das retinale Pigmentepithel vor Schädigungen durch hohe Lichtintensitäten schützt^[35]. AMD-Patienten weisen eine signifikant geringere Pigmentdichte auf, die nicht allein auf die zerstörerischen Effekte der Erkrankung zurückzuführen ist^[36]. Es ist auffällig, dass ausschließlich Carotinoide mit Hydroxygruppen in der Retina anzutreffen sind, die wohl durch Wechselwirkungen untereinander und mit den Lipidmolekülen der Membran

spezielle geometrische Anordnungen favorisieren, die bezüglich ihrer Schutzfunktion besonders effizient sind.

Ein eher nachteiliges Resultat zeigte sich nach hohen Dosen oder langen Einnahmezeiten von Präparaten, die Canthaxanthin **8** enthalten. Das rote Carotinoid fand aufgrund seiner Fähigkeit, sich in der menschlichen Haut abzulagern, Anfang der 80er Jahre seine Anwendung u. a. in Bräunungspillen^[37]. Man machte Ablagerungen von rot-goldenen, fettlöslichen Kristallen in den inneren Schichten der peripheren Retina ausfindig, die zwar keinen direkten Einfluss auf die Morphologie der Retina haben, jedoch das Krankheitsbild der Canthaxanthin-Retinopathie bilden^[38], die erst über Jahre hinweg nach Einstellen der Canthaxanthinaufnahme reversibel ist^[39]. Das unterschiedliche Verhalten des Ketocarotinoids **8** und der Hydroxycarotinoide **6a** und **7** ist offensichtlich und wirft Fragen zu verschiedenartigen Aggregationstendenzen der Carotinoide in Membranen auf.

1.1.3. Aggregation von Farbstoffen

Das Phänomen der Aggregation von Molekülen, speziell von Farbstoffen, ist schon lange bekannt und wurde im Jahr 1936 von *Scheibe*^[40-42] und *Jelly*^[43,44] an Cyaninfarbstoffen erstmals eingehend untersucht. Diese Aggregatestrukturen stellen einen Zwischenzustand dar beim Übergang der Farbstoffmoleküle von ihrem vollständig dissoziierten Zustand in Lösung bis hin zu ihrer Anordnung im Kristall. Die Ausbildung der Aggregate zeigt sich vor allem anhand der Änderung der Absorptionseigenschaften im UV/VIS-Bereich im Vergleich zu den in Lösung vorliegenden Einzelmolekülen. Das macht sich meistens auch durch eine starke Farbänderung der Lösung bemerkbar. Dabei nimmt die Hauptabsorptionsbande des Monomeren an Intensität ab oder verschwindet ganz, während ein oder mehrere neue Absorptionsbanden sowohl zur kurzwelligen, als auch zur langwelligen Seite des Spektrums hin in Erscheinung treten können.

Die Grundlage der Aggregation ist der hydrophobe Effekt, der immer dann relevant wird, wenn hydrophobe Substanzen in ein hydrophiles Medium, in der Regel Wasser, eingebracht werden. Bei der Zusammenlagerung von Farbstoffmolekülen in einer wässrigen Lösung werden Wassermoleküle aus den Solvathüllen der Einzelmoleküle freigesetzt und die Entropie des Systems nimmt zu^[45]. Dabei ist nicht die Attraktion der

Farbstoffmoleküle untereinander ausschlaggebend, die sich nicht viel von den wechselseitigen Kräften zwischen Farbstoff- und Wassermolekülen unterscheiden muß, sondern es ist vielmehr die Anziehung der Wassermoleküle selbst, die zu einer hoch geordneten Wasserstruktur führt und die Eliminierung des Wasser-Farbstoff-Kontaktes durch die Bildung der Farbstoffaggregate forciert^[46]. Darüber hinaus üben van-der-Waals-Kräfte und, falls möglich, Wasserstoffbrückenbindungen eine stabilisierende Funktion bei der Aggregation aus.

1.1.3.1. Excitonenmodell nach Davydov

Die Beschreibung der neuen optische Eigenschaften der Aggregate übernimmt das molekulare Excitonenmodell nach Davydov^[47]. Für seine Darstellung eignet sich abseits einer quantenmechanischen Behandlung ein quasi-klassisches Vektormodell in Anbetracht der elektrostatischen Wechselwirkung von Übergangsdipolen^[48,49]. Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung ist stets mit einem elektrischen Übergangsmoment $\vec{\mu}$ verknüpft.

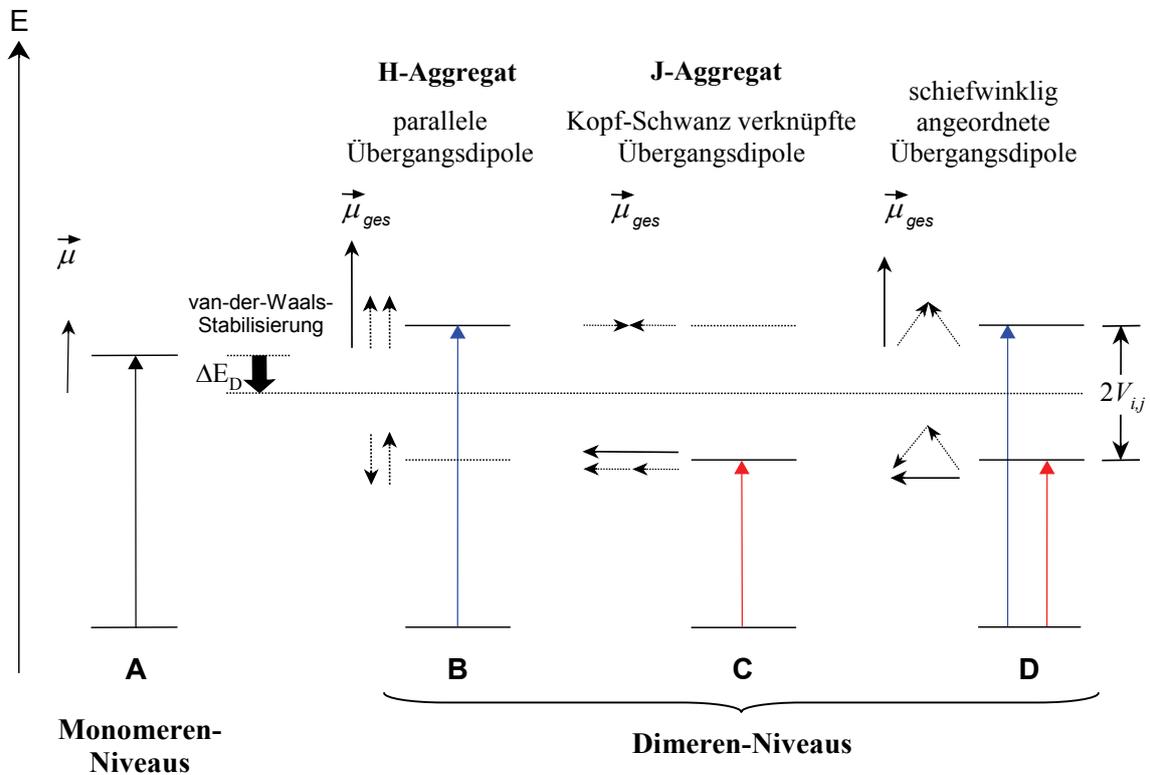


Abb. 6: Vektormodell-Energiediagramm für ausgezeichnete Anordnungen der Übergangsdipole in Dimeren im Vergleich zum Monomer

Im einfachsten Fall des Dimers koppeln durch die Zusammenlagerung der Chromophore die beiden Übergangsdipole miteinander. Neben einer energetischen Absenkung des angeregten Monomereniveaus relativ zum Grundzustand über van-der-Waals-Stabilisierung (vgl. ΔE_D -Term in Abb. 6) führt dies zur Aufspaltung des angeregten Zustandes in zwei separierte Einzelniveaus. Je nach Ausrichtung der Übergangsdipole im Aggregat sind dabei verschiedene Grenzfälle denkbar. Das Gesamtübergangsmoment ergibt sich jeweils aus der Vektorsumme der beiden Übergangsmomente der einzelnen Moleküle. Bei einer Stapelung der Chromophore in einer kartenstapelähnlichen Anordnung sind sowohl eine parallele als auch eine antiparallele Anordnung der Dipole möglich (Abb. 6 B). Bei antiparalleler Ausrichtung ergibt sich ein Übergangsmoment von 0 und der Übergang ist elektrisch dipol-verboten. Sind die beiden Übergangsdipole jedoch parallel orientiert, kann Lichtabsorption erfolgen. Diese ist im Vergleich zum Monomer hypsochrom verschoben, da der angeregte Zustand aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Dipole höher gelegen ist. Man spricht hier von H-Aggregation (H wie hypsochrom), die sich im Absorptionsspektrum durch die Anwesenheit einer zu kleineren Wellenlängen verschobenen H-Bande bemerkbar macht. Bei hintereinander angeordneten, Kopf-Schwanz verknüpften Chromophoren resultiert ebenfalls nur bei gleich gerichteter Anordnung der Übergangsdipole ein von Null verschiedenes Gesamtübergangsmoment, so dass der Übergang elektrisch dipol-erlaubt ist (Abb. 6 C). Der angeregte Zustand ist hierbei gegenüber dem Monomeren infolge elektrostatischer Anziehung tiefer gelegen, was im Absorptionsspektrum durch eine bathochrom verschobene J-Bande (nach ihrem Entdecker *Jelly* benannt) angezeigt wird. Die dazugehörigen Assoziate werden dann als J-Aggregate bezeichnet. Bei schiefwinklig angeordneten Chromophoren ergibt sowohl die anziehende als auch die abstoßende Kombination der Dipole ein nicht verschwindendes Gesamtübergangsmoment, das auf dem jeweils anderen senkrecht steht (Abb. 6 D). Somit zeigen derart arrangierte Aggregate zwei verschiedene Absorptionen, die eine bathochrom und die andere hypsochrom zur Monomerenbande verschoben.

Symmetrische, (all-*E*)-konfigurierte Carotinoide mit annähernd C_{2h} -Symmetrie besitzen einen starken, elektrisch dipol-erlaubten $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang im sichtbaren Bereich. Der für die langwelligste $\pi \rightarrow \pi^*$ -Absorptionsbande verantwortliche angeregte Zustand ist hier zumindest der zweite angeregte Singulettzustand S_2 , da der Übergang in den energetisch niedriger gelegenen ersten angeregten Singulettzustand S_1 , auf dessen

Existenz aus dem Fluoreszenzverhalten geschlossen wurde, gemäß Symmetrierauswahlregeln verboten ist^[50]. Das elektrische Übergangsmoment $\vec{\mu}$ des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs ist dabei entlang der Polyenkette polarisiert. In Carotinoidaggregaten stellt die Kartenstapel-Anordnung einen idealisierten Grenzfall dar, da die Carotinoidmoleküle mehr oder weniger koplanar gegeneinander verschoben sind. Als Maß dient der Scherwinkel $\alpha \leq 90^\circ$, der nicht stumpfe Winkel zwischen den Molekülachsen und der Verbindungslinie benachbarter molekularer Zentren (Abb. 7 A).

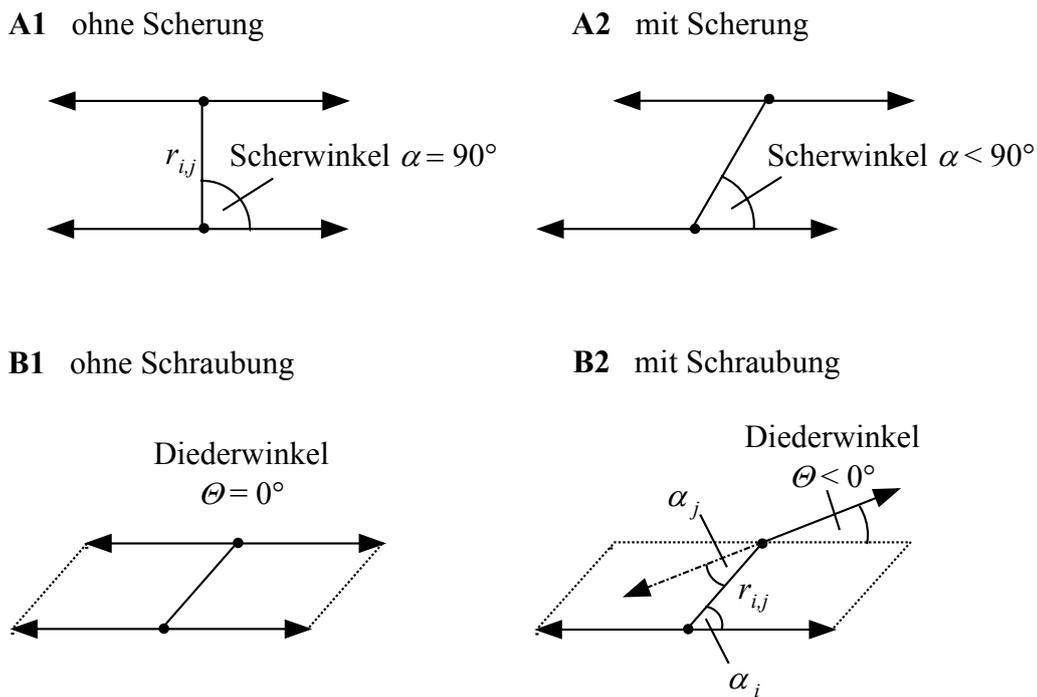


Abb. 7: Veranschaulichung der Begriffe **A** Scherung und **B** Schraubung anhand der Orientierung von Übergangsdipolen bei einem Dimer

Ist das Aggregat zusätzlich helical tordiert, wird dies durch den Diederwinkel Θ zwischen den beiden Ebenen, gebildet aus der intermolekularen Verbindungsachse benachbarter Moleküle und dem jeweiligen Übergangsdipol, angegeben, der durch sein Vorzeichen auch die Schraubungsrichtung des Aggregats bestimmt (Abb. 7 B). Gemäß einer Punktdipolnäherung^[49] hängt die Wechselwirkungsenergie V_{ij} benachbarter Übergangsdipole von dem Wert des elektrischen Übergangsmoments \vec{M} im Monomer, dem intermolekularen Abstand r_{ij} und den die Geometrie des Aggregats vorgebenden Winkeln α_i , α_j und Θ ab (Abb. 7 B2). Die Exciton-Aufspaltung (auch *Davydov*-Aufspaltung) eines Aggregats aus einer Anzahl von N Molekülen errechnet sich damit zu^[51,52]:

$$2V_{i,j} = 4 \left| \left(\frac{N-1}{N} \right) \left(\frac{|\vec{M}|^2}{r_{i,j}^3} \right) (\cos \Theta \sin \alpha_i \sin \alpha_j - 2 \cos \alpha_i \cos \alpha_j) \right| \quad \text{Gl. 1}$$

In einem parallel gestapelten Dimer ohne Schraubung ($\alpha_i = \alpha_j$, $\Theta = 0^\circ$) ist bei einem Scherwinkel von $\alpha = \arccos 1/\sqrt{3} = 54.7^\circ$ die Exciton-Aufspaltung Null. Für $\alpha > 54.7^\circ$ liegt ein H-Aggregat, für $\alpha < 54.7^\circ$ ein J-Aggregat mit jeweils nur einem erlaubten Übergang vor, der beschrieben wird durch die gleichphasige Wechselwirkung der Übergangsdipole. Sind nun die Moleküle im Aggregat zusätzlich gegeneinander verdreht, tritt also ein Diederwinkel $\Theta \neq 0^\circ$ auf, gewinnt der vorher dipol-verbotene Übergang an Intensität und eine weitere Absorption wird erlaubt. Eine Ausnahme bildet der Fall $\alpha = \Theta = 90^\circ$, wenn die beiden Übergangsdipole senkrecht übereinanderliegen, da dann die Dipol-Dipol-Wechselwirkung ebenfalls Null wird. Der allgemeine Fall ($\alpha_i \neq \alpha_j$) berücksichtigt eine zusätzlich gekippte und auch windschiefe Anordnung der Übergangsdipole.

Geht man von einem Dimer zu einem Aggregatekomplex mit einer Anzahl von N miteinander koppelnden Chromophoren über, so erhält man ein in N einzelne Anregungszustände aufgespaltenes Exciton-Band. Bezeichnenderweise ist bei klassischen H- bzw. J-Aggregaten auch nur der höchste bzw. der niedrigste angeregte Zustand des Aggregats über einen elektrisch dipol-erlaubten Übergang erreichbar^[48,53].

1.1.3.2. Aggregation von Carotinoiden

Mit der Frage nach den gelb- oder vor allem blaugefärbten Pigmenten des Hummers, die das eigentlich orange-rote Carotinoid Astaxanthin **9** enthalten, begann zunehmend das Interesse an den durch Aggregation verursachten geänderten optischen Eigenschaften der Carotinoide. Im Jahr 1968 untersuchten *Buchwald und Jencks*^[54] UV/VIS-spektroskopisch die Lage des Absorptionsmaximums von Astaxanthin **9** in verschiedenen Ethanol/Wasser-Gemischen nach Zugabe unterschiedlicher Salze in variierenden Konzentrationen. Sie machten bathochrom und hypsochrom zur Monomerenbande verschobene Absorptionsbanden mit geänderter Form ausfindig, die im Fall einer Blauverschiebung sogar eine Gelbfärbung der Lösung verursachten und einem H-Aggregat

zugeschrieben wurden. *Hager*^[55] machte darauf aufmerksam, dass besonders Hydroxycarotinoide als biologische Photorezeptoren in Frage kommen können, da sie in wässrigen Systemen H-Aggregatebanden im UV/VIS-Spektrum um 370 nm ausbilden. *Ruban et al.*^[56] verfolgten UV/VIS-spektroskopisch die H-Aggregation von sechs in Pflanzen häufig vorkommenden Xanthophyllen in Ethanol/Wasser-Gemischen steigenden Wassergehaltes. Sie stellten dabei eine lineare Beziehung zwischen der mit abnehmender Polarität der Carotinoide steigenden Aggregationstendenz und der Lage der kleineren bei den Aggregaten über 500 nm auftretenden Absorptionsbande fest. Dabei werden die unterschiedlichen optischen Aggregateigenschaften der im lichtabhängigen Xanthophyll-Zyklus^[57] beteiligten Carotinoide als Grund für ihre dortige Umwandlung ineinander angeführt. Im Jahr 1977 machten *Salares et al.*^[58] Messungen an Xanthophyllaggregaten in einer 10%igen wässrigen Acetonlösung erstmals mittels der Resonanz-Ramanspektroskopie. Diese Messungen lassen auf eine Verdrillung der Polyenkettens in den untersuchten Aggregatestrukturen schließen. Bei der Untersuchung von chiralen Carotinoiden bietet sich daher neben der UV/VIS-Spektroskopie vor allem die CD-Spektroskopie an. Bei der Aggregation treten oberhalb 300 nm unter der Hauptabsorptionsbande starke CD-Banden auf, deren Analyse auf Grundlage der Excitonen-Theorie wichtige strukturelle Informationen liefert. Im Jahr 1980 beschrieben *Lematre et al.*^[59] damit zuerst die deutlich verschiedenen Aggregatestrukturen von Lutein **7** und seinem zweifach acetylierten Derivat in wässrigem Ethanol und zeigten verschiedene Auswirkungen nach Detergentienzugabe und Temperaturerhöhung auf. Weitere Untersuchungen dieser Aggregate und eine weitaus ausführlichere Interpretation ihrer chiroptischen Eigenschaften machten *Zsila et al.*^[60] im Jahr 2001, unterstützt durch AFM-Aufnahmen der Aggregate. Die Ähnlichkeit des CD-Spektrums von aggregiertem Luteindiacetat mit dem CD-Spektrum von bestimmten carotinoidhaltigen gelb-orangen Blütenblättern, die die Xanthophylle als Fettsäureester in ihren tubulären Chromoplasten tragen, sprechen für eine gleichartige chirale Orientierung in beiden Systemen, für die die Veresterung der freien Hydroxygruppen der Carotinoide unverzichtbar ist^[61].

Die Arbeitsgruppe um *Zsila* studierte in wässrigen Systemen weiterhin das Aggregationsverhalten verschiedener Derivate von Capsanthin **10**, dem bedeutenden Farbpigment der reifen roten Paprika. Die Ausbildung von H- oder J-Aggregatestrukturen wird bei Capsanthol und Capsantholon entscheidend durch die absolute Konfiguration am 6'-C-Atom beeinflusst^[62,63]. (6'R)-Capsanthol **11** und (6'R)-Capsantholon **12** bilden H-Aggregate, für die im Fall von **11** eine linkshelicale Anordnung der Einzelmoleküle,

stabilisiert über Wasserstoffbrückenbindungen, als Modell vorgeschlagen wurde^[63]. Die entsprechenden 6'-Epimere organisieren sich dagegen zu J-Aggregaten. Es wird angenommen, dass sie sich aus gegeneinander verdrehten nematischen Schichten zusammensetzen, in denen die Carotinoidmoleküle parallel zueinander und mit ihrer Polyenkette

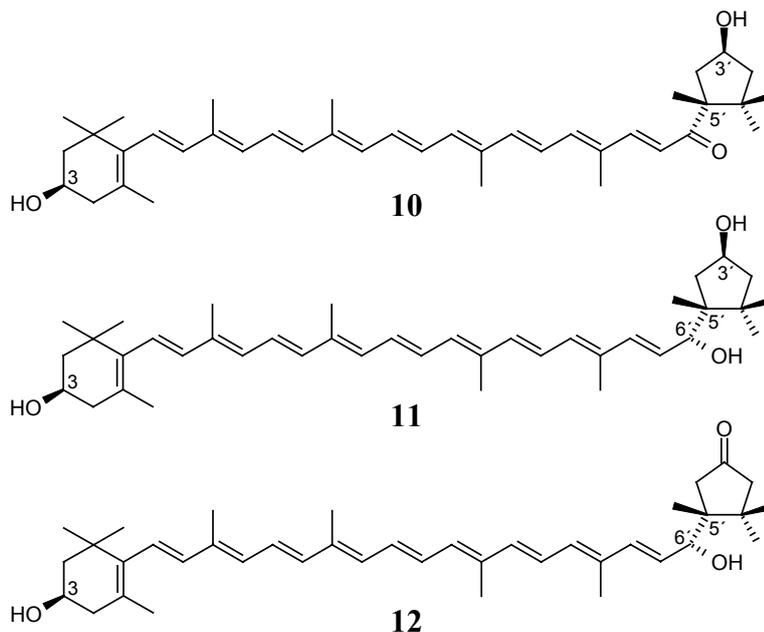


Abb. 8: rotes Paprikacarotinoid Capsanthin **10** mit zwei Derivaten (6'R)-Capsanthol **11** und (6'R)-Capsantholon **12**

orthogonal zu den Schichten ausgerichtet sind^[61,63]. Eine Änderung der Konfiguration an 3'-C hingegen bewirkt beim J-Aggregatebildner keine Abwandlung des UV/VIS- und CD-Spektrums, während das 3'-Epimer von **11** ein H-Aggregat von nahezu spiegelbildlicher Geometrie im Vergleich zu **11** erzeugt^[64]. Eine Untersuchung des Aggregationsverhaltens aller möglichen Acetylierungsprodukte von **11** lässt den Schluss zu, dass zur Generation von H-Aggregaten hierbei mindestens eine freie Hydroxygruppe an jeder Endgruppe des Carotinoidmoleküls vonnöten ist^[65].

Takagi et al. beobachteten CD-spektroskopisch die H-Aggregation von Lutein **7** in unterschiedlich konzentrierten Phosphatpuffern unter Zugabe verschiedener Mengen eines anionischen^[66,67] oder kationischen Detergens^[68] und entdeckten je nach Bedingungen das Auftreten bestimmter Aggregatespezies, die in ihrer Größe, Stabilität und helicalen Drehrichtung variieren. Desweiteren bestimmten sie anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Form der Luteinaggregate in wässrigem Aceton^[69] und dispergiert in Phospholipid-Liposomen^[70], wobei sie in letzterem Medium eine linksgängige helicale Struktur gemäß CD-Spektrum aufdeckten.

Inwiefern den Carotinoidaggregaten im biologischen Sinn eine Bedeutung zukommt, kann nur durch ihre Untersuchung direkt in Membransystemen geklärt werden, in denen die hydrophoben Carotinoide eingebettet sind. Weiterhin ist die Ausbildung der

Aggregate in Membranen, die dort von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, in der Regel auf kleine Aggregateinheiten beschränkt und ermöglicht so ihre Identifizierung. Im Hinblick auf die Untersuchung derartiger Strukturen in dieser Arbeit werden nun die Grundbausteine der Membranen und ihre Eigenschaften vorgestellt.

1.2. Lipide

Unter der Bezeichnung Lipide werden Öle, Fette, Wachse und die Phospholipide zusammengefasst. Es handelt sich bei ihnen um Verbindungen, die sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weit verbreitet sind und die alle Ester höherer Carbonsäuren (in der Regel mit 12 bis 36 Kohlenstoffatomen) darstellen^[71]. Eine außergewöhnliche Bedeutung haben Phospholipide als wichtige Strukturbauteile der Zellmembranen.

1.2.1. Phospholipide – Zusammensetzung und Struktur

Phospholipide sind wasserunlösliche Biomoleküle, die sich jedoch gut in organischen Lösemitteln wie Chloroform lösen. Sie leiten sich entweder vom dreiwertigen C₃-Alkohol Glycerin ab und werden dann als Phosphoglyceride bezeichnet, oder aber vom komplexeren ungesättigten und zweiwertigen C₁₈-Aminoalkohol Sphingosin.

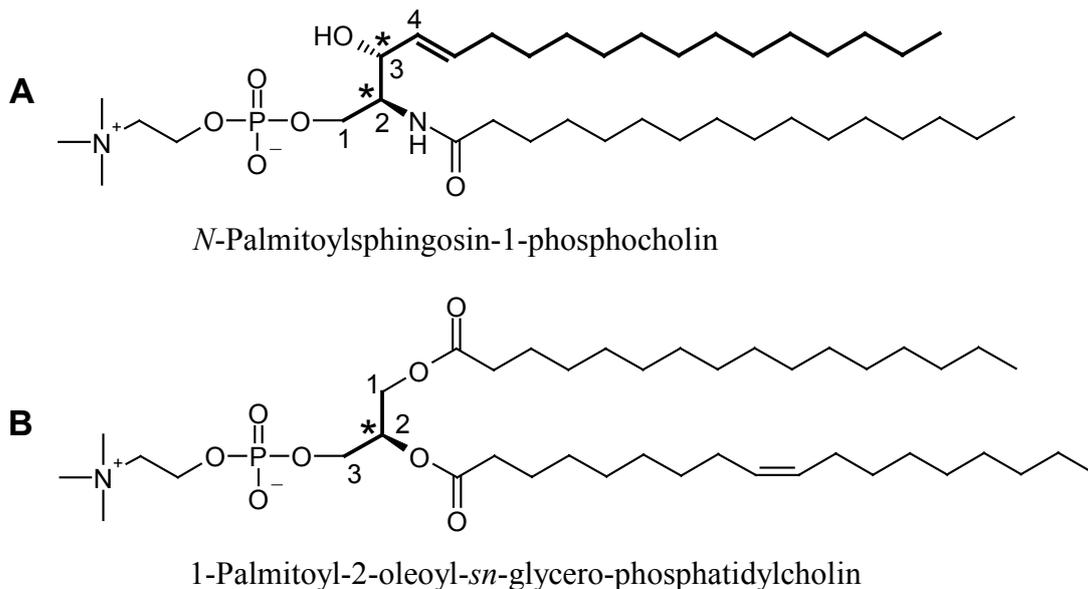


Abb. 9: Strukturbeispiele eines **A** Sphingomyelin- und **B** Phosphoglyceridmoleküls (die Kohlenstoffgerüste der Alkohol-Rückgrate sind **fett** hervorgehoben)

Bei letzterem ist die Aminogruppe über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft (diese Verbindungen nennt man auch Ceramide) und die primäre Hydroxygruppe mit Phosphorsäure und Cholin verestert (Abb. 9 A). Diese Gruppe der Phospholipide nennt man Sphingomyeline. Bei den Phosphoglyceriden ist das Glycerin definitionsgemäß an den Hydroxygruppen an C-1 und C-2 mit langkettigen Fettsäuren, an der Hydroxygruppe an C-3 mit einem phosphorylierten Alkohol verestert. Als Alkoholkomponente kommt gewöhnlich Cholin, Serin, Ethanolamin, Glycerin oder auch der sechswertige cyclische C₆-Alkohol Inositol vor^[4]. In der Natur ist das cholinhaltige Phosphoglycerid Phosphatidylcholin (PC), auch bekannt als Lecithin, das wohl weit verbreitetste. Diese PC-Moleküle können an Position 1 und 2 viele verschiedene Fettsäurereste tragen, typischerweise mit einer geraden Anzahl (bedingt durch den biosynthetischen Aufbau über Acetyl-CoA Einheiten) zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatomen, wobei der Kohlenwasserstoffrest an C-2 der meist längere und ungesättigtere ist^[72]. Doppelbindungen sind dabei in der Regel (Z)-konfiguriert (Abb. 9 B).

Durch Veresterung der Hydroxygruppen an C-1 und C-3 des Glycerins mit verschiedenen Substituenten wird das mittlere Kohlenstoffatom C-2 asymmetrisch. Die natürlichen Phosphoglyceride sind daher alle chiral und Derivate des L-Phosphoglycerins (*sn*-Glycerin-3-phosphat)^[73]. Dies wird durch das Präfix „*sn*“ zum Ausdruck gebracht und bedeutet „stereospezifische Nummerierung“. Das entscheidende gemeinsame Strukturmerkmal der Phospholipide ist ihr amphiphiler Charakter, d. h. sie verfügen alle über einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil. Sie setzen sich aus einer polaren Kopfregion und zwei langkettigen unpolaren Kohlenwasserstoffresten zusammen. Dies ist für ihr physikochemisches Verhalten von großer Bedeutung und befähigt sie zur Ausbildung von geordneten Strukturen im wässrigen Medium.

1.2.2. Phospholipide als Membranbausteine

In wässriger Umgebung können Phospholipide Überstrukturen ausbilden. Befänden sich derartige Moleküle isoliert im Wasser, wäre die Wasserstruktur erheblich gestört, da viele Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen gebrochen werden müssten. Durch Zusammenlagerung der hydrophoben Kohlenwasserstoffreste wird jedoch ein Energieminimum im System Wasser/Phospholipid erreicht. Dieser Vorgang

kugelförmigen Vesikeln zusammen, indem sie als Lipidmembran ein wässriges Kompartiment einschließen (Abb. 10 C und 11). Diese werden auch Liposomen genannt und können Größenordnungen über drei Zehnerpotenzen hinweg von 10 nm bis zu einigen Mikrometern im Durchmesser annehmen, wo sie Dimensionen von lebenden Zellen erreichen^[72]. Seit ihrer Entdeckung von *Bangham* werden Liposomen seit Mitte der 60er Jahre in der Forschung als einfache Modelle von Zellmembranen verwendet, um Membranrekonstitutionen, -transport, -permeabilität, -fusion und -struktur zu untersuchen^[75]. In den darauffolgenden Jahren fanden die Liposomen zunehmend Aufmerksamkeit als vielversprechendes Applikationssystem in der Medizin^[76-78], indem sie als Arzneimittelträger den Arzneistoff in eingeschlossener Form bis zum Wirkungsort transportieren und dort freisetzen.

1.2.3. Physikalische Struktur von Liposomen

Abgesehen von ihrer chemischen Zusammensetzung können Liposomen nach ihrer Form und Größe charakterisiert werden. Ihre Gestalt ist in der Regel ei- bis kugelförmig. Man unterscheidet zwei Standardtypen: zwiebelschalenartig geschichtete multilamellare Vesikel (MLV), die aus mehreren konzentrischen, jeweils durch einen Flüssigkeitsraum voneinander getrennten Lipiddoppelschichten bestehen, und unilamellare Vesikel mit

einem einzigen, von einer Lipidmembran umgebenen wässrigen Kompartiment. Letztere wiederum unterteilt man noch in kleine Vesikel (engl.: small unilamellar vesicles, SUV), die den kleinsten theoretisch

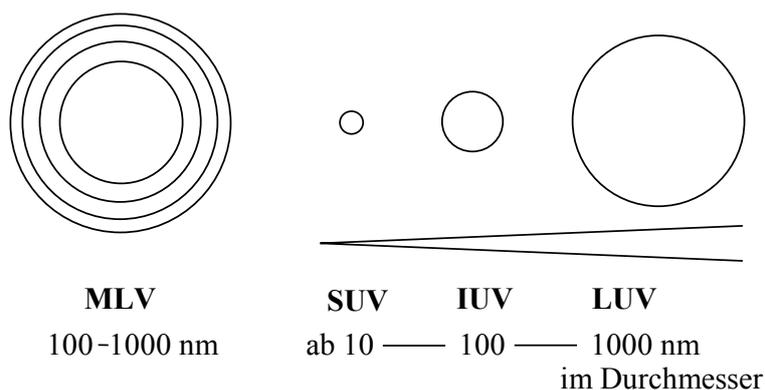


Abb. 12: Struktur und Größenordnung multi- und unilamellarer Vesikel

erreichbaren Durchmesser besitzen, mittlere (engl.: intermediate-sized unilamellar vesicles, IUV) und große Vesikel (engl.: large unilamellar vesicles, LUV)^[72]. Eine genauere Größeneinteilung ist in Abb. 12 gegeben. Multilamellare Liposomen bilden sich spontan, wenn ein trockener Phospholipidfilm in Wasser suspendiert wird. Durch

Energiezufuhr mittels Ultraschall lassen sich aus den multilamellaren Suspensionen einfach und schnell unilamellare Vesikel herstellen, die dann eine mehr oder weniger breite Größenverteilung aufweisen.

1.2.4. Membranfluidität und Phasenübergangstemperatur

Phospholipidmembranen können bei unterschiedlichen Temperaturen in verschiedenen Zuständen vorliegen. Diese Phasenübergänge lassen sich mithilfe kalorimetrischer Messmethoden wie der Mikrokalorimetrie bestimmen^[72]. Bei dem mit dem größten Enthalpieumsatz verbundenen Übergang gehen die Lipidmoleküle in der Doppelschicht von einem geordneten Fest- oder Gelzustand in einen relativ ungeordneten, flüssig-kristallinen Zustand bei höheren Temperaturen über. Die dazugehörige, scharf abgegrenzte Temperatur wird Phasenübergangstemperatur (T_m) genannt. Sie steigt bei vorgegebener polarer Kopfgruppe (z. B. Phosphocholin in Lecithin) mit der Länge der Kohlenwasserstoffreste und deren Sättigungsgrad an. Im geordneten Zustand sind die Fettsäureketten relativ dicht gepackt und maximal gestreckt. Die C-C-Einfachbindungen liegen dabei in der energetisch günstigen antiperiplanaren Konformation (*trans*-Konformation) vor. Die starre Anordnung wird von langen Kohlenwasserstoffresten, die im Gegensatz zu kurzen stärkere van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen, begünstigt, während die Einführung von vornehmlich *cis*-konfigurierten Doppelbindungen, die einen Knick in der Kohlenwasserstoffkette verursachen, die geordnete Packung stört. Beim Überschreiten von T_m treten neben erhöhter Mobilität der polaren Kopfgruppe partiell C-C-Einfachbindungen in *gauche*-Konformation auf, die einen oder mehrere Kettenknicke, auch Kinken genannt, verursachen. Das einfachste und wichtigste Rotationsisomer mit einer Kinke geht aus der *trans*-Konformation durch Drehung um eine C-C-Einfachbindung um 120° in die eine Richtung und um eine der beiden zweitnächst benachbarten C-C-Bindungen um 120° in die entgegengesetzte Richtung hervor^[79]. Dadurch wird einerseits die Kettenlänge verkleinert, andererseits innerhalb der Membran zusätzlich freies Volumen geschaffen. Dies führt dazu, dass im flüssig-kristallinen Zustand bei gleichzeitiger lateraler Expansion der Lipiddoppelschicht (Volumenzunahme) die Schichtdicke abnimmt (Abb. 13 C). Die Kohlenwasserstoffketten in dem „geschmolzenen“ Membraninneren dürfen jedoch nicht so ungeordnet angesehen werden, wie sie es in reinen, flüssigen Kohlenwasserstoffen sind^[46].

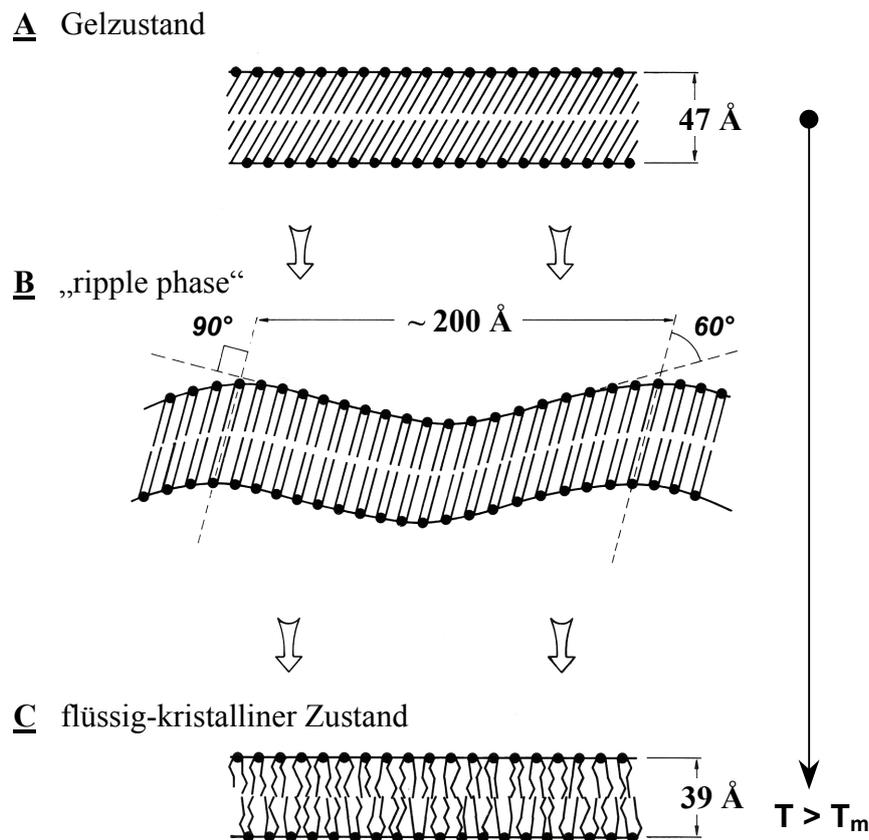


Abb. 13: schematische Darstellung der Struktur einer Phosphatidylcholin-Membran bei verschiedenen Phasenzuständen

Bei Phosphatidylcholin-Doppelschichten sind die Fettsäurereste im Gelzustand um etwa 60° gegen die Membranoberfläche gekippt (Abb. 13 A). Da die zur Oberfläche annähernd parallel ausgerichtete, polare Kopfgruppe eines Lipidmoleküls mit ihren drei am quartären Stickstoff gebundenen Methylgruppen sehr voluminös ist, weichen die Kohlenwasserstoffketten von ihrer senkrechten Orientierung ab, um dementsprechend den von der Kopfgruppe geschaffenen Raum zu füllen und die hydrophoben Ketten benachbarter Lipidmoleküle näher aneinander zu bringen^[72]. Bei derartigen Membranen beobachtet man kalorimetrisch ungefähr 6 – 8 °C unterhalb T_m ein Vorstadium des Phasenübergangs, bei dem es nach Umorientierung der Kopfgruppen und Änderung des Neigungswinkels der Fettsäureketten relativ zur Doppelschicht zur Ausbildung einer wellenförmigen Membranstruktur („ripple phase“)^[80] kommt (Abb. 13 B). Phosphoglyceride mit Ethanolamin-Kopfgruppe, deren Kohlenwasserstoffketten etwa senkrecht zur Membranoberfläche gerichtet sind, zeigen dieses Vorstadium nicht^[46].

Die Membranfluidität ist für das Verhalten von Liposomen in biologischen Systemen von großer Bedeutung, da sie Eigenschaften wie Permeabilität, Fusion, Proteinbindung und Aggregation beeinflusst. Während Prokaryonten (Organismen ohne echten Zellkern) die Fluidität ihrer Membranen durch Variation der Doppelbindungsanzahl und der Länge ihrer Fettsäureketten regulieren, bewerkstelligen Eukaryonten (Organismen mit echtem Zellkern) dies hauptsächlich durch Einbau von Cholesterin in ihre Membranstruktur. Die

eingelagerten Cholesterinmoleküle sind mit ihrer Hydroxy-Gruppe über Wasserstoffbrückenbindung in der polaren Kopfregion verankert, wobei das Steroidgerüst in das Innere einer Lipiddoppelschicht gerichtet ist (Abb. 14). In

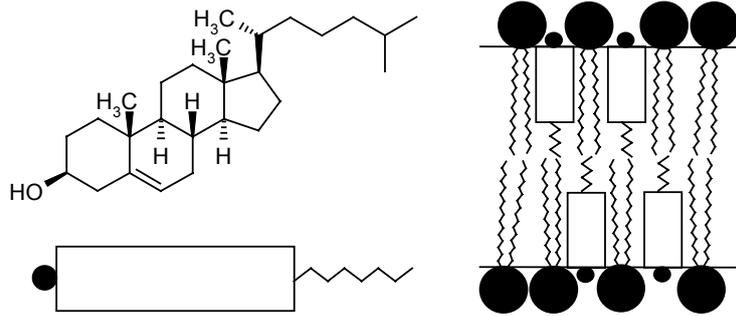


Abb. 14: Cholesterin und schematische Darstellung der Anordnung in einer Lipiddoppelschicht

natürlichen Membranen kann das molare Verhältnis Cholesterin zu Phospholipid bis auf 1:1 ansteigen. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur stört Cholesterin als „Fremdkörper“ die geordnete Struktur der Membran und erhöht so ihre Fluidität, während es im flüssig-kristallinen Zustand oberhalb T_m die Bewegungen der Kohlenwasserstoffketten einschränkt und dadurch eine Abnahme der Membranfluidität bewirkt^[72]. Auch Carotinoide können sich in Lipiddoppelschichten einlagern und eine Änderung der Membraneigenschaften verursachen.

1.2.5. Carotinoide in Membranen

Eine in physiologischer Hinsicht wichtige Eigenschaft der Carotinoide ist ihre Fähigkeit, sich in Lipiddoppelschichten einzulagern. Aufgrund ihrer Lipophilie sind sie im hydrophoben Membraninneren lokalisiert, ihre Ausrichtung und Orientierung wird jedoch von der Länge und Funktionalisierung des Carotinoidmoleküls und von der Art des Phospholipids bestimmt. Wie Untersuchungen mittels Resonanz-Raman- oder Linear-dichroismus-Spektroskopie beweisen, tendieren unpolare Carotine wie β -Carotin 3

dahin, sich mit ihrer Polyenkette parallel zur Membranoberfläche anzuordnen^[81,82] oder zeigen je nach chemischer Zusammensetzung des Phospholipids keine bevorzugte Orientierung in der Membran^[83]. Polare Dihydroxycarotinoide wie z. B. (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** lagern sich dagegen nahezu senkrecht in die Membran ein, so dass ihre beiden Hydroxy-Endgruppen in die gegenüberliegenden polaren Kopffregionen hineinragen können (Abb. 15).

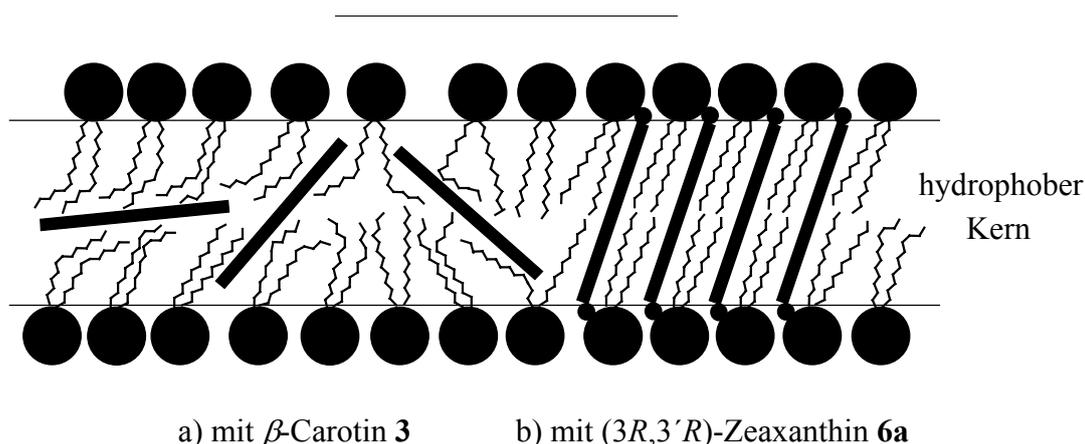


Abb. 15: schematische Darstellung der Orientierung von a) β -Carotin **3** und b) (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** in einer Lipidmembran entsprechender Dicke

Dabei nimmt die Polyenkette je nach Membrandicke einen gewissen Winkel mit der Normalen zur Doppelschichtoberfläche ein, was durch Messungen mithilfe der Röntgen-Diffraktometrie und des Lineardichroismus gezeigt wurde^[84,85]. Derartige Xanthophyllmoleküle durchspannen also die Membran und fungieren als „molekulare Niete“, die die beiden Lipiddoppelschichthälften verbinden. Ihr Einlagerungsvermögen in unilamellare Vesikel ist größer, wenn die Länge des Carotinoidmoleküls in etwa der Membrandicke entspricht^[86,87]. Die Auswirkungen der Carotinoide auf die strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Phospholipidmembranen konnte durch Differenzkalorimetrie (DSC)^[88-92], NMR-Spektroskopie^[29,88,93] und durch ESR-Experimente mit spinmarkierten Substanzen^[94-98] beschrieben werden. Während vor allem β -Carotin **3** im Festphasenzustand einer aus gesättigten Phospholipiden bestehenden Membran die Bewegungsfreiheit der Kohlenwasserstoffketten erhöht und ihre Ordnung stört, reduzieren (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** und Lutein **7** oberhalb der Phasenübergangstemperatur die Bewegungen der Fettsäureketten und festigen somit die Membranstruktur. Letztere verstärken zudem die hydrophobe Barriere der Membran für

polare Moleküle und Ionen^[87,98,99] und vermindern das Eindringen von kleinen unpolaren Molekülen wie Sauerstoff in das Membraninnere^[95]. Polare Carotinoide können also in prokaryotischen Zellen die Regulierung ihrer Membraneigenschaften und -fluidität übernehmen ähnlich dem Cholesterol in Eukaryonten^[100]. In den Zellmembranen des thermophilen Bakteriums *Thermus thermophilus* identifizierte man verzweigte Fettsäureester eines Zeaxanthinmono- und diglucosides, auch Thermozeaxanthin und Thermobiszeaxanthin genannt^[101,102]. Diese Zeaxanthinderivate stabilisieren die Membranen^[103], indem sie , mit ihrer Glucosekomponente an der Oberfläche gelegen und ihrem Fettsäureschwanz im Lipidinneren verankert, sie durchspannen (Abb. 16) und ermöglichen so das Wachstum der Bakterien bei höheren Temperaturen.

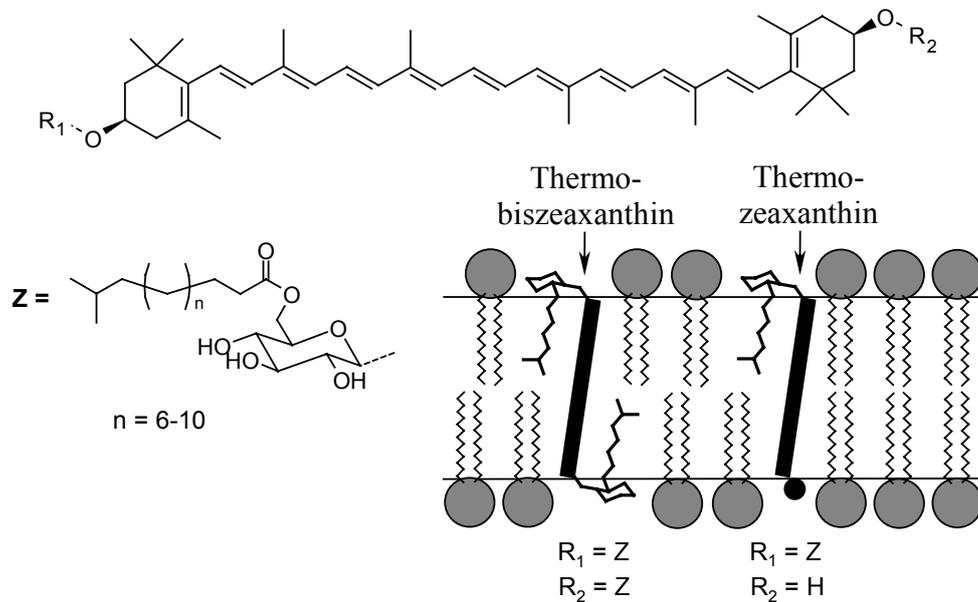


Abb. 16: Strukturen von Thermo(bis)zeaxanthin und Ausrichtung in der Membran eines thermophilen Bakteriums

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt betrifft die Carotinoidaggregation in der Membran, die die physikochemischen Membranattribute entscheidend beeinflusst. Speziell die durch Aggregation geänderten optischen Eigenschaften der Carotinoide werfen Fragen zu ihrer Bedeutung in photochemischen Prozessen auf. Demnach ist es z. B. von Interesse, inwiefern eine Regulierung des Aggregationsverhaltens über die Beschaffenheit und temperaturabhängige Zustandsform der Membran erfolgen kann. Dabei sind die Carotinoide nach Art und Funktionalisierung ihrer Endgruppen zu unterscheiden.

1.3. Zielsetzung

Als Modellsystem für die Untersuchung der Einlagerung und Aggregation von Carotinoiden in Membranen sollen unilamellare Liposomen dienen, in denen die Carotinoide mit steigenden Konzentrationen eingebaut werden. Die Präparation orientiert sich dabei an einer von *Schmitz*^[104] praktizierten Methode, der die Carotinoide β -Carotin **3**, (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** und Lutein **7** mit jedoch nur maximal 0.25 mol% (bezogen auf das Phospholipid) in unilamellare Vesikel einlagerte. Schon bei diesen kleinen Carotinoidkonzentrationen erwies sich für β -Carotin **3** im Vergleich zu den hydroxylierten Xanthophyllen die Ausbeute der Einlagerung in die Lipidmembran mit nur 40 % als zu niedrig, so dass zunächst Xanthophylle mit Hydroxygruppen prädestiniert scheinen. Neben der Darstellung von Carotinoiden mit entsprechenden Fünfring- oder aromatischen Endgruppen können zu Vergleichszwecken die weniger polaren acetylierten Derivate synthetisiert werden. Die präparierten Vesikelsuspensionen sind auf ihren tatsächlichen Carotinoid- und Lipidgehalt zu prüfen. Die Beschaffenheit ausgewählter Präparationen kann dabei mithilfe der Elektronenmikroskopie überprüft werden. Die Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Carotinoide in den Liposomen ist über temperaturabhängige UV/VIS-Spektroskopie zugänglich, bei der die unterschiedlichen Phasenzustände der Membran durchlaufen werden. Im Fall chiraler Xanthophylle kann dabei mit Zuhilfenahme der CD-Spektroskopie zusätzliche Information über die Aggregatestruktur erhalten werden. Die Interpretation der Ergebnisse ist dabei auf Grundlage der Carotinoidstruktur im Vergleich zur Carotinoidaggregation in wässrigen Systemen^[105] und damit auch in Hinsicht auf eine mögliche physiologische Bedeutung zu führen.

2. Hauptteil

2.1. Synthese

2.1.1. Syntheseziele

Zunächst bieten sich als natürlich vorkommende Carotinoide die terminal hydroxylierten Xanthophylle mit Sechsring-Endgruppe für die Einlagerung in die Lipiddoppelschicht von unilamellaren Vesikeln an. Ihre gerichtete Orientierung in der Membran durch Wechselwirkung ihrer Hydroxygruppen mit den polaren Kopfregionen der Doppelschicht sollte zu einem großen Inkorporationsvermögen führen. Erste ausführliche Untersuchungen zur Wahl des Phospholipids und sonstiger Versuchsparemeter werden mit Astaxanthin **9** durchgeführt, das von der BASF AG zur Verfügung gestellt wurde. Desweiteren eignen sich für die Einlagerung das optisch aktive Lutein **7** und das Zeaxanthin **6**, das aber erst durch Kopplung von Mittelbaustein und vorhandener Endgruppe synthetisiert werden muß. Eine starke Veränderung des Aggregations- und Einlagerungsverhaltens wird nach Acetylierung der Hydroxygruppen erwartet, die die Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen untereinander ausschaltet. Durch Übergang zu den 2,2'-Dinorcarotinoiden kann untersucht werden, wie sich die verstärkte Koplanarität der Fünfring-Endgruppen mit der Polyenkette auf die Wechselwirkung mit der Phospholipidmembran auswirkt. Darüber hinaus sind unterschiedlich substituierte Carotinoide mit aromatischen Endgruppen interessant, die mit ihren sandwichartig gestapelten Benzolringen ausgeprägte H-Aggregatebildner sind^[105].

2.1.2. Alicyclische Xanthophylle

2.1.2.1. Wittig-Olefinierung zu Zeaxanthin 6

Für die Synthese von Carotinoiden hat sich grundsätzlich das Prinzip bewährt, die Endgruppen und die Polyenkette getrennt voneinander zu synthetisieren und erst im

letzten Reaktionsschritt miteinander zu koppeln. Als Verknüpfungsreaktionen unter Ausbildung einer C=C-Doppelbindung sind dabei die Wittig-Reaktion^[106,107] und als Variante die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion^[108,109] am weit gebräuchlichsten. Die technischen Synthesen führen bevorzugt über die C₁₅-Phosphoniumsalze als Endgruppen, die in einer doppelten Wittig-Kupplung mit dem C₁₀-Dialdehyd 2,7-Dimethylocta-2,4,6-triendial **16** das fertige C₄₀-Carotinoid liefern:



Zur Darstellung von Zeaxanthin **6** steht das C₁₅-Phosphoniumsalz **15** von der BASF AG zur Verfügung, welches einfach aus 3-Hydroxy- β -ionon **13** gewonnen werden kann^[110]. Eine Grignard-Reaktion von **13** mit Vinylmagnesiumbromid führt zum Vinylalkohol **14**, der nach Behandlung mit Triphenylphosphoniumbromid und anschließendem Anionenaustausch mit Natriumchlorid das Wittig-Reagenz **15** liefert.

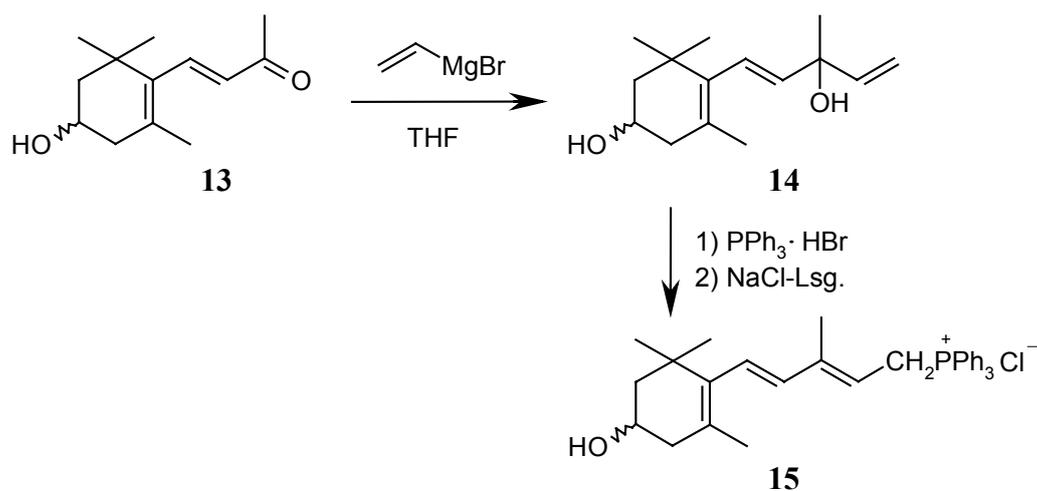


Abb. 17: Gewinnung des Zeaxanthin-Phosphoniumsalzes **15**

V 1

Bei der Wittig-Reaktion wird das Phosphoniumsalz **15** im Verhältnis 4:1 mit dem C₁₀-Dialdehyd **16** und Natriummethanolat als Base in absolutem Methanol bei RT umgesetzt. Nach Aufarbeitung fällt Zeaxanthin **6** als oranges Pulver in einer Ausbeute von 46 % an und ist dabei nach Analyse der Signale im ¹H-NMR-Spektrum in Verbindung mit ihren Kopplungskonstanten zu über 95 % (all-*E*)-konfiguriert^[111].

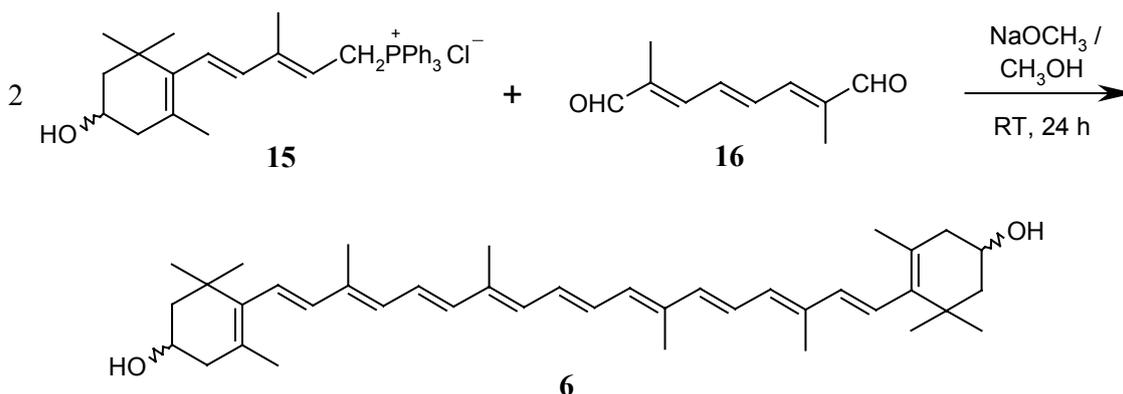


Abb. 18: Wittig-Reaktion zu Zeaxanthin **6**

2.1.2.2. Acetylierung der Sechsringxanthophylle

Die Veresterung aller in den Xanthophyllen vorkommenden Hydroxygruppen sollte neben dem geänderten Aggregationsmuster vom H-Aggregate- zum J-Aggregatetyp auch einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten und die Anordnung der Carotinoide in einer Lipiddoppelschicht haben. Für derartige Untersuchungen werden die Xanthophylle Zeaxanthin **6**, Lutein **7** und Astaxanthin **9** in einfacher Weise acetyliert. Als gängige Synthesemethode bietet sich dafür die Alkoholyse von Säureanhydriden oder Säurechloriden an, die infolge gesteigerter Carbonylreaktivität wesentlich leichter abläuft als die entsprechender Carbonsäuren oder Ester^[112]. Für die Acetylierung der säureempfindlichen Xanthophylle wird die Reaktion mit Essigsäureanhydrid bei RT unter basischer Katalyse mit Pyridin gewählt, das gleichzeitig als Lösemittel dient. Das Essigsäureanhydrid wird dabei in großem Überschuss zum Carotinoid und im ungefähren molaren Verhältnis von 5:2 zum Pyridin eingesetzt. Auf diese Weise wird unter möglichst milden Bedingungen eine unzureichende Monoacetylierung des Carotinoids ausgeschlossen. Der Erhalt kleiner acetylierter Carotinoidmengen von typischerweise 10 mg macht dabei eine säulenchromatographische Aufreinigung nötig, während ansonsten das acetylierte Produkt einfach nach Lösemittelaustausch aus einer Dichlormethanlösung mit Methanol gewonnen werden kann. So erhält man die Xanthophyllester Zeaxanthindiacetat **17**, Luteindiacetat **18** und Astaxanthindiacetat **19**.

V 2
V 3
V 4

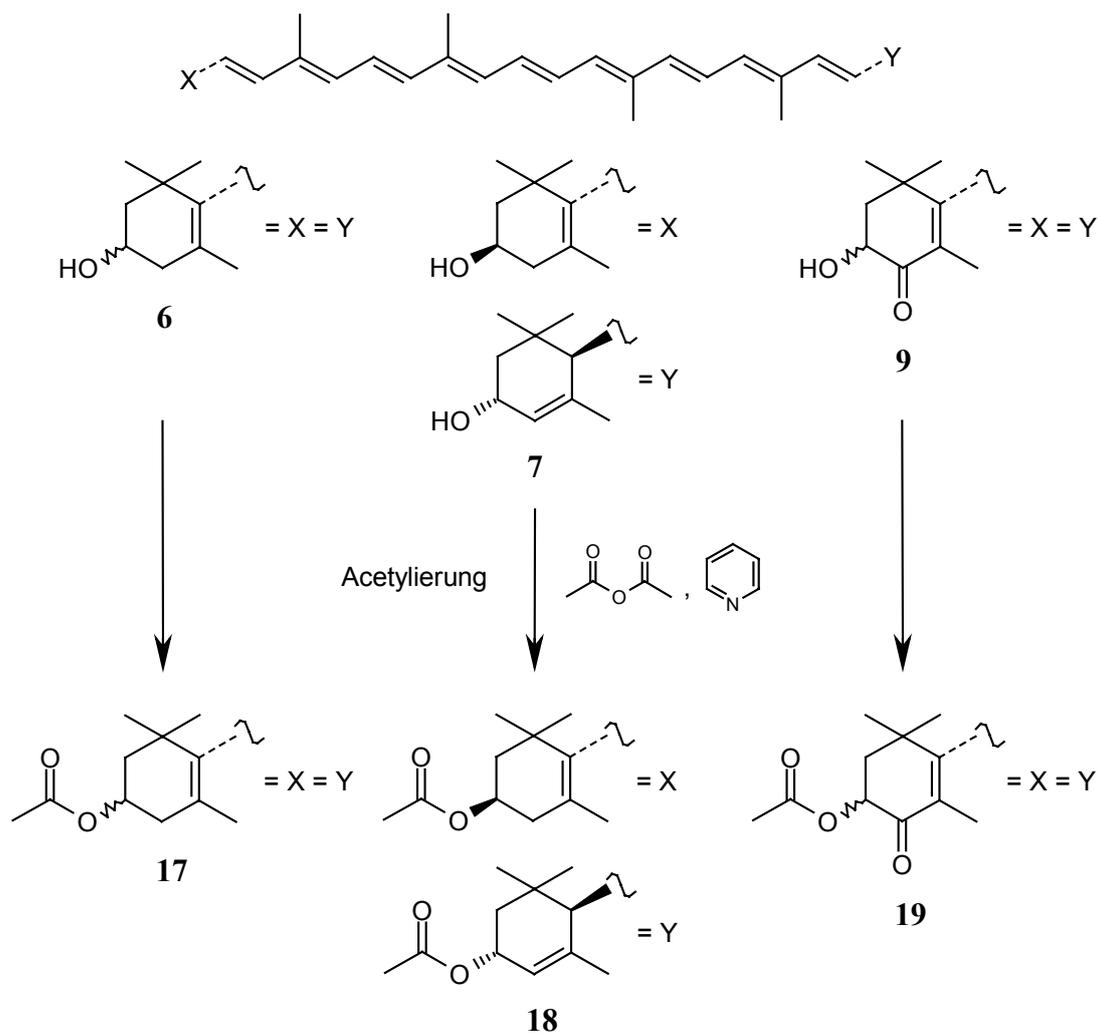


Abb. 19: Darstellung von Zeaxanthindiacetat **17**, Luteindiacetat **18** und Astaxanthindiacetat **19**

2.1.2.3. Darstellung des Luteindimethylethers **20**

Die Bereitstellung von chiralen Carotinoiden ermöglicht vor allem CD-spektroskopische Untersuchungen derselben in einer Phospholipidmembran. Deshalb wird zusätzlich zum Diacetat **18** der Dimethylether **20** des optisch aktiven Luteins **7** synthetisiert. Erste Versuche zur Methylierung der Hydroxygruppen werden bei RT mit festem Silber(I)-oxid und Methyljodid in Chloroform unter Zugabe von trockenem Magnesiumsulfat gemacht^[113]. Dies führt jedoch zu keinem verwertbaren Ergebnis und liefert nach säulenchromatischer Aufarbeitung nur Zersetzungsprodukte. Bessere Resultate ergibt die Umsetzung von Lutein **7** mit einem 100fachen Überschuss Methyljodid und frisch hergestelltem Kalium-*tert*-butylat in einem Benzol/*tert*-Butanol-

Gemisch. Die Reaktion verläuft jedoch sehr langsam und auch nach längerer Reaktionszeit, erneuerter Zugabe von Kalium-*tert*-butylat und Methyljodid und weiteren Optimierungsversuchen werden nach Aufarbeitung neben nur 26 % des gewünschten Dimethylethers **20** in großen Anteilen die monomethylierten Produkte isoliert. Diese können zur vollständigen Methylierung erneut der Reaktion unterzogen werden, wobei auch hier die Gesamtausbeute 30 % kaum übersteigt. Höchstwahrscheinlich wird bevorzugt der *tert*-Butylmethylether gebildet, bevor die Deprotonierung und Methylierung des Luteins **7** erfolgen kann.

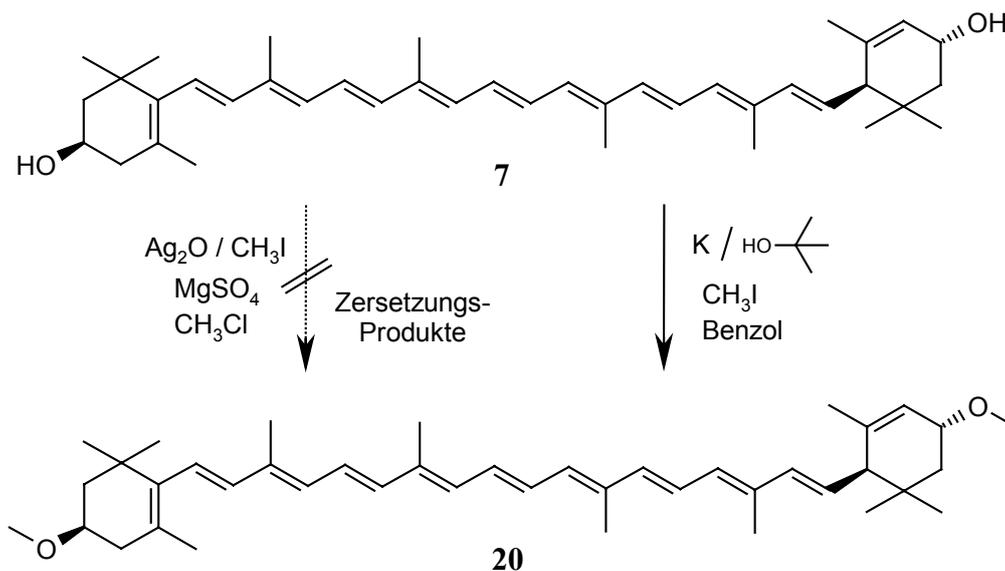
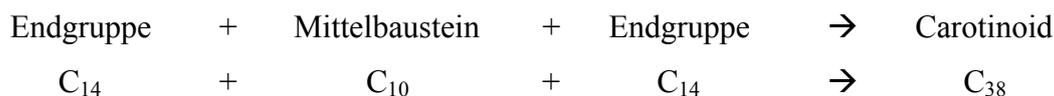


Abb. 20: Versuche zur Darstellung des Luteindimethylethers **20**

2.1.2.4. Das 2,2'-Dinorcarotinoid Actinioerythrol 26

Ausgehend von Astaxanthin **9** führt eine Ringkontraktion zum tiefroten 2,2'-Dinorcarotinoid Actinioerythrol **26**, das eine im Vergleich zu seinem Sechsring-Analogen um 30 nm bathochrom verschobene Hauptabsorptionsbande aufweist. Die Erklärung liegt in der Koplanarität der Hydroxycyclopentenon-Endgruppen mit der Polyenkette und dem damit resultierenden Beitrag der beiden Carbonyl- und terminalen Ringdoppelbindungen zum konjugierten Doppelbindungssystem begründet^[114]. Die sich daraus ergebenden Änderungen ihres Verhaltens in unilamellaren Vesikeln soll nun untersucht werden. Im Jahr 1933 isolierten *Lederer und Fabre*^[115,116] aus der roten Variante der Seeanemone *Actinia equina* ein kristallines, dunkelrotes Pigment, welchem

sie den Namen Actinioerythrin gaben und das sich nach Strukturaufklärung 36 Jahre später als ein Fettsäureestergemisch mit der gemeinsamen Diolkomponente Actinioerythrol **26** herausstellte^[117]. Eine praktikabler totalsynthetischer Zugang zu **26** wurde von *Stenhorst*^[118] im Arbeitskreis *Martin* vorgestellt und meinerseits optimiert^[119]. Die Syntheseroute richtet sich dabei nach folgendem Syntheseprinzip, bei dem im letzten Schritt das C₁₄-Phosphoniumsalz **25** in einer zweifachen Wittig Reaktion mit dem C₁₀-Dialdehyd **16** gekoppelt wird:



Als Fünfringkomponente wird vom vorhandenen Monoketalaldehyd **21** ausgegangen, der seinerseits in fünf Schritten aufgebaut werden kann^[119]. Dieser wird in einer Wittig-Horner-Reaktion mit dem diastereomeren C₅-Phosphonatgemisch **22a/b** umgesetzt, das nach dreistufiger Synthese aus 3,3-Dimethylacrylsäure leicht zugänglich ist^[119].

V 6

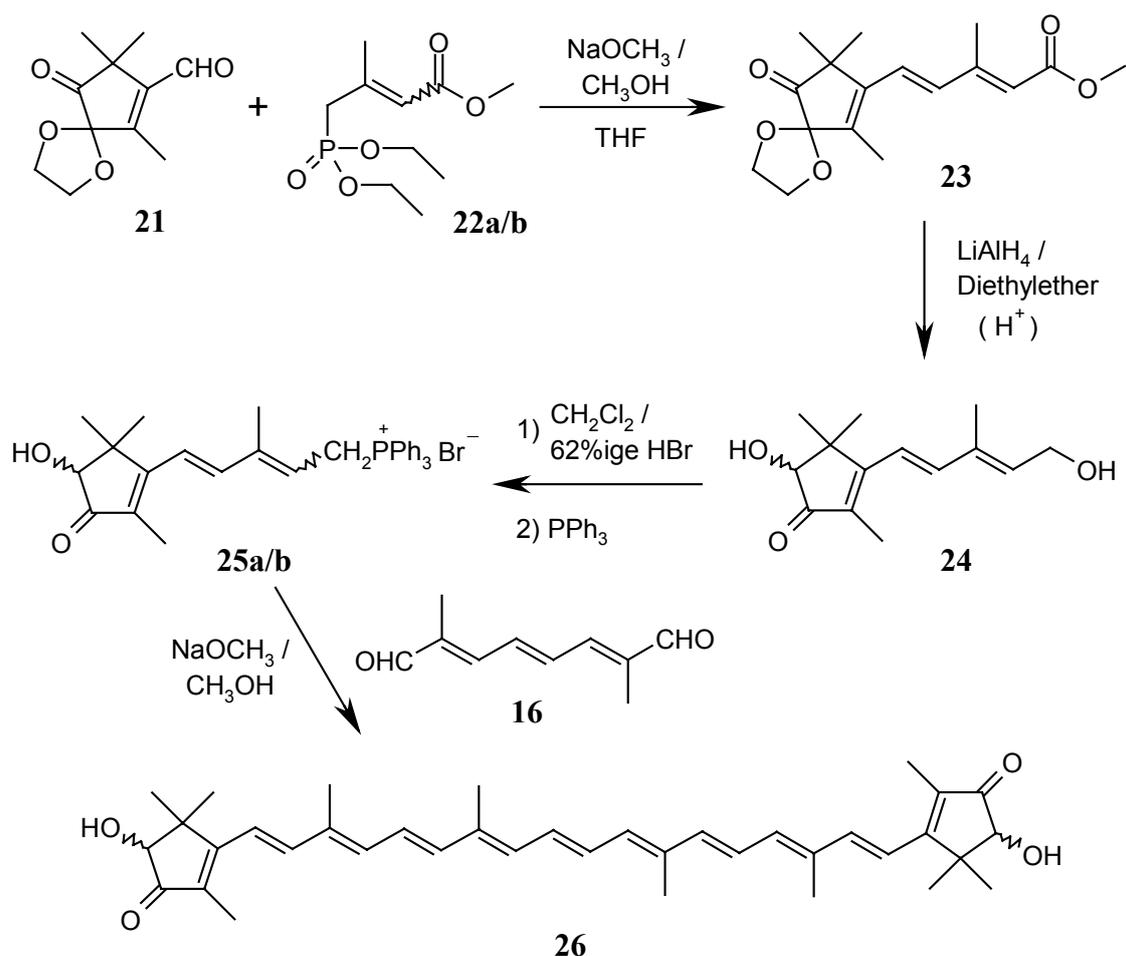


Abb. 21: Verlauf der Synthese von Actinioerythrol **26**

Die Reaktion verläuft bei RT mit Natriummethanolat in Methanol als Base. Unter Verwendung von THF anstelle von Methanol als Lösemittel erhält man nach Kristallisation aus Diethylether als einziges Stereoisomer den (all-*E*)-konfigurierten Ketoester **23**. Dieser wird anschließend einer Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether unterworfen, wobei sowohl die Keto- als auch die Estergruppe zum Alkohol reduziert werden. Die leicht saure Aufarbeitung führt schon größtenteils zur Entfernung der 1,3-Dioxolanschutzgruppe, was im nächsten Reaktionsschritt vervollständigt wird. Nach unumgänglicher säulenchromatographischer Reinigung erhält man das Diol **24** wiederum als (all-*E*)-Isomer. Im Folgenden schließt sich eine Bromierung mit 62%iger Bromwasserstoffsäure in Dichlormethan bei 0 °C zum entsprechenden Allylbromid an, das nach Zugabe von Triphenylphosphan zum Phosphoniumsalz **25a/b** umgesetzt wird. Bei der Bromierung tritt (*E/Z*)-Isomerisierung ein, so dass das Produktgemisch zu einem kleinen Anteil aus dem (9*Z*)-konfigurierten Isomer **25b** besteht. Letztendlich wird in einer Wittig-Reaktion das Phosphoniumsalz **25a/b** im Verhältnis 4:1 mit dem C₁₀-Dialdehyd **16** und Natriummethanolat als Base in Methanol bei 0 °C umgesetzt. Nach Umkristallisation erhält man das sauerstoffempfindliche Carotinoid Actinioerythrol **26** als violettglänzende Kristalle.

V 7

V 8

V 9

2.1.2.5. Derivate des Actinioerythrols

Zum Vergleich drängen sich nun für die Untersuchung in Liposomen Xanthophylle ebenfalls mit Cyclopentengrundgerüst als Endgruppen auf, denen aber die freien Hydroxygruppen fehlen. Dafür wird Actinioerythrol **26** zunächst zum Diacetat umgesetzt. Dies erfolgt bei RT in Dichlormethan unter Zugabe äquimolarer Mengen Acetylchlorid und Pyridin in etwa 100fachem Überschuss. Die Acetylierung ist schon nach ungefähr 15 min beendet (DC-Kontrolle) und man erhält nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung Actinioerythroidiacetat **27** als dunkelrot-violetten Feststoff. Das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 90, Seite 154) bestätigt das Vorliegen des ausschließlich (all-*E*)-konfigurierten, thermodynamisch stabilen Isomeren.

V 10

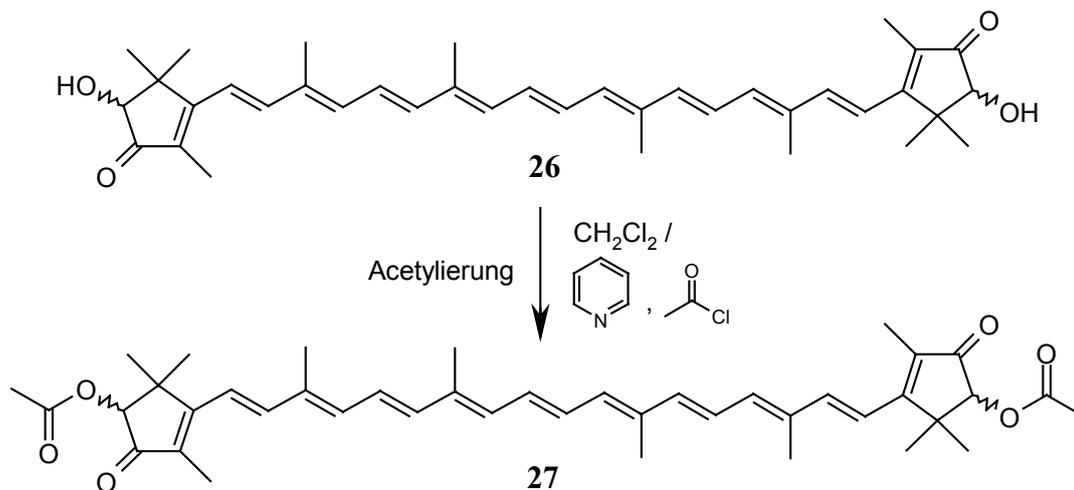


Abb. 22: Darstellung von Actinioerythrodiacetat **27**

Im obigen Beispiel wurde beim Actinioerythrol **26** die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken durch Acetylierung der Hydroxygruppen ausgeschaltet. Eine zweite Möglichkeit ist die Oxidation der Acyloineinheiten zu α -Diketonen. Das lässt sich durch Versetzen von **26** mit einem Überschuss Mangandioxid in Dichlormethan erreichen^[118]. Das Produkt der zweifachen Oxidation Violerythrin **28** kann nach Abfiltration des Oxidationsmittels und Ausfällen in Methanol in ausreichender Reinheit erhalten werden. Es zeichnet sich neben seiner tiefblauen Farbe durch seine sogar in chlorierten Lösemitteln schlechte Löslichkeit aus.

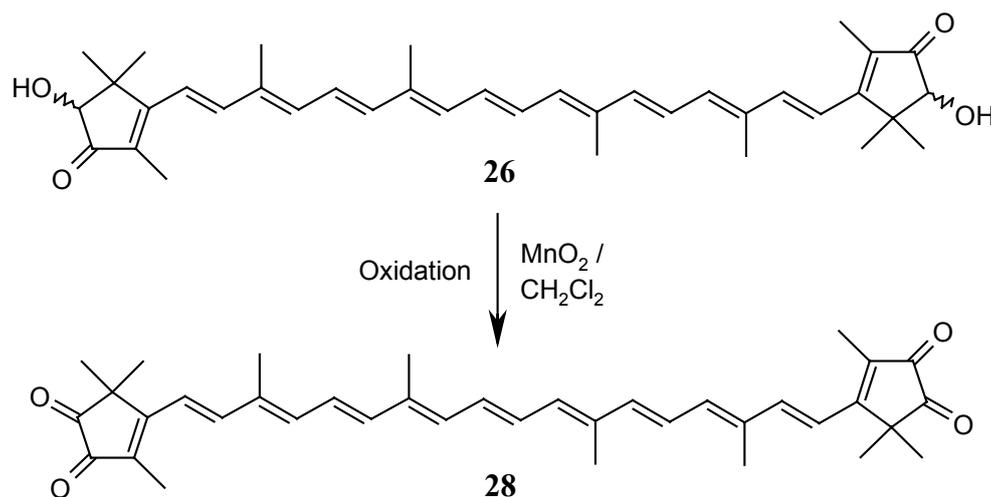


Abb. 23: Darstellung von Violerythrin **28**

2.1.3. Aromatische Carotinoide

Eine weitere Klasse natürlich vorkommender Carotinoide enthält aromatische Endgruppen. Diese Carotinoide zeigen an ihren Phenylringen alle ein 1,2,3- oder 1,2,5-Trimethylsubstitutionsmuster, beide zusammen realisiert im Pigment Renieraten **29** (ϕ,χ -Carotin), das als erstes aromatisches Carotinoid in dem marinen Organismus

Reniera japonica,

einem japanischen Meeresschwamm, gefunden wurde^[120,121].

Seine Entdeckung brachte die Frage nach phenolischen Carotinoiden auf, die zwölf

Jahre später 1969 aus dem Bakterium *Strep-*

tomyces mediolani isoliert wurden^[122]. Diese Vertreter mit 3-Hydroxy- oder 3,3'-Dihydroxysubstitution der aromatischen Endruppen in para-Stellung zur Polyenkette konnten später auch in *Brevibacterium linens*, einem Corynebakterium gebräuchlich bei der Käsureifung, nachgewiesen werden^[123]. Eine Totalsynthese von 3,3'-Dihydroxyisorenieraten **30**, das eine enorme Wirkungsweise auf dem antioxidativen Sektor verspricht, wird derzeit im Arbeitskreis *Martin* angestrebt^[124]. Für die Untersuchung der Aggregationseigenschaften in Vesikeln sollen zunächst Carotinoide mit einfachen phenolischen Endgruppen ohne Methylsubstitution und ihre Derivate genügen.

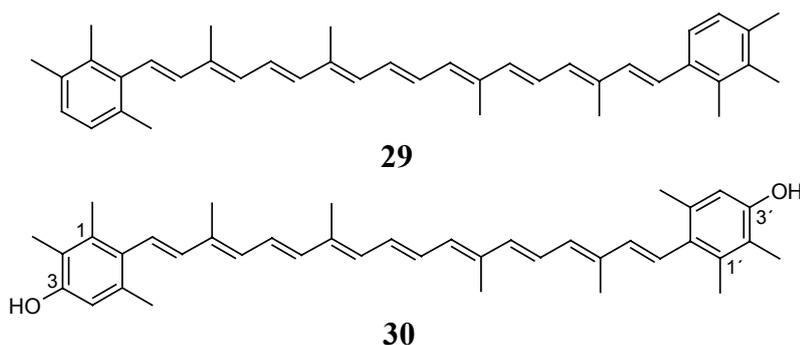


Abb. 24: natürlich vorkommende aromatische Carotinoide Renieraten **29** und 3,3'-Dihydroxyisorenieraten **30**

2.1.3.1. 3,3'-Dimethoxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin **35**

Bei der Darstellung von Carotinoiden mit aromatischen Endgruppen hat sich die Wittig-Umsetzung eines geeigneten C_{20} -Dialdehyds mit den passenden Benzylphosphoniumsalzen als sehr effizient erwiesen^[125-129]. Dabei können Methoxy-Substituenten am Aromaten aufgrund der Säure- und Basenstabilität der Etherbindung von Beginn der Synthese an vorhanden sein. Gemäß dem natürlichen Substitutionsmuster soll zunächst eine Methoxygruppe in para-Stellung zur Polyenkette eingeführt werden. Dabei geht

V 12

man von 4-Methylanisol **31** aus, das zuerst in einer Wohl-Ziegler-Bromierung^[130] in Benzylposition mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) in Tetrachlormethan bromiert wird. Das

V 13

entstandene Benzylbromid **32** wird anschließend mit Triphenylphosphan in siedendem Toluol umgesetzt, wobei das Phosphoniumsalz **33** ausfällt. Dieses wird letztendlich mit

V 14

Butyllithium in THF bei -78 °C zum Ylid deprotoniert und mit Crocetininaldehyd **34** zum Dimethoxycarotinoid **35** gekoppelt.

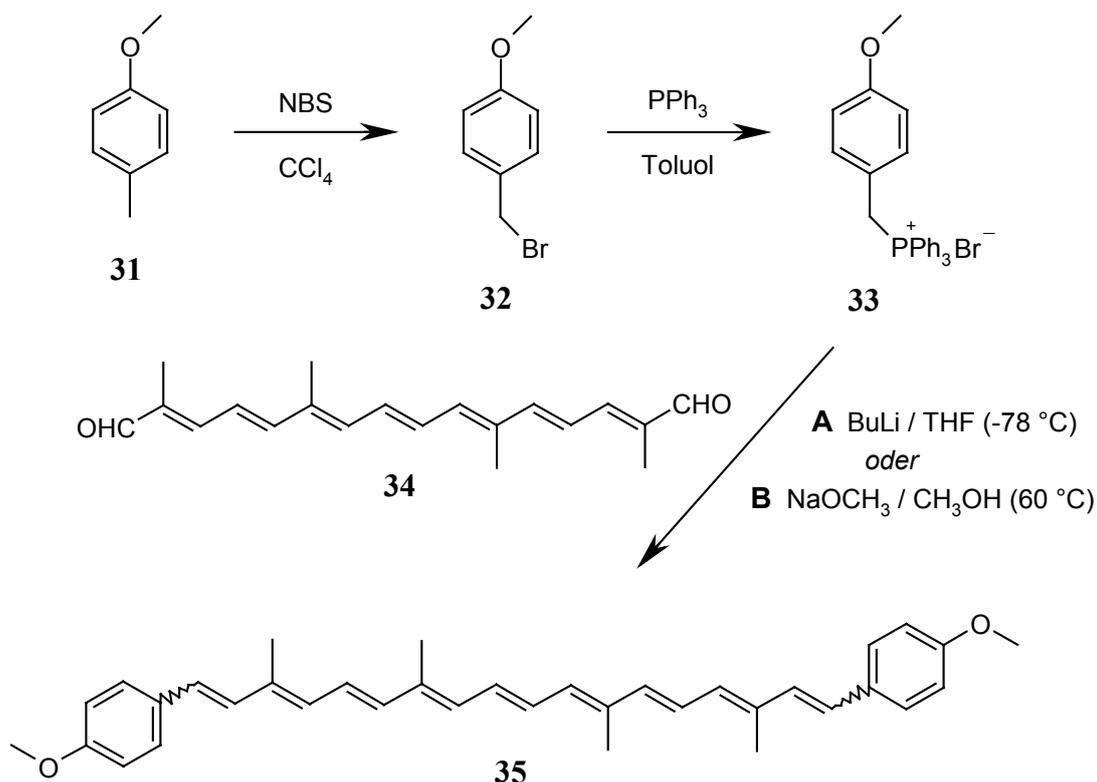


Abb. 25: Synthese des Dimethoxycarotinoids **35**

Die bei tieferen Temperaturen kinetisch kontrollierte Wittig-Reaktion mit einem wenig stabilisierten Ylid liefert dabei vorwiegend (*7Z*)- und (*7'Z*)-konfigurierte Doppelbindungen. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **35** zeigt zwei Singulets für die Protonen der Methoxygruppen, jeweils ein Singulett für die entweder in (*E*)- oder in (*Z*)-Konfiguration neu generierte Doppelbindung (Abb. 26 A). Die Integration der beiden Signale ergibt ein (*E/Z*)-Verhältnis von etwa 1:2. Die Verwendung von Natriummethanolat in Methanol als Base in der Wittig-Kopplung erfordert dagegen deutlich längere Reaktionszeiten bei einer erhöhten Temperatur von 60 °C . Hierbei wird zwar hauptsächlich das (*all-E*)-Isomer von **35** gebildet, jedoch treten zusätzlich unerwünschte Isomerisierungen an weiteren Doppelbindungen auf. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **35**

erkennt man nun vier Singulets im Resonanzbereich der Methoxygruppen (Abb. 26 B). Thermische Isomerisierungsversuche in Hexan oder Chloroform des mit Butyllithium dargestellten Carotinoids **35** in Richtung des (all-*E*)-Isomers schlugen wohl aufgrund zu niedriger Siedepunkte der Lösemittel fehl.

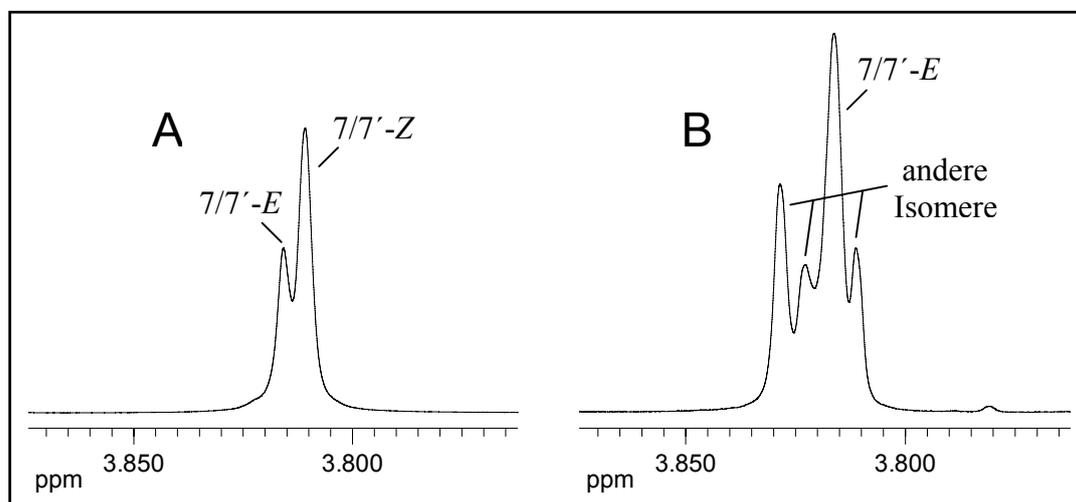


Abb. 26: Ausschnitte des Resonanzbereichs der Methoxygruppen aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in Chloroform von **35**, synthetisiert mit **A** Butyllithium und **B** Natriummethanolat als Base

Erfolg brachte dagegen ein 24-stündiges Erhitzen von **35** in Heptan (Sdp.: 98 °C) nach Lösemittelaustausch aus Dichlormethan. Im UV/VIS-Spektrum in Chloroform zeigt sich die Isomerisierung durch eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 13 nm und durch eine nun stark ausgeprägte Schwingungsfeinstruktur an. Das (all-*E*)-Isomer von **35** ist jedoch in allen gängigen Lösemitteln höchstens minimal löslich (in Chloroform noch am besten), so dass kein vollständig interpretierbares $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen werden kann. Diese geringe Löslichkeit setzt der Untersuchung der Einlagerung in Liposomen schnell eine Grenze, da bei der Präparation Lipid und Carotinoid zunächst monomer gelöst vorliegen müssen.

2.1.3.2. Versuche zur Darstellung eines phenolischen Carotinoids

Die Synthese von aromatischen Carotinoiden mit freien phenolischen Hydroxygruppen macht die Verwendung einer Schutzgruppe erforderlich. Der basenkatalysierten Wittig-Reaktion geht unter Verwendung eines phenolischen Phosphoniumsalzes immer eine Deprotonierung zum entsprechenden Phenolat voraus, deren Einführung einer negativen

Ladung die nachfolgende Deprotonierung zum Ylid verhindert oder zumindest stark einschränkt. Phenolische Phosphonate können analog in einer Wittig-Horner-Reaktion ebenfalls nicht umgesetzt werden^[23]. Da das Entschützen im letzten Schritt am fertigen Carotinoid durchgeführt wird, sollte die Schutzgruppe unter äußerst milden Bedingungen entfernbar sein. Die Einführung einer Trimethylsilylschutzgruppe scheint in erster Linie nicht sinnvoll, da der bei der anschließenden NBS-Bromierung in Spuren freigesetzte Bromwasserstoff schon eine Spaltung des Silylethers bewirken kann. Deshalb soll das Phenol zunächst als Benzoat geschützt werden, das als Ester keine α -ständigen CH-aciden Protonen besitzt. Für die Einführung einer Hydroxy-Gruppe in para-Stellung zur Polyenkette geht man von 4-Methylphenol **36** (*p*-Kresol) aus, das in einer Einhorn-Reaktion mit Benzoylchlorid in Pyridin zum festen Benzoessäureester **37** umgesetzt wird^[112]. Es folgt eine Wohl-Ziegler-Bromierung von **37** mit NBS in Tetrachlormethan zum Benzylbromid **38**, das anschließend mit Triphenylphosphan in siedendem Toluol zum Phosphoniumsalz **39** reagiert.

V 15

V 16

V 17

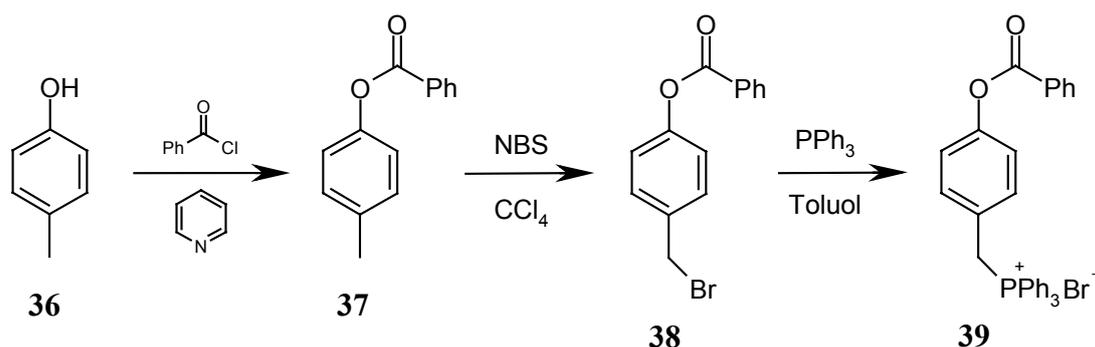


Abb. 27: Synthese des geschützten Wittigsalzes **39**

Die Verwendung von nucleophilen Alkoxid-Basen in der darauffolgenden Wittig-Reaktion ist nicht angebracht, da sie leicht eine Esterspaltung bewirken können, bevor eine Deprotonierung zum Ylid erfolgen kann. Deshalb wird **39** in THF mit Butyllithium als Base bei -78°C umgesetzt und im Verhältnis 8:1 mit Crocetininaldehyd **34** zur Reaktion gebracht. Nach 24 h und Erwärmen auf RT ist der Dialdehyd **34** abreagiert und sowohl das benzoylgeschützte Carotinoid **40** als auch das schon entschützte Pendant **41** sind dünnschichtchromatographisch nachweisbar ($R_f(\mathbf{40}) = 0.95$, $R_f(\mathbf{41}) = 0.45$ in Dichlormethan/Ether = 10:1). Zur Vervollständigung der Esterspaltung lässt man noch länger bei RT rühren (DC-Kontrolle) und erhält nach Hydrolyse und Aufarbeitung ein dunkelrotes Öl. Eine Isolierung des Dihydroxycarotinoids **41** ist jedoch nicht

möglich, da auch während der säulenchromatographischen Reinigung unter versucht inerten Bedingungen stets Zersetzung von **41** stattfindet, auf der DC-Platte durch eine blau-braune Verfärbung zu erkennen. Das als vinylog verlängertes Hydrochinon aufzufassende Carotinoid **41** geht dabei oxidativ äußerst leicht in das instabile chinoide Retrocarotinoid **42** mit blauer Farbe über, wie dies auch beim zusätzlich methyl-substituierten 3,3'-Dihydroxyisorenieraten **30** beobachtet wurde^[131].

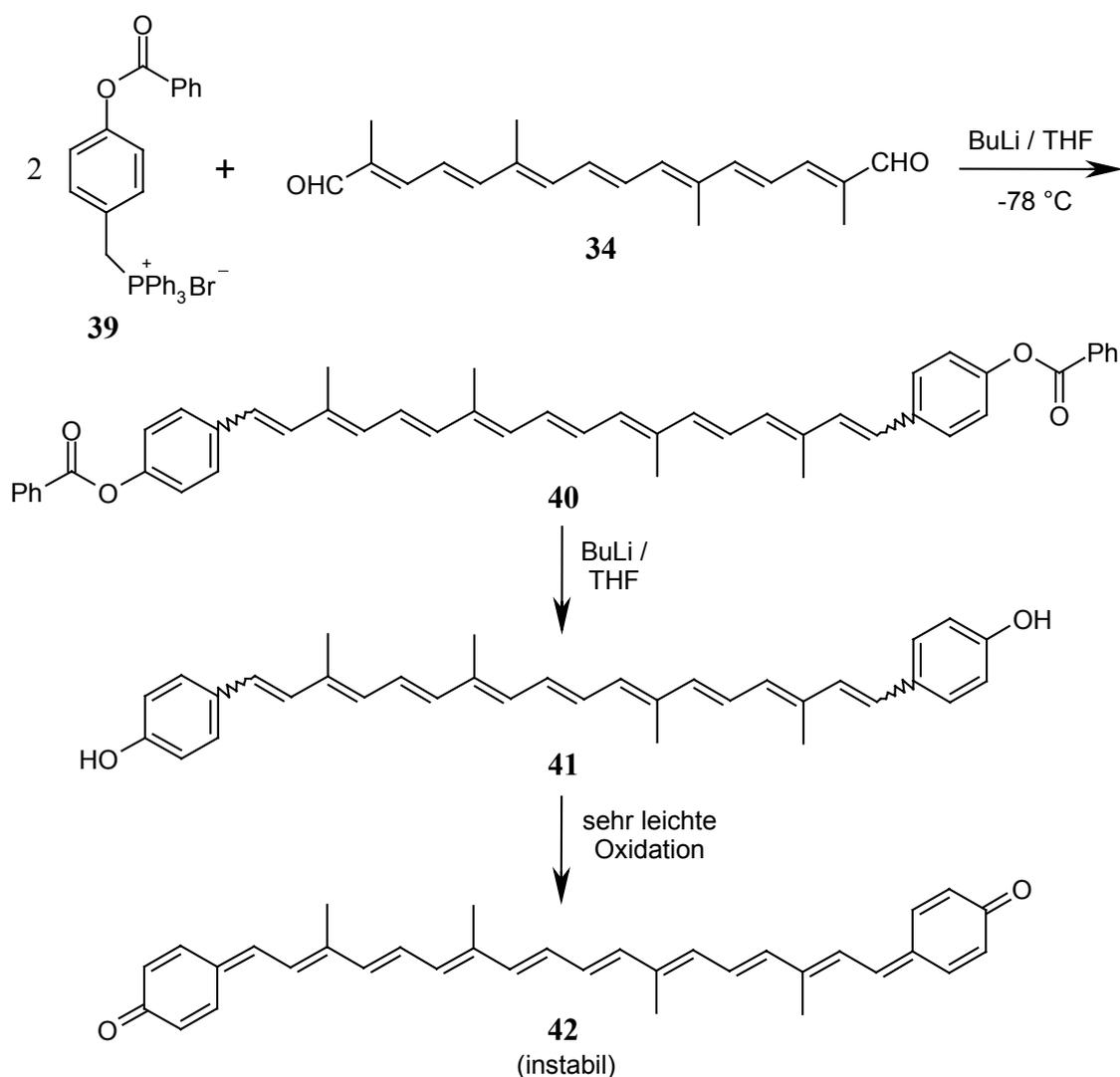


Abb. 28: gescheiterte Route zur Isolierung des Dihydroxycarotinoids **41**

Eine eindeutige Identifizierung von **41** gelang jedoch, als nach längeren Reaktionszeiten und Erhitzen der Reaktionsmischung bei der säulenchromatographischen Aufreinigung das dann in größeren Mengen angefallene (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben **43** zusammen mit **41** eluiert wurde. Das Stilben **43** ist dabei durch partielle Oxidation des Ylides aus dem

Wittigsalz **39**, das im Überschuss vorhanden ist, zum entsprechenden Aldehyd und anschließende Wittig-Reaktion mit noch unverbrauchtem Ylid entstanden^[132].

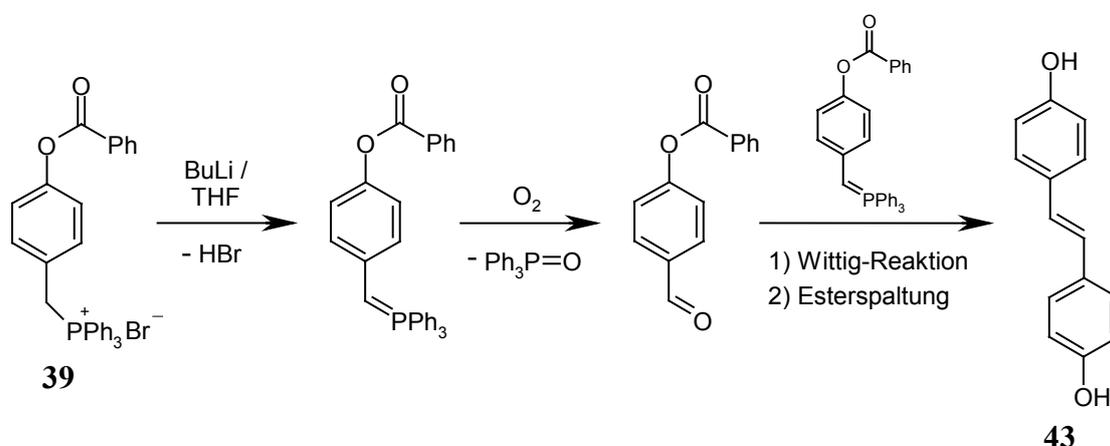


Abb. 29: oxidative Dimerisierung des Ylids aus dem Phosphoniumsalz **39** zu (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben **43**

Das Dihydroxycarotinoid **41** konnte im erhaltenen orangen Pulver neben **43** NMR-, UV- (λ_{max} (Ethanol) = 476 nm) und massenspektroskopisch ($[\text{M}^+]$ 476) nachgewiesen werden. Eine Isolierung in Reinsubstanz gelang aber auch hier nicht. Als letztes wurde versucht, **41** direkt durch selektives Entschützen des zunächst isolierten benzoylgeschützten Carotinoids **40** zu erhalten. Bei der Synthese von **40** muß durch kurze Reaktionszeiten eine Spaltung der Esterbindungen verhindert werden. Dafür wird das Phosphoniumsalz **39** bei RT mit Butyllithium in THF deprotoniert und mit Crocetininaldehyd **34** in Dichlormethan versetzt, der unter diesen Bedingungen nach einigen Minuten abreagiert ist (DC-Kontrolle). Man hydrolysiert schonend mit Ammoniumchloridlösung und erhält nach Aufarbeitung und Säulenchromatographie das Carotinoid **40** in 36%iger Ausbeute. Das (*E/Z*)-Verhältnis der neu gebildeten Doppelbindungen in 7 bzw 7'-Position lässt sich laut ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 95, Seite 167) zu etwa 1:2 bestimmen. Es ist nun bekannt, dass sterisch nicht abgeschirmte phenolische Benzoate leicht durch Aminolyse mit einem 10-fachen Überschuss Butylamin in Benzol gespalten werden können^[133]. Dies gelingt jedoch mit Verbindung **40** nicht. Selbst nach mehrtägigem Refluxieren in Benzol und weiterer Zugabe des Amins ist keine Bildung des Dihydroxycarotinoids **41** nachweisbar.

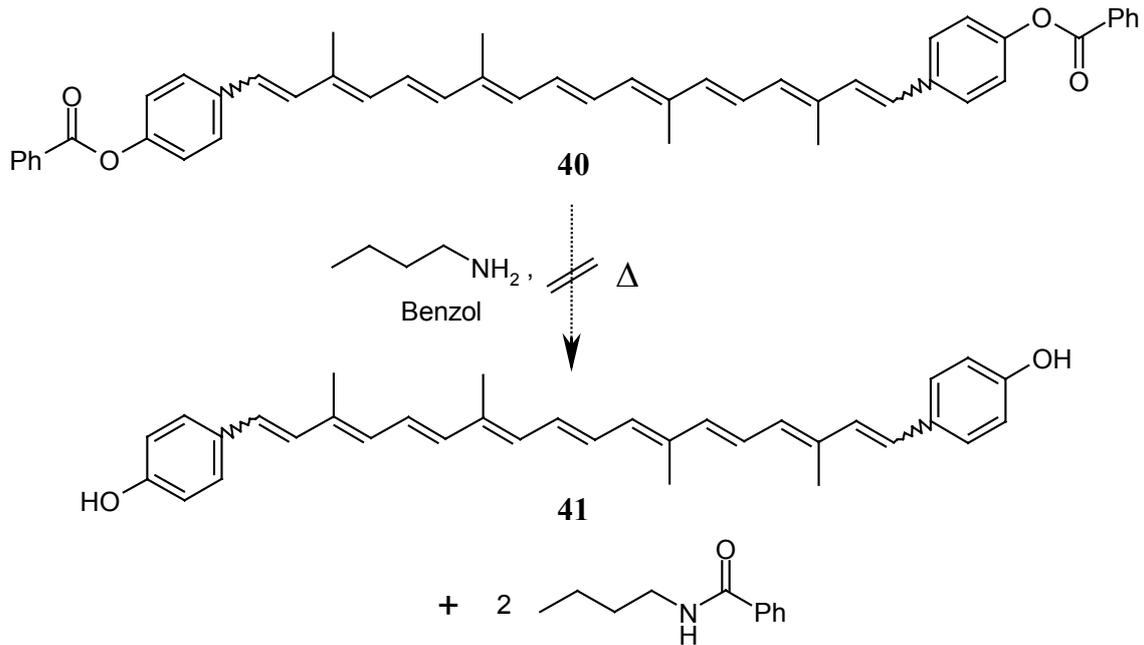
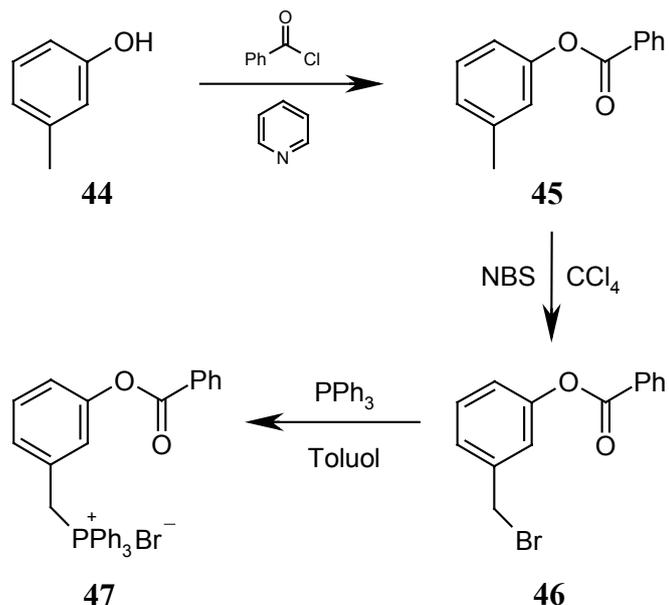


Abb. 30: gescheiterte Aminolyse von 40 zur Darstellung des Dihydroxycarotinoids 41

2.1.3.3. 2,2'-Dihydroxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin 48

Um einer oxidativen Zersetzung des phenolischen Carotinoids zu entgehen, werden jetzt die Hydroxygruppen in meta-Stellung zur Polyenkette eingeführt, was die Ausbildung eines chinoiden Systems nicht zulässt. Ausgangsverbindung

ist diesmal 3-Methylphenol **44** (*m*-Kresol), das zunächst mit Benzoylchlorid in Pyridin zum Benzoesäureester **45** umgesetzt wird. Es folgt eine Bromierung mit NBS in Tetrachlormethan zum Benzylbromid **46**, das nach Refluxieren mit Triphenylphosphin in Toluol zum Phosphoniumsalz **47** reagiert. Alle



V 19

V 20

V 21

Abb. 31: Synthese des Wittigsalzes 47

V 22

Zwischenprodukte fallen als Feststoffe an und sind durch Umkristallisation leicht zu reinigen. Abschließend wird das Wittigsalz **47** nach Deprotonierung mit Butyllithium in THF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Verhältnis 8:1 mit Crocetindialdehyd **34** umgesetzt.

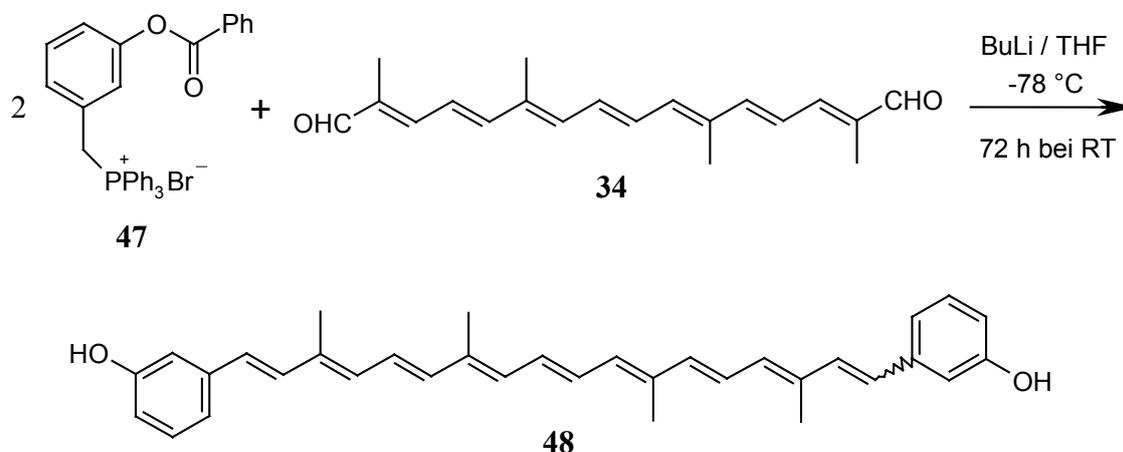


Abb. 32: Wittig-Olefinierung zum Dihydroxycarotinoid **48**

Man lässt noch drei Tage bei RT rühren, um die Abspaltung der Benzoylschutzgruppen zu vervollständigen, und erhält nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung das Dihydroxycarotinoid **48** in 31%iger Ausbeute. Die allmähliche Spaltung der Esterbindungen dürfte dabei u. a. durch nucleophil agierende Teilchen erreicht werden, die bei der Zersetzung des THF bei RT durch das Butyllithium, das dadurch deaktiviert wird, entstehen^[134] (Abb. 33).

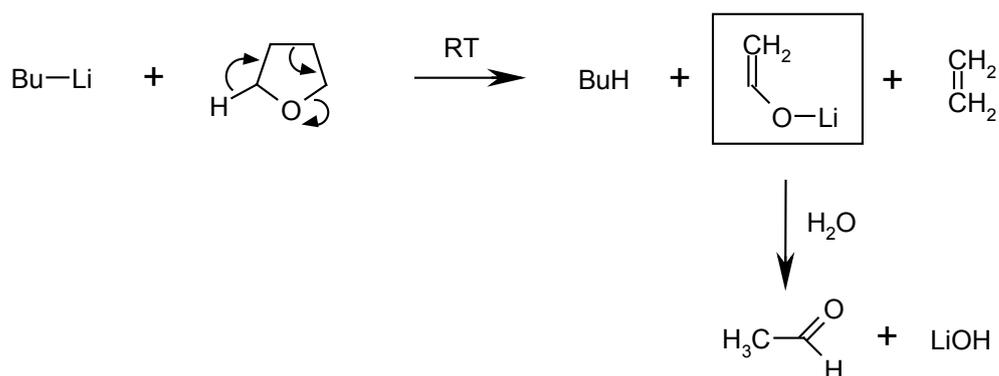


Abb. 33: Zersetzung des THF durch Butyllithium bei RT und anschließende Hydrolyse

Ein nucleophiler Angriff von noch vorhandenem Butyllithium direkt an die Estercarbonylgruppen bleibt dabei weiterhin möglich, um die Benzoylschutzgruppen abzuspalten.

Das in der Literatur nicht beschriebene Carotinoid **48** wird vollständig charakterisiert und das (*E/Z*)-Verhältnis der neu geknüpften Doppelbindungen zu etwa 3:1 bestimmt (¹H-NMR-Spektrum Abb. 98, Seite 174). Wie erwartet ist **48** wenig empfindlich gegenüber Sauerstoff und sogar nach mehreren Stunden in Lösung stabil.

2.1.3.4. Acetylierung des phenolischen Carotinoids 48

Zu Vergleichszwecken in Hinblick auf die Aggregation werden die Hydroxygruppen in **48** zum Acetat verestert. Dies gelingt in Dichlormethan unter Zugabe von gleichen molaren Mengen Pyridin und Acetylchlorid im hohen Überschuss zum Carotinoid. Die Reaktion ist nach kurzer Zeit beendet (DC-Kontrolle) und man erhält nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung das diacetylierte Carotinoid **49** in einer Ausbeute von 65 %.

V 23

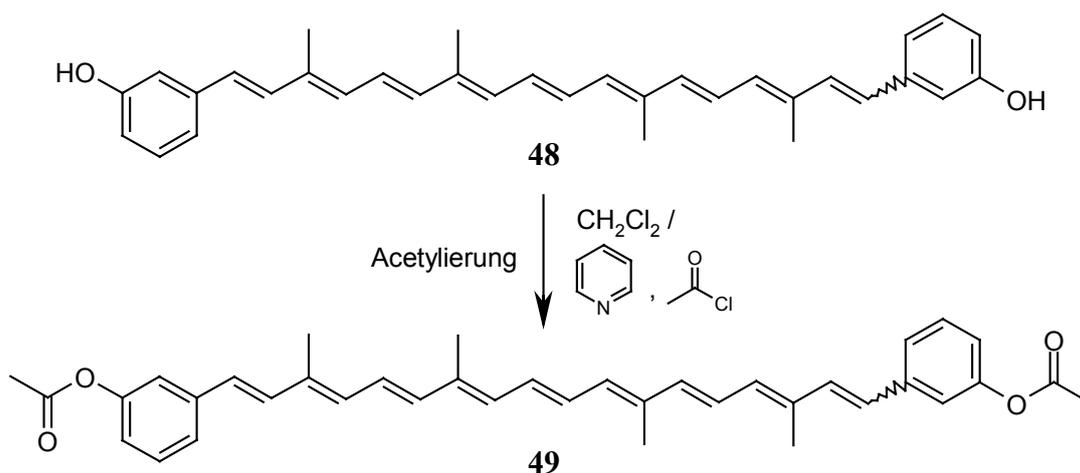


Abb. 34: Darstellung des diacetylierten Carotinoids **49**

Der Anteil der (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen in 7 bzw. 7'-Position bleibt nach der Acetylierung unverändert bei über 65 %. Nach 24-stündiger thermischer Isomerisierung von **49** in Heptan bei 98 °C erhält man das (*all-E*)-Isomer, dessen Aggregationsverhalten in Aceton/Wasser-Mischungen sich jedoch im Vergleich zum ausgehenden Isomerengemisch nicht merklich unterscheidet. Lediglich das Absorptionsmaximum im UV/VIS-Spektrum des Monomeren der (*all-E*)-Form von **49** ist um 2 nm bathochrom verschoben, begleitend von einer etwas stärker ausgeprägten Schwingungsfeinstruktur der Absorptionsbande.

2.2. Präparation der unilamellaren Vesikel

2.2.1. Auswahl der geeigneten Präparationsmethode

Um das Einlagerungs- und Aggregationsverhalten von Carotinoiden in Liposomen reproduzierbar untersuchen zu können, ist es erforderlich, einen definierten Bestand von Vesikeln homogen in Größe und Schichtung zu präparieren. Dies kann durch die Darstellung unilamellarer Vesikel erfolgen, wobei generell verschiedene Herstellungsmethoden zur Verfügung stehen. Eine Möglichkeit besteht in der Dispersion des in einem organischen Lösemittel vorgelösten Lipids in wässrigem Medium. Bei der apparativ nicht aufwendigen Ethanolinjektion^[135] wird das in Ethanol gelöste Phospholipid durch eine feine Nadel schnell in eine gut gerührte wässrige Pufferlösung eingespritzt. Bei diesem Vorgang bildet sich spontan ein großer Anteil unilamellarer Vesikel einheitlicher Größe aus. Ein großer Nachteil stellt jedoch die nachfolgende zeitaufwendige Entfernung des Ethanols durch Dialyse oder Diafiltration dar, die aber durch Anwendung der Etherinjektionsmethode^[136] umgangen werden kann. Die angesetzte etherische Lipidlösung wird hierbei in die aufgewärmte wässrige Phase injiziert, so dass der Ether während des Prozesses verdampft. Die sehr langsame Zugabegeschwindigkeit macht leider eine aufwendige pumpengesteuerte Dosier- vorrichtung erforderlich, um eine gewisse Einheitlichkeit in der Größenverteilung der unilamellaren Liposomen zu gewährleisten. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die einzulagernden Carotinoidmengen zusammen mit dem Lipid gelöst vorliegen müssen. Die sehr geringe Löslichkeit vieler Carotinoide in Ether oder Ethanol macht so das Erreichen eines hohen Carotinoid/Lipid-Verhältnisses unmöglich. Ein weiteres Prinzip für die Gewinnung unilamellarer Vesikel besteht in der Abtrennung von Detergens aus gemischten Lipid/Detergens-Micellen durch Dialyse oder Chromatographie^[75]. Nachteile hier sind wieder lange Präparationszeiten oder auch der hohe Kostenfaktor bezüglich der Bereitstellung von genügend Säulenmaterial.

Eine schnelles und einfaches Verfahren zur Herstellung von SUV ist die Ultraschallung von MLV-Dispersionen. MLV entstehen spontan bei der Hydratisierung von Phospholipiden in wässrigem Medium. Durch Energiezufuhr mittels Ultraschall bilden sich dann vermehrt unilamellare Vesikel aus, die mit zunehmender

Beschallungsdauer eine homogene Größenverteilung mit kleinstmöglichem Durchmesser aufweisen. Anschließend kann die Vesikelsuspension durch diskontinuierliche Ultrazentrifugation in drei Zonen aufgeteilt werden, von denen die oberste den homogenen Anteil SUV enthält, während die mittlere aus MLV und die untere aus aggregiertem Restlipid besteht^[75]. Hierbei ist die Ausbeute an unilamellaren Vesikeln jedoch gering und es muß ein hoher Lipidverlust in Kauf genommen werden. Als weitaus effizientere Möglichkeit, aus der MLV-Suspension unilamellare Liposomen einheitlicher Größe herzustellen, bietet sich die Extrusion an. Bei dieser Präparationsmethode wird die Vesikelsuspension mittels einer Extrusionsapparatur^[137] wiederholt durch eine Polycarbonatmembran mit definiertem Porendurchmesser gepresst. Dies erlaubt auf schnelle und einfache Weise eine Homogenisierung der unilamellaren Vesikel in Größe und Form^[138,139] und wurde im Arbeitskreis weitgehend erprobt^[104].

2.2.2. Extrusionsmethode

Das Extrusionsgerät besteht aus einem Stahlgehäuse (A), in das zwei Teflonzylinder (B) mit eingelassener dünner Stahlkapillare (C) eingeschoben werden (Abb. 35). An der Oberfläche jedes Zylinders gewährleistet ein Nylonnetz (D), das durch einen Dichtungsring (E) festgehalten wird, bei der Extrusion die Verteilung der Lipidsuspension über die gesamte Oberfläche. Zwischen die Dichtungsringe der beiden Zylinder legt man einen Polycarbonatfilter (F) und zieht die beiden Zylinder in dem Stahlgehäuse mit den beiden Gehäusemutter (G) kurz fest. Auf jeder Seite wird nun auf die Stahlkapillare eine gasdichte Spritze gesteckt, wobei eine die zu extrudierende Probe enthält. In dem ersten Extrusionsdurchgang wird nun die Vesikelsuspension vorsichtig durch die Polycarbonatmembran gepresst. Dies bringt zunächst eine Formveränderung der großen Liposomen mit sich, die sich röhrenförmig in die Filterpore erstrecken, dadurch instabil werden und sich nach Porendurchgang zu kleineren Vesikeln formieren. Dabei werden die einzelnen Membranen der MLV nach und nach abgeschält. Eine ausreichende Homogenität in der Vesikelgröße im Bereich des Porendurchmessers ist nach insgesamt 15 Extrusionsdurchgängen, die in der Regel mit immer geringerem Kraftaufwand einhergehen, erreicht, was anhand statistischer Auswertungen von Elektronenmikroskopaufnahmen der Vesikel von *Schmitz*^[104] gezeigt wurde.

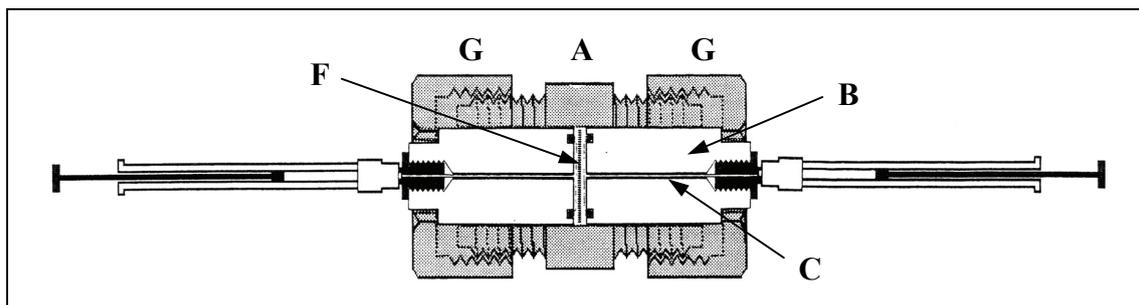
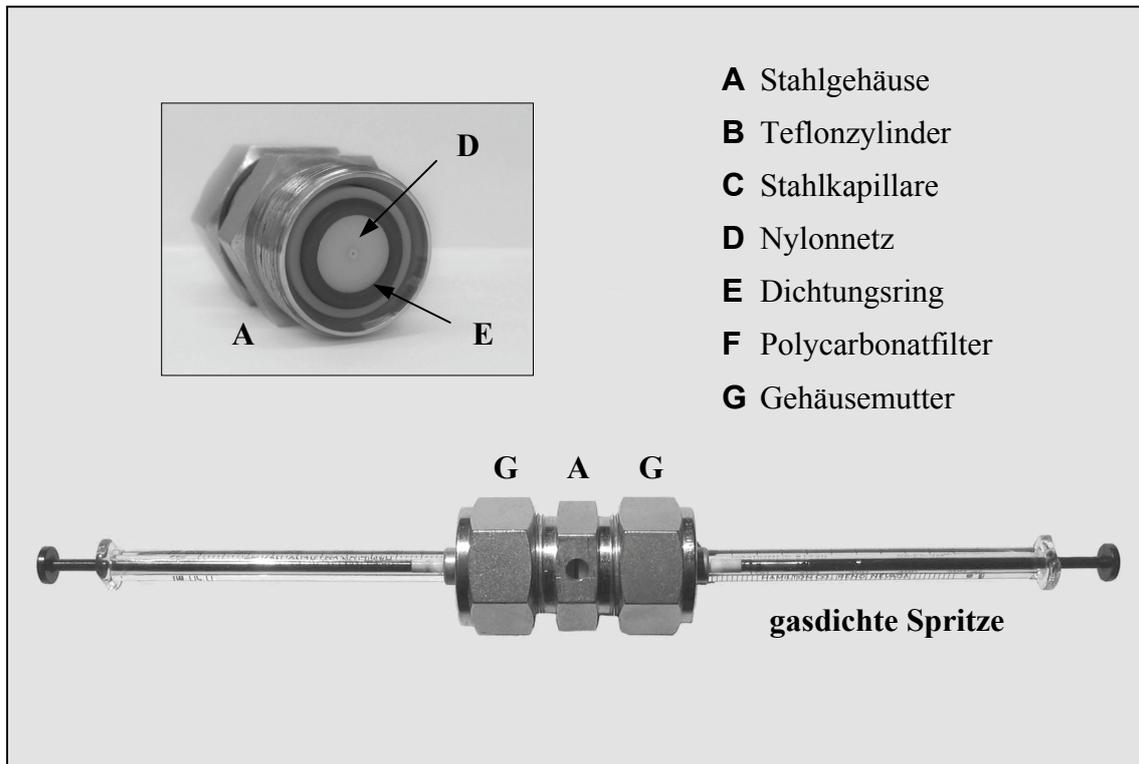


Abb. 35: Darstellung der verwendeten Extrusionsapparatur mit schematischem Aufbau im Längsschnitt (unten)

2.2.3. Auswahl des geeigneten Phospholipids

Um auch als Modellsystem einer Zellmembran fungieren zu können, kommen als Membranbausteine der unilamellaren Liposomen nur natürlich vorkommende Phospholipide in Frage. Unter diesen sind Phosphatidylcholine (PCe) die am weit verbreitetsten in der Natur. Aufgrund ihres geringen Preises in Bezug auf andere Phospholipide, ihrer Ladungsneutralität und chemischer Indifferenz werden PCe als hauptsächlicher Lipidbestandteil bei der Präparation von Liposomen in einem weiten

Anwendungsbereich eingesetzt^[72]. Als nächstes entscheidendes Auswahlkriterium dient die Phasenübergangstemperatur T_m des PCs, die durch Länge und Sättigungsgrad der Fettsäureketten bestimmt wird. Da der Phasenübergang des Lipids einen starken Einfluss auf die Aggregation des in die Liposomen eingelagerten Carotinoids hat^[86], muss ein PC-Lipid gewählt werden, das Untersuchungen in einem ausreichend großem Temperaturbereich oberhalb und vor allem unterhalb seiner T_m zulässt. Damit scheidet PC-Moleküle mit ungesättigten Fettsäureketten aus, da ihre Phasenübergänge deutlich unter 0°C liegen und sie außerdem noch anfällig gegenüber oxidativer Zersetzung sind. Die Dicke der gebildeten Lipiddoppelschicht sollte zudem gut mit der Länge eines Carotinoidmoleküls korrespondieren, um eine gerichtete und hohe Einlagerung der Carotinoide mit polaren Endgruppen zu gewährleisten. Als Näherung für die Dicke $d(H)$ der hydrophoben Kohlenwasserstoffregion einer voll hydratisierten gesättigten PC-Membran mit 12-18 C-Atomen pro Fettsäurerest oberhalb T_m kann folgende Formel herangezogen werden, die aus Röntgenbeugungsdaten abgeleitet wurde^[140]:

$$d(H) = (18.7 + 0.66 N) \text{ \AA} \quad \text{Gl. 2}$$

Der Parameter N steht für die Anzahl der C-Atome der Fettsäurekette. Eine Auswahl von PC-Lipiden mit ihren Werten für T_m und $d(H)$ ist in Tab. 1 zusammengestellt. Hinter dem Kürzel für jedes Phospholipid wird in Klammern zunächst die Anzahl der C-Atome der jeweiligen Acylreste und nach dem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen darin angegeben.

Phospholipid	Fettsäurereste	$T_m / ^\circ\text{C}$	$d(H) / \text{\AA}$
DMPC (C14:0)	myristoyl	23.9	27.9
DPPC (C16:0)	palmitoyl	41.4	29.3
DSPC (C18:0)	stearoyl	54.9	30.6
DOPC (C18:1)	oleoyl	-22.0	—

Tab. 1: Phasenübergangstemperaturen T_m ^[46] und berechnete Dicken $d(H)$ ^[87] der hydrophoben Membranregion oberhalb T_m ausgewählter PC-Lipide

Für die Dimensionen eines Astaxanthinmoleküls ergeben sich gemäß Abb. 36 nach Molekül-Mechanik-(MM-)Rechnungen^[86,87] die Kernabstände zu $d(\text{H,H}) = 31.7 \text{ \AA}$, $d(\text{O,O}) = 30.2 \text{ \AA}$ und $d(\text{C=O,C=O}) = 25.0 \text{ \AA}$.

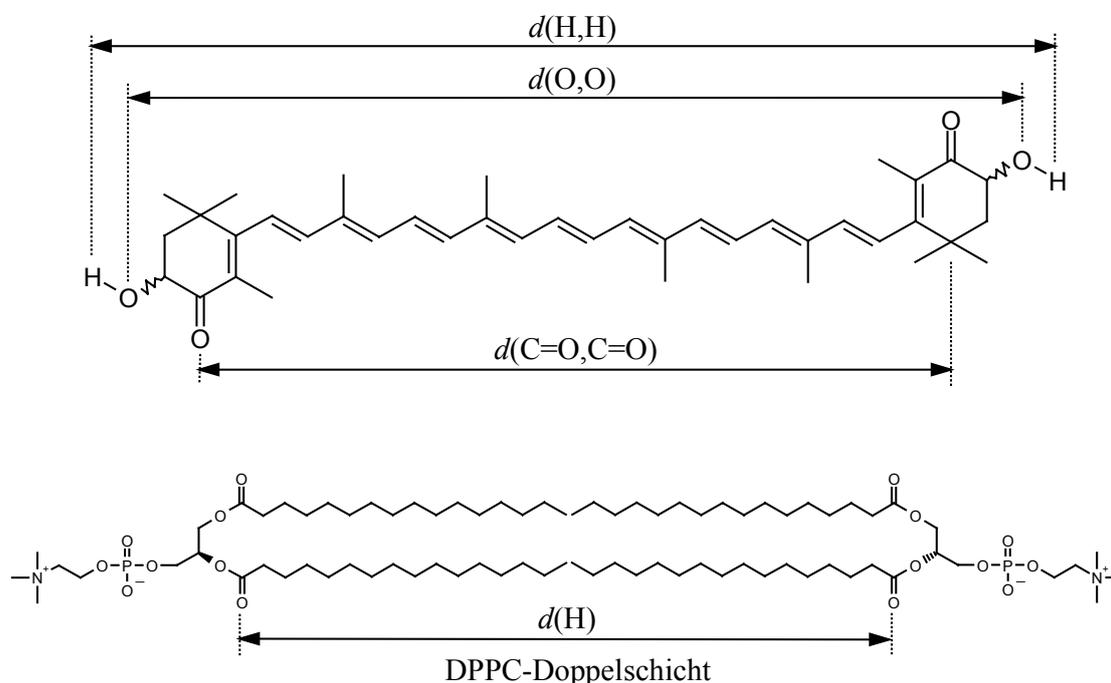


Abb. 36: Darstellung einiger Abstandsparameter in einem Carotinoidmolekül und in einer Lipidmembran an den Beispielen Astaxanthin **9** und DPPC

Eine gute Übereinstimmung der Lipiddoppelschichtdicke mit der Länge eines Astaxanthinmoleküls ist für DMPC (C14:0) und DPPC (C16:0) gegeben, dessen Phasenübergangstemperaturen auch in einem für Untersuchungen akzeptablen Bereich liegen. Erste Einlagerungsversuche von Astaxanthin **9** in DMPC-Vesikel führten jedoch zu keinen zufriedenstellenden reproduzierbaren Ergebnissen. Die extrudierten carotinoidbeladenen DMPC-Vesikel waren auch bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ nicht sonderlich stabil und es kam nach einigen Tagen zur Entfärbung und damit Zersetzung des Carotinoids. Die Messung von temperaturabhängigen UV/VIS-Spektren war zusätzlich bei DMPC apparativ bedingt bis auf nur $16 \text{ }^\circ\text{C}$ unterhalb $T_m(\text{DMPC}) = 23.9 \text{ }^\circ\text{C}$ beschränkt, so dass als Phospholipidkomponente DPPC mit $T_m(\text{DPPC}) = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$ gewählt wurde. Die in DPPC veresterte Palmitinsäure ist zudem mit 16 C-Atomen die kürzeste Fettsäure, die gewöhnlich in den Phospholipiden von Säugern vorkommt^[72].

2.2.4. Durchführung der Vesikelpräparation

Für die Einlagerung eines Carotinoids in Vesikel muß dieses zunächst zusammen mit dem Lipid gelöst vorliegen. Dafür werden 10.0 mg DPPC in Chloroform gelöst und mit einem bestimmten Volumenanteil der Carotinoidarbeitslösung versetzt. Die minimal zugesetzte Carotinoidmenge beträgt $0.26 \mu\text{mol}$ in einer Endkonzentration von 0.13 mmol/l in der Suspension. Die nächst höheren Carotinoidkonzentrationen belaufen sich auf das drei- und fünffache dieser Startkonzentration. Nach Abziehen der Lösemittel wird auf den gefärbten Lipidfilm 2 ml wässrige Pufferlösung gegeben und durch leichtes Schwenken oberhalb T_m die Probe homogenisiert.

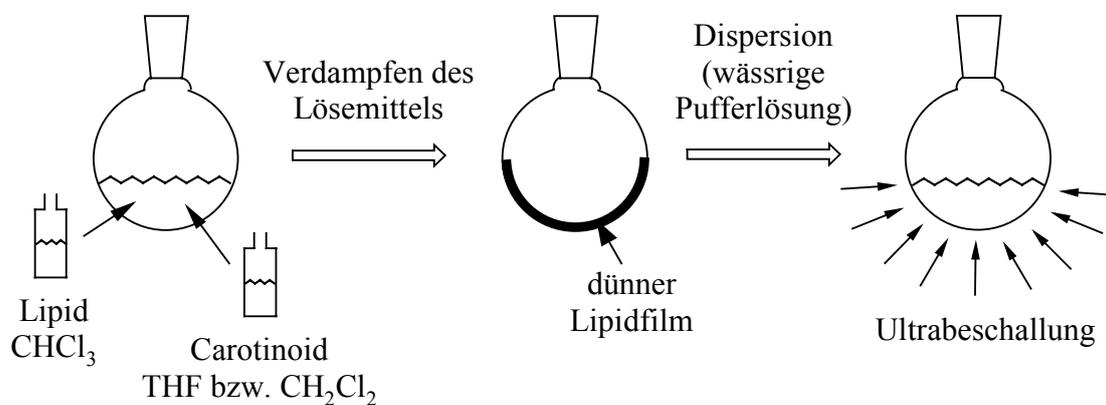


Abb. 37: Vorgehensschema bei der Vesikelpräparation

Die nachfolgende 30-minütige Ultraschallbehandlung, ohne die die anschließende Extrusion nicht praktikabel ist, bewirkt wohl einen Zerfall von entstandenen langen Lipiddoppelschicht-Schläuchen in kleinere Membranfragmente. Im letzten Schritt erfolgt die Extrusion durch einen Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 400 nm . Sie erfordert besonders im ersten Durchgang erhöhten Kraftaufwand, da sie bei DPPC unterhalb T_m durchgeführt wird. Bei Verwendung eines Filters mit nur 100 nm Porendurchmesser versagt die Extrusion meistens, da die Filtermembran reißt.

2.2.5. Charakterisierung der carotinoidbeladenen DPPC-Vesikel

Die nach der Extrusion erhaltenen Vesikelproben sind auf ihren tatsächlichen Carotinoid- bzw Phospholipidgehalt zu untersuchen, da bei der Präparation Verluste an

beiden Ausgangsmaterialien zu verzeichnen sind. Während die Carotinoidkonzentration nach jeder Extrusion explizit bestimmt wird, soll für die Angabe der DPPC-Konzentration die Ermittlung eines Mittelwerts genügen.

2.2.5.1. Bestimmung der Carotinoidkonzentration

Die quantitative Bestimmung der Carotinoidkonzentration kann mithilfe der HPLC erfolgen. Dafür wird aus den Vesikelsuspensionen das Carotinoid mit einem Dichlormethan/Hexan-Gemisch extrahiert und in die HPLC-Apparatur gespritzt. Vorher wird noch eine definierte Menge eines internen Standards (hier: Anthracen) zugesetzt, um Volumenfehler zu beseitigen (vgl. Kap. 4.2.1.5.1.). Die Quantifizierung erfolgt anschließend über eine Eichgerade, die aus dem aus zwei Messwerten gemittelten Peakflächenverhältnis $F_{\text{Carotinoid}}/F_{\text{Standard}}$ die Carotinoidkonzentration berechnen lässt. Die Eichgerade wird über zwei gleiche Verdünnungsreihen durch Mittelwertbildung bestimmt, wobei für jede Konzentration der Mittelwert einer Doppelbestimmung herangezogen wird. Die HPLC-Methode wurde zunächst für Astaxanthin **9** angewandt, für das die durch lineare Regression ermittelte Eichursprungsgerade in Abb. 38 dargestellt ist.

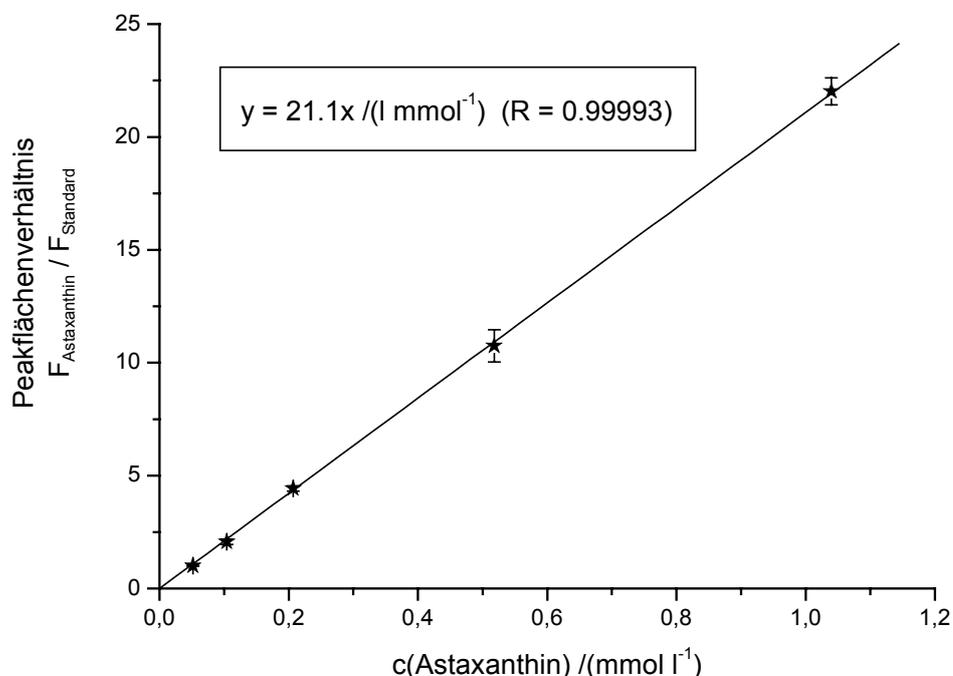


Abb. 38: Eichgerade zur Bestimmung der Astaxanthinkonzentration (Standard = Anthracen). Die Fehlerbalken zeigen die Streuung für zwei Verdünnungsreihen.

Die gewünschte Astaxanthinkonzentration x lässt sich damit aus dem Peakflächenverhältnis y zu $x = 0.0474 \cdot y$ mol/l bestimmen. Für die restlichen Carotinoide wurde eine Methode gewählt, die die Erstellung einer Eichgeraden und das besonders bei größeren Konzentrationen länger dauernde Extrahieren umgeht. Hierbei wird die Carotinoidkonzentration UV/VIS-spektroskopisch unter Verwendung des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt (Gl. 9, Seite 141), nachdem die Liposomen durch Eintragen in Ethanol zerstört wurden. Die benötigten Extinktionskoeffizienten für jedes Carotinoid in Ethanol werden vorher experimentell bestimmt (Tab. 2). Jede extrudierte carotinoidhaltige Probe wird am jeweiligen Absorptionsmaximum zweifach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Carotinoid	λ_{\max} [nm]	ϵ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Zeaxanthin 6	452	130000
Lutein 7	447	138000
Canthaxanthin 8 *)	477	135000
Zeaxanthindiacetat 17	452	130000
Luteindiacetat 18 *)	446	143000
Astaxanthindiacetat 19 *)	482	120000
Luteindimethylether 20	446	118000
Actinioerythrol 26	507	140000
Actinioerythroidiacetat 27	515	125000
<i>p</i> -Methoxyphenyl-Car 35	462	125000
<i>p</i> -Benzoyloxyphenyl-Car 40 *)	463	110000
<i>m</i> -Hydroxyphenyl-Car 48	471	134000
<i>m</i> -Acetoxyphenyl-Car 49 *)	469	120000

Tab. 2: experimentell bestimmte Extinktionskoeffizienten ϵ der Carotinoide in Ethanol *) enthält 2 % Chloroform

2.2.5.2. Bestimmung der durchschnittlichen DPPC-Konzentration

Die tatsächliche DPPC-Konzentration nach der Präparation wird mithilfe eines enzymatischen Farbtests zur quantitativen Bestimmung cholinhaltiger Phospholipide ermittelt. Bei dieser kolorimetrischen Methode wird zunächst enzymatisch der Cholinrest vom Lipidmolekül abgespalten, der dann mit Cholin-Oxidase oxidiert wird und dabei Wasserstoffperoxid generiert. Das gebildete Wasserstoffperoxid wird daraufhin zur Bildung eines roten Chinonimin-Farbstoffes benötigt, dessen Absorbanz proportional zur Konzentration von DPPC in der Probe ist. Die Messung mit dem UV/VIS-Spektrometer erfolgt bei seinem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 505 \text{ nm}$.

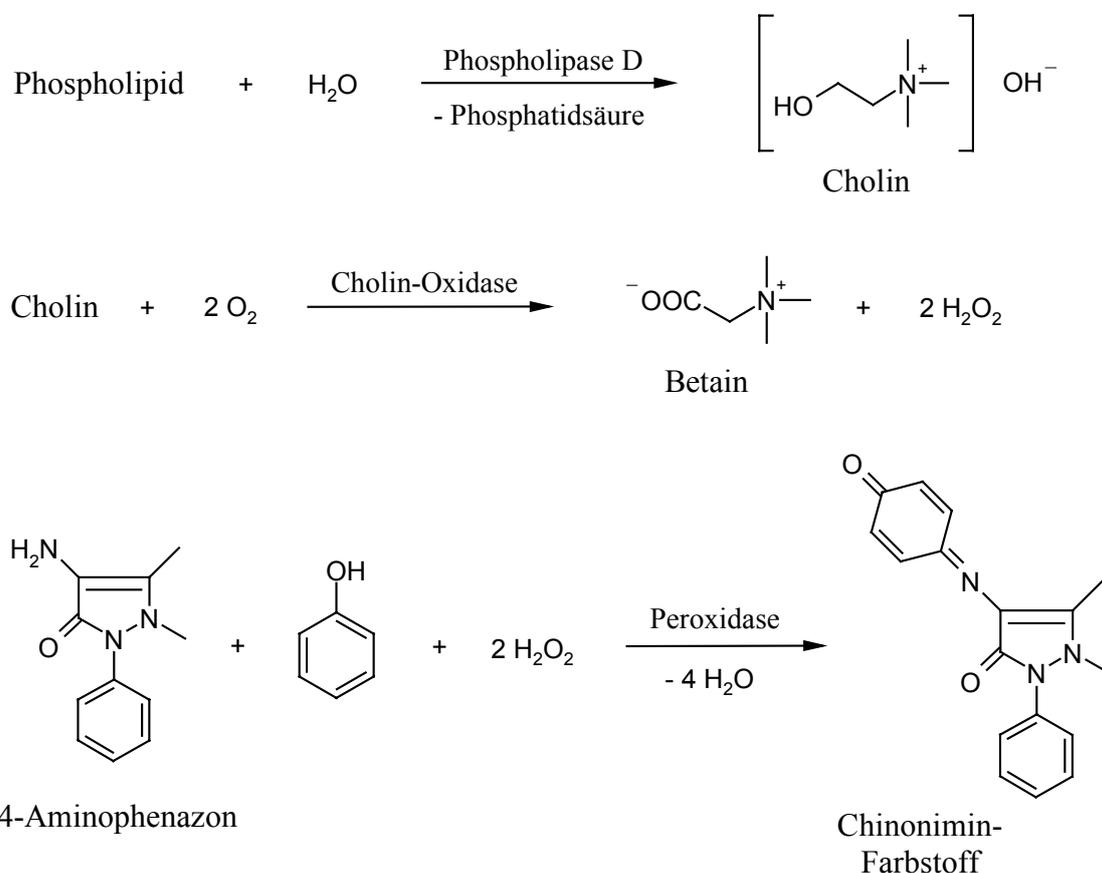


Abb. 39: Reaktionsfolge bei der quantitativen Bestimmung der DPPC-Konzentration

Es werden jeweils acht DPPC-Proben mit drei unterschiedlichen Astaxanthin-konzentrationen präpariert. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $c_{\text{ein}}(\text{DPPC}) = 6.81 \text{ mmol/l}$ mit $c_{\text{ein}}(\text{Astaxanthin}) = 0.13, 0.39$ bzw. 0.65 mmol/l . Der Fehler, der sich aus Ableseungenauigkeiten und Pipettierfehlern ergibt, kann mit 3 % abgeschätzt

werden. Zum Vergleich werden sechs Präparationen ohne Carotinoid angefertigt. Die ermittelten Lipidkonzentrationen sind in Tab. 3 zusammengestellt. Dabei lässt sich keine spezielle Abhängigkeit von der zugesetzten Astaxanthinmenge beobachten.

DPPC-Probe	$c_{\text{ein}}(\text{Astaxanthin}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$			
	0	0.13	0.39	0.56
	$c(\text{DPPC}) / \text{mmol l}^{-1}$			
	5.13	6.38	5.63	5.76
	5.76	5.72	5.78	5.34
	5.27	4.91	5.92	5.27
	5.30	5.03	5.61	5.01
	5.03	5.08	5.59	5.98
	5.99	4.41	5.67	5.92
	—	4.28	5.86	5.67
	—	4.24	5.91	5.67
Mittelwert \pm SD	5.41 \pm 0.38	5.01 \pm 0.74	5.75 \pm 0.14	5.58 \pm 0.34

Tab. 3: Vergleich ermittelter DPPC-Konzentrationen von Vesikelpräparationen mit verschiedenen Astaxanthinkonzentrationen

Somit ist es möglich und sinnvoll, eine durchschnittliche Lipidkonzentration für alle carotinoidbeladenen DPPC-Liposomen anzugeben, die der Mittelwert aus den 24 Proben mit Astaxanthin darstellen soll. Sie berechnet sich zu $\bar{c}(\text{DPPC}) = 5.44 \pm 0.56 \text{ mmol/l}$. In Abb. 40 ist der Mittelwert der DPPC-Konzentration durch die durchgezogene Linie und die Standardabweichung durch die gepunkteten Linien angezeigt. In diesem Fehlerintervall mit einem relativen Fehler von 10 % liegen nahezu alle Messwerte der Proben. Von der eingesetzten DPPC-Menge kann nach der Präparation im Durchschnitt also 80 % wiedergefunden werden. Der Lipidverlust ist z. B. dadurch zu erklären, dass die Lipidmoleküle teilweise durch Adhäsion an der Glaskolbenwand haften bleiben und bei der Extrusion ein Anteil Lipid im Polycarbonatfilter zurückbleibt. Für die Angabe des letztendlich resultierenden Carotinoid/Lipid-Verhältnisses der unilamellaren Vesikel kann für die DPPC-Konzentration der hier bestimmte Mittelwert von 5.44 mmol/l angenommen werden.

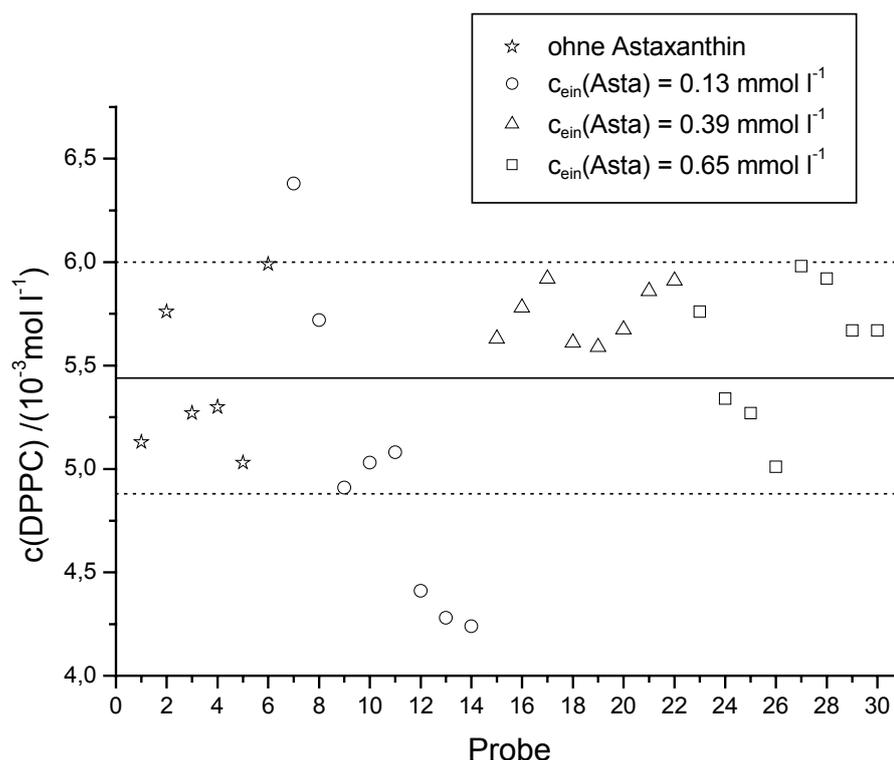


Abb. 40: graphische Darstellung der ermittelten DPPC-Konzentrationen aus Tab. 3. Die eingetragenen Linien geben den Mittelwert (5.44 mmol/l) mit der Standardabweichung (± 0.56 mmol/l) an.

2.3. UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen von Carotinoiden in Liposomen und die Beobachtung der Carotinoidaggregation über einen größeren Temperaturbereich wurden nur vereinzelt an wenigen Carotinoiden durchgeführt. *Yamamoto und Bangham*^[141] zeigten zunächst im Jahr 1978 anhand von UV/VIS-Spektren, dass sich das Verhalten von β -Carotin **3** und (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** in multilamellaren DPPC-Liposomen bei verschiedenen Temperaturen doch stark unterscheidet. Während sich beide Carotinoide unterhalb T_m bei 20 °C in einem Zustand der Aggregation befinden, zeigen nur die mit (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** beladenen Vesikel oberhalb T_m bei 43 °C eine signifikante Änderung des Spektrums zum Monomerspektrum hin. Während hier zunächst noch eine zusätzliche Konformationsänderung des Zeaxanthinmoleküls postuliert wird, schreiben *Mendelsohn und van Holten*^[142] ein Jahr später die temperaturabhängigen Änderungen

der Absorptionseigenschaften von (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a**, diesmal bestimmt in unilamellaren DPPC-Liposomen, allein einem „Aggregations-Disaggregationsprozess“ des Carotinoids in der Membran zu. Dass für (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** im Gegensatz zu β -Carotin **3**, das stets aggregiert vorliegt, ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen Monomer und aggregierten Formen in multilamellaren DPPC-Membranen existiert, wurde 1986 von *Kolev und Kafaliev*^[143] bekräftigt. *Milon et al.*^[86] untersuchten die Einlagerung von (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a**, (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin und ihren C₅₀-Isoprenhomologen in unilamellare DMPC-Vesikel. Hierbei verschiebt sich das Maximum der Monomerabsorption nach Abkühlen unterhalb T_m beim Einsetzen der Aggregation jeweils hypsochrom. Die Löslichkeit der eingesetzten Xanthophylle in der Lipidmembran korreliert dabei gut mit der Übereinstimmung der Länge des Carotinoidmoleküls mit der Dicke der Lipiddoppelschicht, so dass die längeren C₅₀-Carotinoide ein geringeres Einlagerungsvermögen aufweisen.

Im Folgenden werden unilamellare DPPC-Vesikel mit steigendem Carotinoid/Lipid-Verhältnis präpariert, mit Pufferlösung auf ¹/₁₀ verdünnt und im Temperaturbereich von 18 – 58 °C UV/VIS-spektroskopisch vermessen (Küvettenlänge 0.5 cm). Bei Temperaturen unter- oder oberhalb dieses Bereichs treten wenn überhaupt nur noch minimale Änderungen des Absorptionsspektrums auf. Die Temperierung erfolgt ausgehend von 18 °C in Temperaturintervallen von zumeist 8 °C mit einer Dauer von jeweils 20 min vor jeder weiteren Messung.

Um Vergleiche zum Aggregationsverhalten der Carotinoide in wässrigem Medium ziehen zu können, wird das Carotinoid zunächst in Aceton in einer Konzentration von 2.0·10⁻⁵ mol/l gelöst. Anschließend wird diese Stammlösung durch Eintragen in verschiedene Aceton/Wasser-Mischungen auf ¹/₁₀ verdünnt. Die entstandenen Lösungen reichen dabei von einem Lösemittelgemisch mit 10 % Aceton- und 90 % Wasseranteil bis hin zu einer reinen Acetonlösung, wobei der Gehalt an Aceton um jeweils 10 % erhöht ist. Die resultierenden 10 Lösungen mit einer Carotinoidkonzentration von jeweils 2.0·10⁻⁶ mol/l werden nach 20 min UV/VIS-spektroskopisch vermessen (Küvettenlänge 1 cm).

2.3.1. Astaxanthin 9

Die Präparation der Liposomen mit Astaxanthin 9 verläuft bei kleinen Carotinoidkonzentrationen problemlos. Wird nun die Konzentration erhöht, verlaufen die Extrusionsvorgänge mit jeder weiteren Extrusion deutlich schwieriger, bis sie bei Astaxanthinkonzentrationen von über 0.8 mmol/l schließlich durch die Verstopfung der Filtermembran versagen. In der Regel sollten die letzten Extrusionsdurchgänge jeder Präparation deutlich leichter verlaufen, da sich die Vesikel nun der Porengröße der Membran angepasst haben. Dies ist bei Extrusionen ohne Carotinoidzugabe deutlich zu merken. Mit Erhöhung der Astaxanthinkonzentration bilden sich jedoch zunehmend größere dunkelrote Astaxanthinpräzipitate aus, die sich bei der Präparation teilweise an der Glaskolbenwand abscheiden. Sie blockieren den Polycarbonatfilter, der nach dem ersten Extrusionsdurchgang dann tiefrot gefärbt ist. Die effektiv eingelagerte Carotinoidmenge sinkt zudem auf ein Minimum ab. Tab. 4 gibt eine Übersicht über die erreichten Endkonzentrationen von Astaxanthin in den DPPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Astaxanthin}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$		
	0.13	0.39	0.65
	$c_{\text{end}}(\text{Astaxanthin}) / \text{mmol l}^{-1}$		
1	0.10	0.24	0.33
2	0.11	0.22	0.28
3	0.09	0.21	0.37
4	0.09	0.20	0.26
5	0.11	0.23	0.27
6	0.12	0.23	0.26
7	0.10	0.27	0.33
8	0.11	0.27	0.31
9	0.09	0.26	0.36
10	0.10	0.25	0.40
Mittelwert ± SD	0.10 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.05
CV / mol%	77 ± 10	62 ± 7	49 ± 9
EV / mol%	1.8 ± 0.4	4.4 ± 0.8	5.9 ± 1.5

Tab. 4: Astaxanthinkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (CV) und Einlagerungsverhältnis (EV)

Neben dem jeweiligen Mittelwert werden die Parameter $CV = c_{\text{end}}/c_{\text{ein}}$, der das Verhältnis der eingelagerten Carotinoidmenge zur eingesetzten angibt, und $EV = c_{\text{end}}/\bar{c}$ (DPPC), der das Einlagerungsverhältnis von Carotinoid zu Phospholipid beschreibt, berechnet. Während beim niedrigsten Carotinoidzusatz noch etwa 80 % Astaxanthin nach der Vesikelpräparation wiedergefunden werden, sind dies bei der fünffach eingesetzten Menge nur noch 50 %.

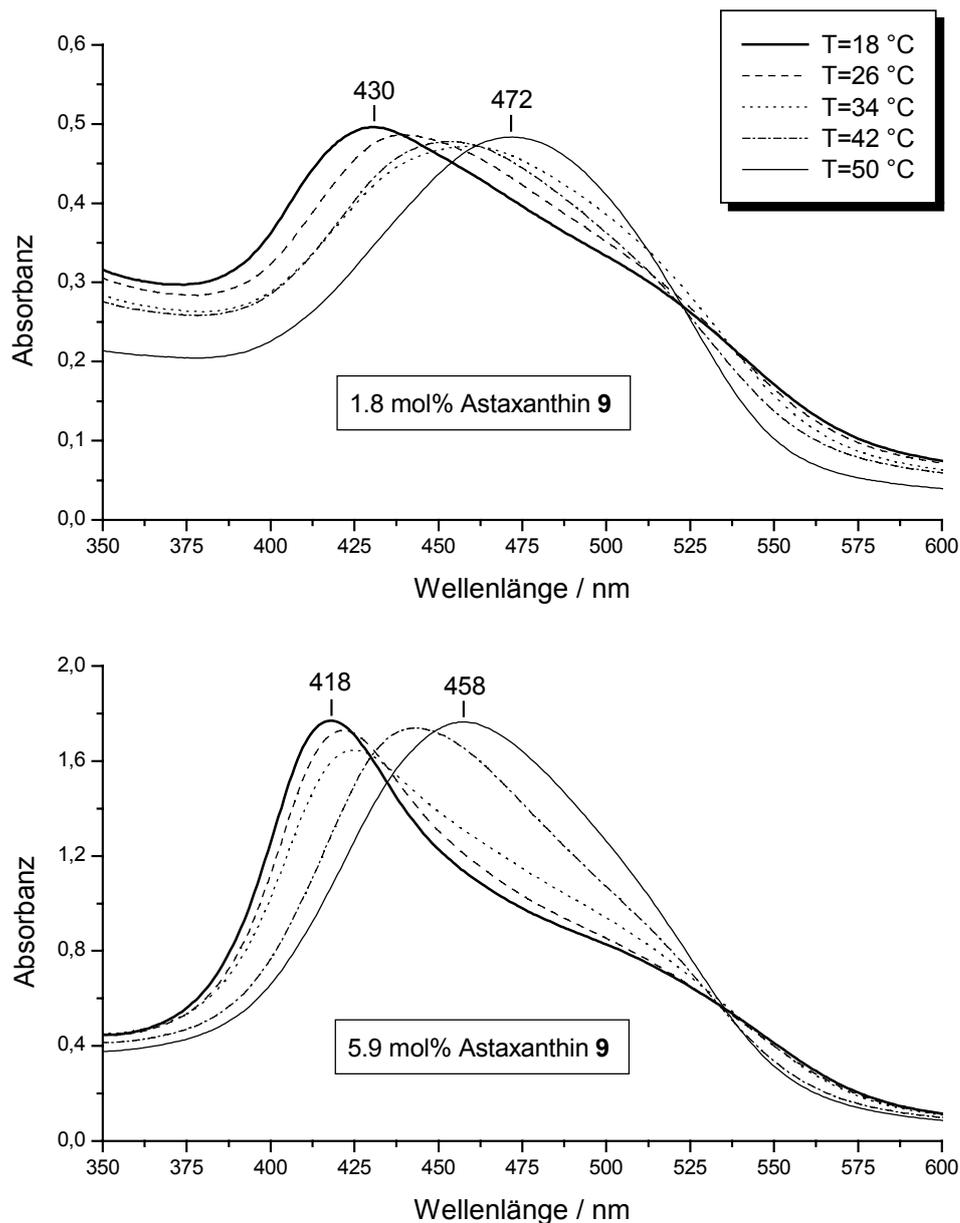


Abb. 41: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit verschiedenen Astaxanthinmengen (1.8 bzw. 5.9 mol%)

Dabei ist ein 20%iger Carotinoidverlust wie auch schon der durchschnittliche Lipidverlust einfach der experimentellen Methodik zuzuschreiben. Bei größeren Astaxanthinkonzentrationen sind die Ausbeuten der Einlagerung dann geringer, da sich schon vorher irreversibel größere Astaxanthinaggregate ausbilden, die bei der Extrusion durch den Filter eliminiert werden. Die temperaturabhängigen UV/VIS-Spektren zeigen alle neben der Absorption des Carotinoids stets als additiven Term die Mie-Streuung und auch mögliche Rayleigh-Streuung an den DPPC-Vesikeln. Die Eliminierung der als Untergrund anfallenden Streueffekte ist nicht ohne weiteres möglich, da jede Präparation aufgrund doch unterschiedlicher Größenverteilung der Liposomen ein individuelles Streuverhalten aufweist. Der Streuanteil nimmt dabei von der langwelligen Seite her immer stärker zu, da kurzwelliges Licht stärker gestreut wird. Bei Temperaturerhöhung nimmt zudem als Resultat zunehmender Membranfluidität das Streuvermögen der Vesikel ab. In Abb. 41 sind die UV/VIS-Spektren mit steigendem Temperaturgradienten von Vesikeln mit der kleinsten und der höchst erreichten Astaxanthinmenge gegenübergestellt.

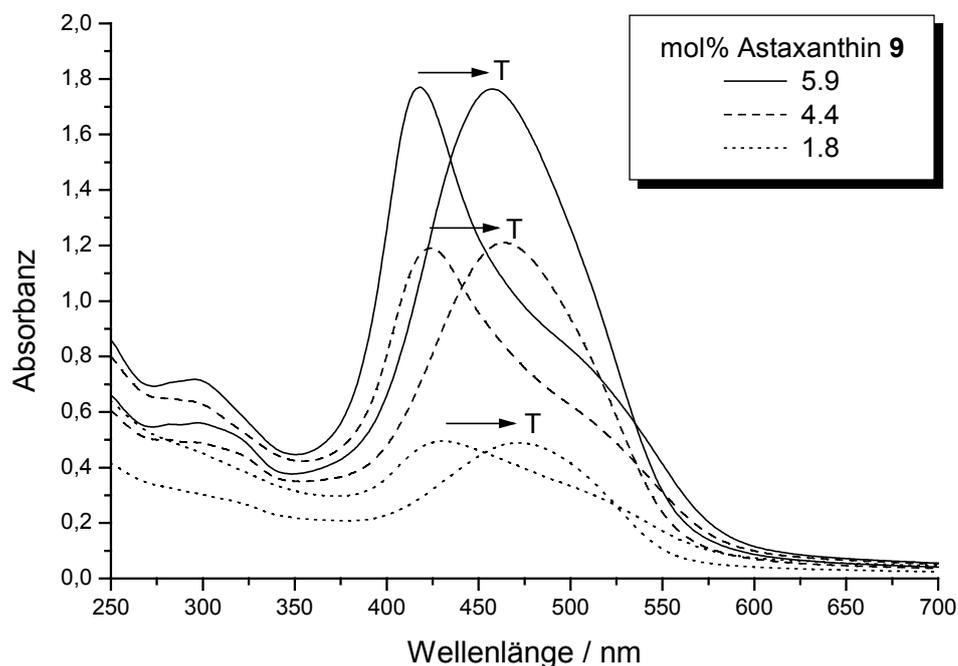


Abb. 42: Übersicht der UV/VIS-Spektren präparierter Astaxanthin/DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$) mit unterschiedlichem EV (siehe Legende) bei steigendem Temperaturgradienten von 18 bis $58 \text{ }^\circ\text{C}$

Bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ bildet sich in beiden Fällen eine H-Aggregatebande aus, die bei $1.8 \text{ mol}\%$ Astaxanthin um 430 nm , bei $4.4 \text{ mol}\%$ Astaxanthin um 426 nm (hier nicht abgebildet),

und bei 5.9 mol% Astaxanthin um 418 nm liegt. Diese verschiebt sich jeweils mit Temperaturerhöhung auf 50 °C um etwa 40 nm bathochrom, wobei im Bereich um T_m die größte Änderung zu verzeichnen ist. Einen vergleichenden Überblick liefert Abb. 42. Die Ausbildung eines H-Aggregats wird bei tiefen Temperaturen durch die schmalere Absorptionsbande bekräftigt, da nun die elektronischen, Schwingungs- und Rotationseigenschaften des individuellen Moleküls gemäß Excitonentheorie zurückgedrängt werden. Begleitet wird diese Absorption durch eine langwellige Schulter bei 520 nm, die bei den beiden höchsten Carotinoidkonzentrationen sogar im flüssigkristallinen Zustand der Membran zu erkennen ist. Hier liegen immer noch nicht alle Astaxanthinmoleküle monomer vor, sondern dem Monomerspektrum addiert sich immer noch ein Teil des Aggregatespektrums. Bei 1.8 mol% Astaxanthin entspricht das Absorptionsspektrum oberhalb T_m in Form und Lage etwa dem Monomerspektrum von Astaxanthin in Hexan ($\lambda_{\max} = 474$ nm). Dies beweist außerdem, dass die Astaxanthinmoleküle in der Lipiddoppelschicht eingelagert sind und sich nicht in wässriger Umgebung inner- oder außerhalb der Vesikel befinden können. Kühlt man nun die Suspensionen wieder unterhalb T_m ab, bilden sich in allen Fällen die hypsochrom verschobenen H-Aggregatebanden zurück, was die Reversibilität des Prozesses beweist. Das Carotinoid bleibt also dabei vollständig in der Membran eingebettet.

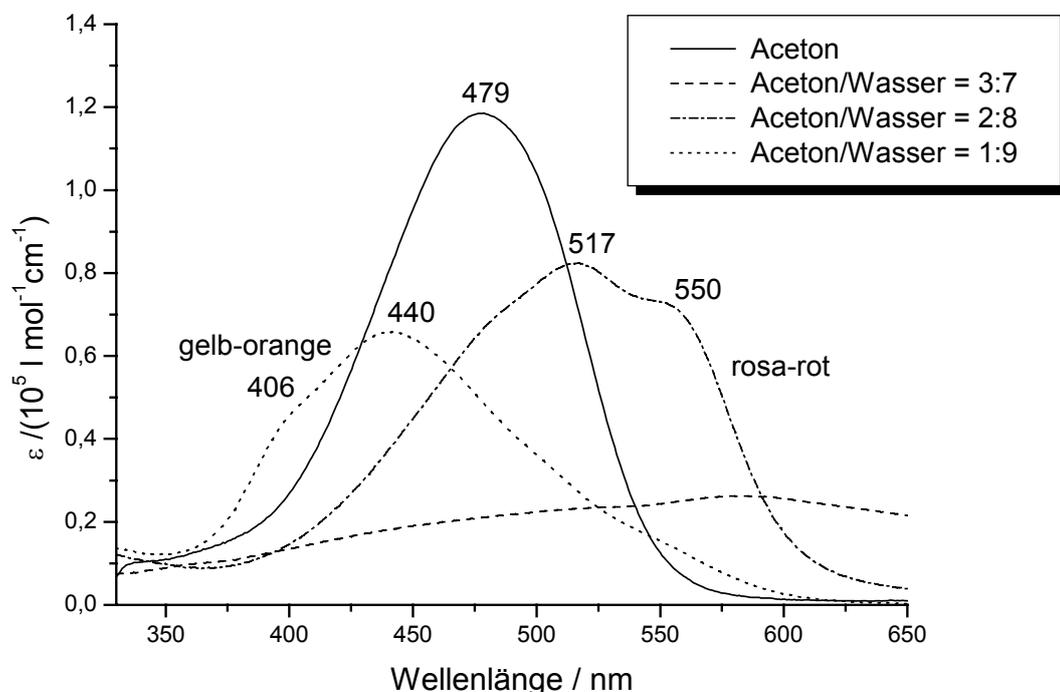


Abb. 43: UV/VIS-Spektren von Astaxanthin **9** [$c = 2 \cdot 10^{-6}$ mol/l] in Aceton/Wasser-Gemischen

Untersucht man die Aggregation von **9** in verschiedenen Aceton/Wasser-Mischungen, so tritt eine größere Aggregatevielfalt zu Tage (Abb. 43). In reinem Aceton ist Astaxanthin **9** molekular dispers gelöst. Ab 70 % Wassergehalt treten die Moleküle zunächst zu größeren, nahezu farblosen Aggregateinheiten zusammen, aus denen dann bei 80 % Wasseranteil rosa-rote J-Aggregate hervorgehen, die sich nach *Köpse*^[105] aus zwei verschiedenen J-Aggregatestrukturen zusammensetzen. Bei weiter gesteigertem Wassergehalt von 90 % formieren sich die Astaxanthinmoleküle zu H-Aggregaten, wobei die Aufspaltung der hypsochrom verschobenen Bande durch die Kopplung der Excitonen in den gebildeten Dimer-Untereinheiten, die ihrerseits über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, erklärt werden kann^[105].

In der DPPC-Membran lassen sich keine der im wässrigen Medium expliziten J-Aggregatespezies nachweisen. Dies spricht für eine gerichtete Einlagerung der Astaxanthinmoleküle in die Lipiddoppelschicht mit ihren Polyketten nahezu senkrecht zur Membranoberfläche. Die Steuerung kann dabei über die polare Acyloinstruktur der Carotinoidendgruppen erfolgen, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Carbonylgruppen der Palmitoylreste des DPPC befähigt ist. So ist die Ausbildung von höchstens leicht gescherten und verdrillten H-Aggregaten bevorzugt, was dann durch die bathochrome Absorptionsschulter über 500 nm angezeigt wird. Übergeordnete größere Aggregatestrukturen sind im Vergleich zum wässrigen System nicht existent. Eine hypsochrome Schulter für gebildete H-Aggregate wird nicht beobachtet und die Suspensionen erreichen nur eine Aufhellung ins Hellrote, während nach H-Aggregation im Wässrigen eine gelb-orange Färbung resultiert. Vielmehr werden in der Membran kleinere einheitlichere Assoziate wie Dimere, Trimere und Tetramere gebildet, wobei der mittlere Assoziationsgrad mit steigender Carotinoidkonzentration und fallender Temperatur jeweils etwas zunimmt, erkennbar an der Verschiebung des Absorptionsmaximums weiter in den kurzwelligen Bereich.

2.3.2. Astaxanthindiacetat 19

Die Acetylierung der Hydroxygruppen von Astaxanthin **9** zeigt ihre Auswirkungen schon bei der Präparation der Liposomen. Der Carotinoid/Lipidfilm löst sich nur schwer von der Glaskolbenwand und die anschließende Extrusion lässt sich nur erschwert und langsam durchführen, bis sie schließlich bei der dritthöchsten Carotinoidkonzentration

sogar versagt. Dabei sind die entstandenen größeren Carotinoidpräzipitate mit bloßem Auge zu erkennen und verhindern die gewünschte Homogenität der Suspension.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Asta.diacetat}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$	
		0.13
	$c_{\text{end}}(\text{Asta.diacetat}) / \text{mmol l}^{-1}$	
1	0.07	0.22
2	0.07	0.26
3	0.07	0.26
4	0.07	0.27
5	0.08	0.26
Mittelwert ± SD	0.072 ± 0.004	0.25 ± 0.02
<i>CV</i> / mol%	55 ± 5	64 ± 7
<i>EV</i> / mol%	1.3 ± 0.2	4.6 ± 0.8

Tab. 5: Astaxanthindiacetatkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

Bei einem durchschnittlichen Carotinoidverlust von 40 % können Vesikelsuspensionen mit 1.3 mol% und 4.6 mol% Astaxanthindiacetat **19** bezogen auf DPPC erhalten werden. Bei 18 °C treten in den UV/VIS-Spektren deutlich zwei J-Aggregatebanden über 500 nm in Erscheinung, die bei den höheren Carotinoidkonzentrationen bis zur Temperaturerhöhung auf T_m erhalten bleiben (Abb. 44). Die Acetylierung der Hydroxygruppen in Astaxanthin **9** bewirkt also auch in Membranen eine Änderung des Aggregationsmusters mit der Folge, dass die Einzelmoleküle durch die fehlende Fixierung in der Membran stärker gegeneinander verschoben sind, zumal eine Stabilisierung über Wasserstoffbrückenbindungen wegfällt. An der kurzwelligen Flanke der Absorptionsbande lassen sich nach Zuhilfenahme der zweiten Ableitung zwei weitere Banden bei etwa 480 nm und 435 nm erkennen, wobei letztere auch bei der kleineren Carotinoidkonzentration noch deutlich hervortritt. Hier ändert sich schon bei Erreichen des Vorstadiums des Phasenübergangs ($T = 34$ °C) die Struktur der Bande in Richtung eines Absorptionsmaximums bei 493 nm, welches sich nach Erhöhung über T_m nach 479 nm hypsochrom verschiebt. Dies macht sich auch optisch durch eine Aufhellung der Suspension von dunkelrot nach rot-orange bemerkbar. Dies zeigt eine vorhergehende

Umstrukturierung der J-Aggregatespezies an, die wohl zunächst noch aus stärker gegeneinander verschobenen Carotinoidmolekülen bestehen, bevor dann die Auflösung in Einzelmoleküle eintritt. Bei höherer Konzentration des acetylierten Xanthophylls **19** bleiben die UV/VIS-spektroskopischen Eigenschaften der primär gebildeten J-Aggregate bis zu T_m nahezu unverändert. Die Aggregate sind wohl in diesem Fall länger stabil und nicht so anfällig gegenüber einsetzende Konformationsänderungen der Membranlipide.

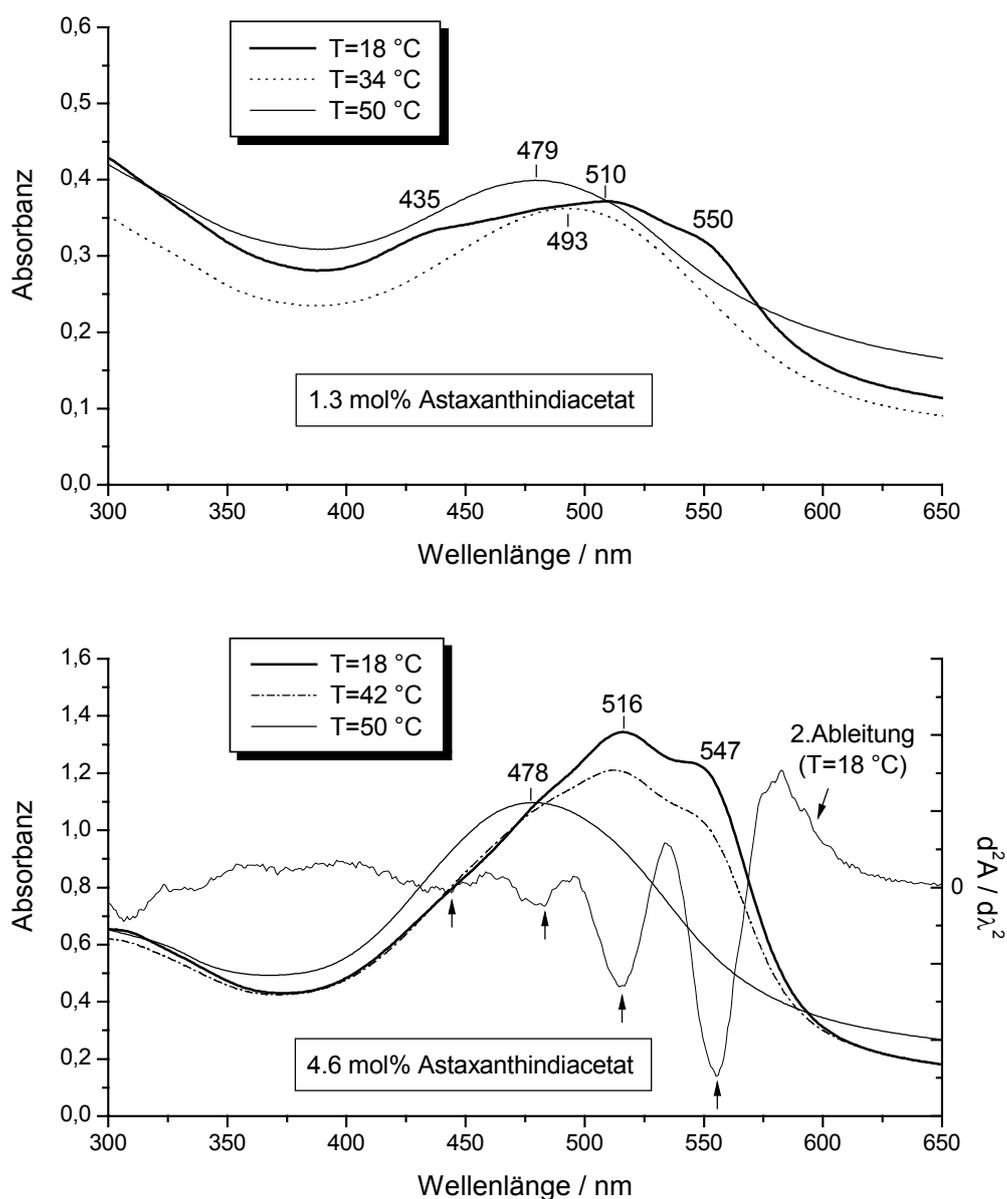


Abb. 44: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4$ °C) beladen mit verschiedenen Astaxanthindiacetatmengen (1.3 bzw. 4.6 mol%) zuzüglich der 2.Ableitung für $T = 18$ °C (rechte Ordinate)

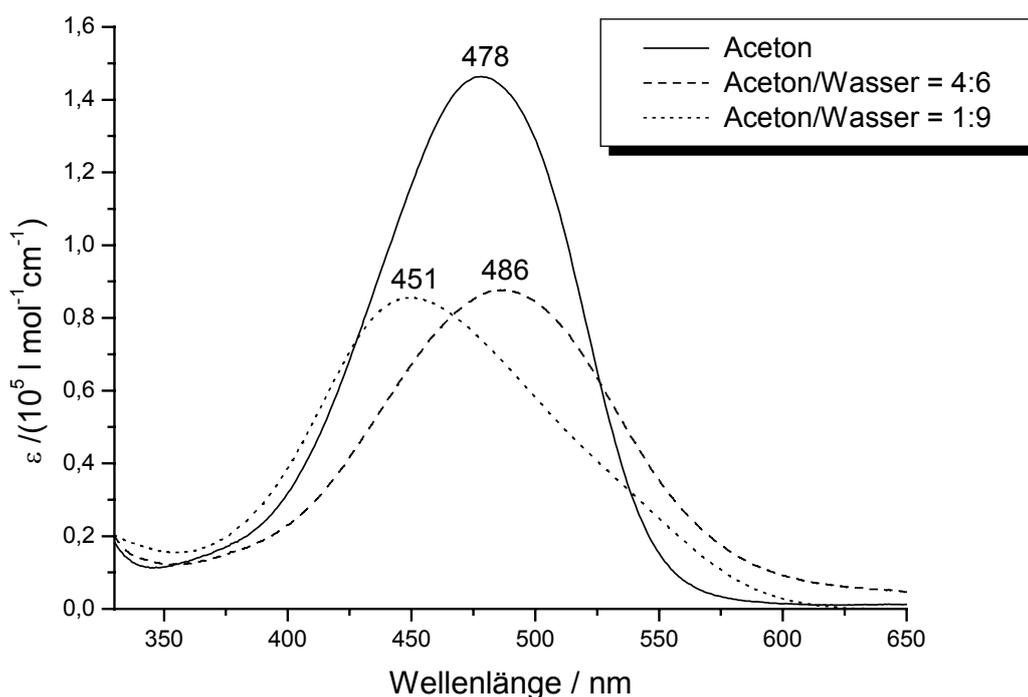


Abb. 45: UV/VIS-Spektren von Astaxanthindiacetat **19** [$c = 2 \cdot 10^{-6}$ mol/l] in Aceton/Wasser-Gemischen

Bei Betrachtung des Aggregationsverhaltens von **19** in wässrigem Aceton zeigt sich zunächst bei 60 % Wassergehalt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 486 nm (Abb. 45). Die zur langwelligen Seite hin auslaufende Flanke gibt einen Hinweis auf die Ausbildungen größerer J-Aggregate, da die Mie-Streueffekte der größeren Partikel einen größeren Beitrag zur Absorbanz im langwelligen Bereich geben als die der kleineren. Bei höherem Wasseranteil verschiebt sich das Absorptionsmaximum hypsochrom zur Monomerenbande und verweist jetzt auf die Bildung von H-Aggregaten mit vermehrt kartenstapelähnlicher Anordnung der Moleküle (Scherwinkel $\alpha \approx 90^\circ$). Die im wässrigen Medium gebildeten Aggregatespezies von **19** unterscheiden sich also UV/VIS-spektroskopisch deutlich von den in der Membran gebildeten. Bei letzteren treten offensichtlich strukturiertere Absorptionsbanden im Sinne einer J-Aggregation zu Tage, die einem loserem Verbund aus weniger Carotinoidmolekülen zugeordnet werden können. Bezüglich des Excitonmodell sind dabei aufgrund der vier erkennbaren Absorptionsmaxima mindestens Tetramere involviert, in denen die Einzelmoleküle gegeneinander verdrillt sind (Diederwinkel $\Theta \neq 0^\circ$). Unter Anwesenheit eines hydrophilen Mediums wie Wasser dagegen scheint,

primär bestimmt durch den hydrophoben Effekt, die Ausbildung von geschraubten H-Aggregaten bevorzugt, deren Ausmaße auch durch keinerlei räumliche Beschränkungen wie z. B. eine Lipiddoppelschichtmatrix limitiert sind.

2.3.3. Canthaxanthin 8

Der Einlagerung des einfachen Ketocarotinoids Canthaxanthin **8** in eine DPPC-Membran sind präparativ schnell Grenzen gesetzt. Schon bei kleinen Canthaxanthinkonzentrationen lässt sich die Extrusion nur schwer durchführen, was einen Hinweis auf größere Carotinoidassoziate gibt, die allmählich den Polycarbonatfilter zusetzen. Bei der niedrigsten Canthaxanthinkonzentration werden schon nur 57 % der eingesetzten Carotinoidmenge in den Präparationen wiedergefunden, wobei die Canthaxanthinausbeute bei der größten Konzentration bis auf 28 % abfällt. Das maximal erreichte Einlagerungsverhältnis beläuft sich somit auf 3.3 mol% Canthaxanthin bezogen auf DPPC. Die aufgenommenen UV/VIS-Spektren der untersuchten Proben ($EV = 1.4 - 3.3$ mol%) zeigen untereinander bei festgesetzter Temperatur keine signifikante Abweichungen in Bandenform und -lage. Exemplarisch werden in Abb. 46 auszugsweise die mit steigendem Temperaturgradienten erhaltenen UV/VIS-Spektren für $EV = 3.3$ mol% abgebildet.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Canthaxanthin}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$		
	0.13	0.39	0.65
	$c_{\text{end}}(\text{Canthaxanthin}) / \text{mmol l}^{-1}$		
1	0.07	0.13	0.18
2	0.07	0.15	0.18
3	0.08	0.14	0.19
4	0.08	0.13	0.20
5	0.07	0.12	0.17
Mittelwert ± SD	0.074 ± 0.005	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01
$CV / \text{mol}\%$	57 ± 6	33 ± 4	28 ± 2
$EV / \text{mol}\%$	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5

Tab. 6: Canthaxanthinkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (CV) und Einlagerungsverhältnis (EV)

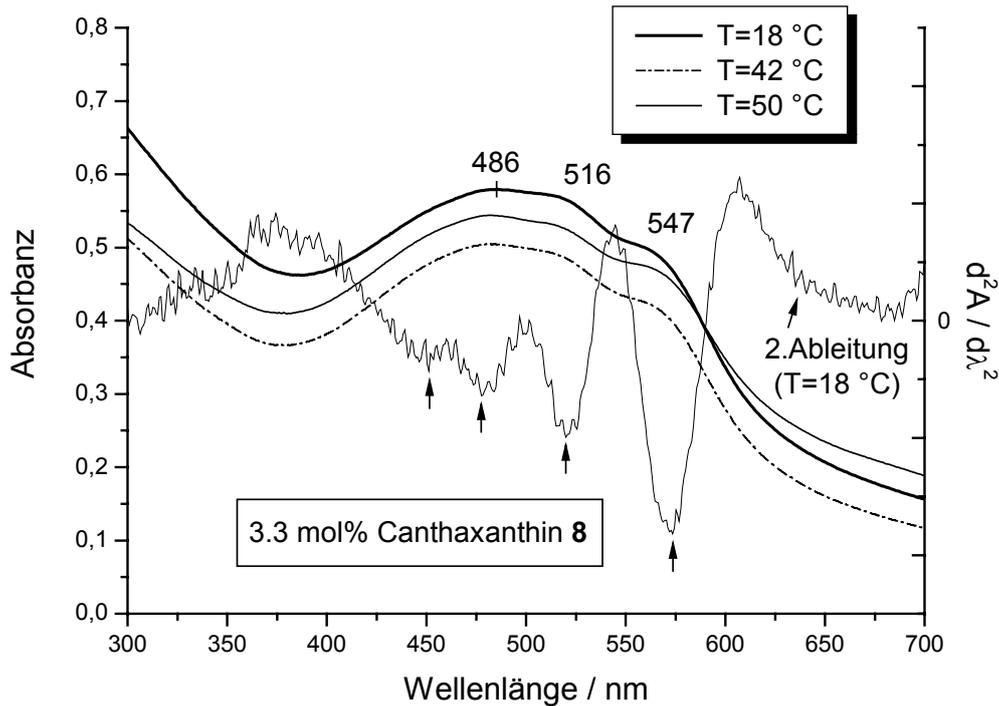


Abb. 46: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit 3.3 mol% Canthaxanthin **8** zuzüglich der 2.Ableitung für $T = 18 \text{ °C}$ (rechte Ordinate)

Die bei 18 °C ausgebildete breite Absorptionsbande mit $\lambda_{\text{max}} = 486 \text{ nm}$ und ihren bathochromen Schultern bei etwa 516 und 547 nm weist auf J-Aggregatespezies hin, wobei sich nach Hinzuziehen der zweiten Ableitung eine weitere Schulter auf der hypsochromen Seite bei ca. 450 nm zu erkennen gibt. Bei Temperaturerhöhung bis 42 °C ändert sich bis auf die kontinuierliche Abnahme der Untergrundstreuung durch die Vesikel nichts und sogar oberhalb T_m bleibt die Bandenstruktur erhalten. Selbst im flüssig-kristallinen Zustand der Membran bleibt demnach die Dissoziation der Canthaxanthinaggregate in Monomere aus. Dieses Verhalten gleicht dem des β -Carotins **3** in multilamellaren DPPC-Vesikeln, in denen es ungeachtet des Phasenzustandes der Membran stets aggregiert vorliegt^[141,143]. Die Erhöhung des Mie-Streuanteils zum langwelligen Bereich hin beim Überschreiten von T_m deutet eine Umstrukturierung der Vesikel in größere Einheiten durch Agglomeration oder sogar Fusion an. Generell ist die Untergrundstreuung der mit Canthaxanthin **8** beladenen Vesikel relativ hoch, was sich schon optisch durch die verstärkte Trübung der präparierten Suspensionen bemerkbar macht. Die gebildeten Canthaxanthinaggregate zeigen sich durch Änderungen des Lipidverbundes nahezu unbeeinflusst, indem wohl die

Canthaxanthinmoleküle untereinander stärkeren Attraktionen unterliegen, als dass sie Wechselwirkungen mit den DPPC-Molekülen in der Membran ausüben.

In Aceton/Wasser-Gemischen lässt sich die Aggregation von Canthaxanthin **8** ab einem Wasseranteil von 60 % erkennen. Nach wenigen Minuten entfärbt sich die Lösung und das UV/VIS-Spektrum zeigt nur noch Streuung an größeren Canthaxanthinpartikeln (Abb. 47). Erhöht man den Wassergehalt bis auf 90 %, so bildet sich immer deutlicher eine H-Aggregatebande aus, deren Absorptionsmaximum dann bei etwa 446 nm liegt. Hier wird eine Stapelung der Canthaxanthinmoleküle genau übereinander angestrebt, um die Kontaktfläche zum hydrophilen Medium zu minimieren. Wäre die Einlagerung der Canthaxanthinmoleküle in die DPPC-Doppelschicht mit ihren Polyketten senkrecht zur Membranoberfläche favorisiert, müssten sich ähnlich H-Aggregatfragmente bilden, was aber nicht der Fall ist. Vielmehr scheinen kleinere unabhängige Assoziate eines J-Typs in die Membran integriert, deren Einzelmoleküle mehr gegeneinander verschoben sind. Die herabgesetzte Polarität von Canthaxanthin **8** im Vergleich zu Astaxanthin **9** und die Unmöglichkeit zur Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoff der Fettsäureester verhindern die gerichtete Einlagerung von Einzelmolekülen in die Doppelschicht.

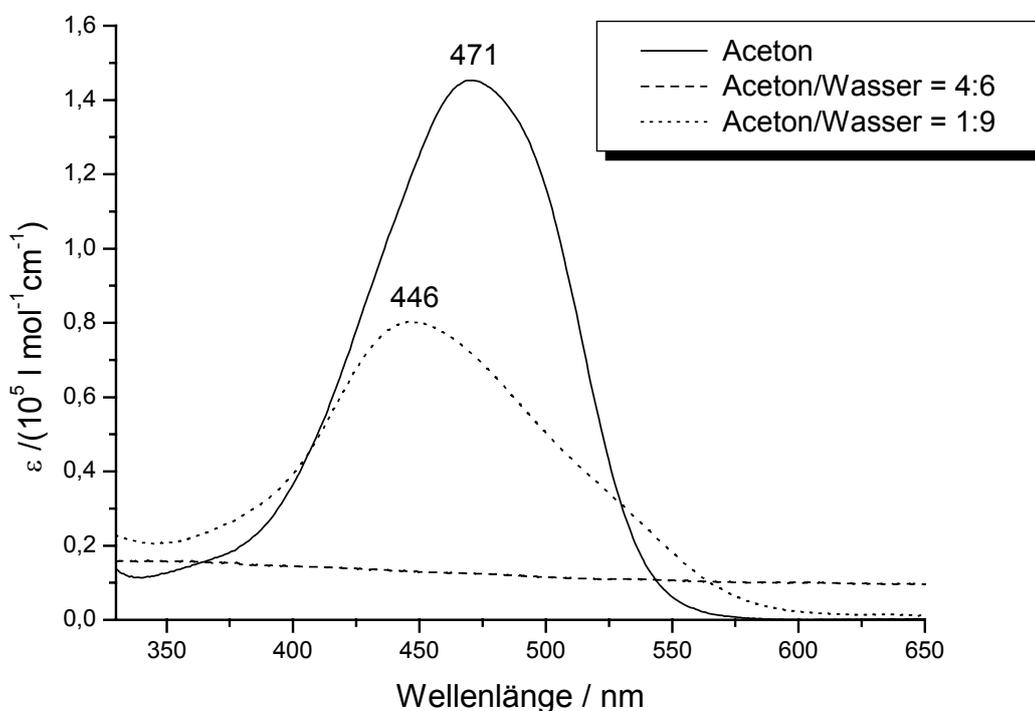


Abb. 47: UV/VIS-Spektren von Canthaxanthin **8** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

2.3.4. Actinioerythrol 26

Als weiteres Xanthophyll mit Acyloinstruktur in den Endruppen sei das Actinioerythrol **26** angeführt, welches eine im Vergleich zum Astaxanthin **9** verstärkte Koplanarität zwischen endocyclischer Doppelbindung und Polyenkette aufweist, gekoppelt mit einer begünstigten *s-trans*-Konformation an 6,7-C. Das Einlagerungsvermögen von **26** in DPPC-Liposomen ist recht groß. Dies wird schon durch merklich leichte Extrusionsdurchgänge bei der Präparation angezeigt. Mit steigender Actinioerythrolkonzentration zeichnen sich immer dunkler rot gefärbte Lipidsuspensionen ab, deren Extrusion in keinster Weise durch größere, irreversibel gebildete Actinioerythrolasoziate blockiert wird. Das spiegelt sich auch in den hohen Werten für die Carotinoideausbeute *CV* von etwa 80 % bei Einsatz großer Actinioerythrolmengen. So werden Vesikelsuspensionen mit bis zu durchschnittlich 14 mol% Actinioerythrol bezogen auf DPPC erhalten, so dass auf ein Carotinoidmolekül nur in etwa 7 Lipidmoleküle kommen.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Actinioerythrol}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$			
	0.13	0.39	0.65	0.98
	$c_{\text{end}}(\text{Actinioerythrol}) / \text{mmol l}^{-1}$			
1	0.08	0.27	0.36	0.65
2	0.07	0.26	0.40	0.68
3	0.06	0.25	0.45	0.75
4	0.06	0.18	0.52	0.87
5	0.09	0.30	0.55	0.85
Mittelwert ± SD	0.07 ± 0.01	0.25 ± 0.04	0.46 ± 0.08	0.76 ± 0.10
<i>CV</i> / mol%	54 ± 9	64 ± 12	71 ± 14	78 ± 13
<i>EV</i> / mol%	1.3 ± 0.3	4.6 ± 1.2	8.5 ± 2.3	14.0 ± 3.3

Tab. 7: Actinioerythrolkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln
zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

In den UV/VIS-Spektren sind bei 18 °C je eine H-Aggregatebande mit dem charakteristischen Verlust an Feinstruktur um 440 nm zu verzeichnen (Abb. 48). Die beiden bathochromen Schultern über 500 nm verweisen dabei auf ein nicht exakt

parallel gestapeltes Aggregat. Mit Temperaturerhöhung wandert das Absorptionsmaximum langsam bathochrom, während gleichzeitig die Extinktion im Bereich der Monomerenbande mit erkennbarer Schwingungsfeinstruktur zunimmt. Bei 1.3 mol% Actinioerythrol **26** ist die Schwingungsstruktur bei 34 °C schon vollständig ausgeprägt jedoch noch mit intensivstem vibronischen 0→2 Übergang. Dieser verliert schließlich oberhalb T_m zugunsten des 0→1 Übergangs an Intensität und das charakteristische Monomerspektrum des Actinioerythrols **26** mit $\lambda_{\max} = 502$ nm zeichnet sich ab (als Vergleich: $\lambda_{\max}(\text{Hexan})_{2\% \text{ Chloroform}} = 500$ nm).

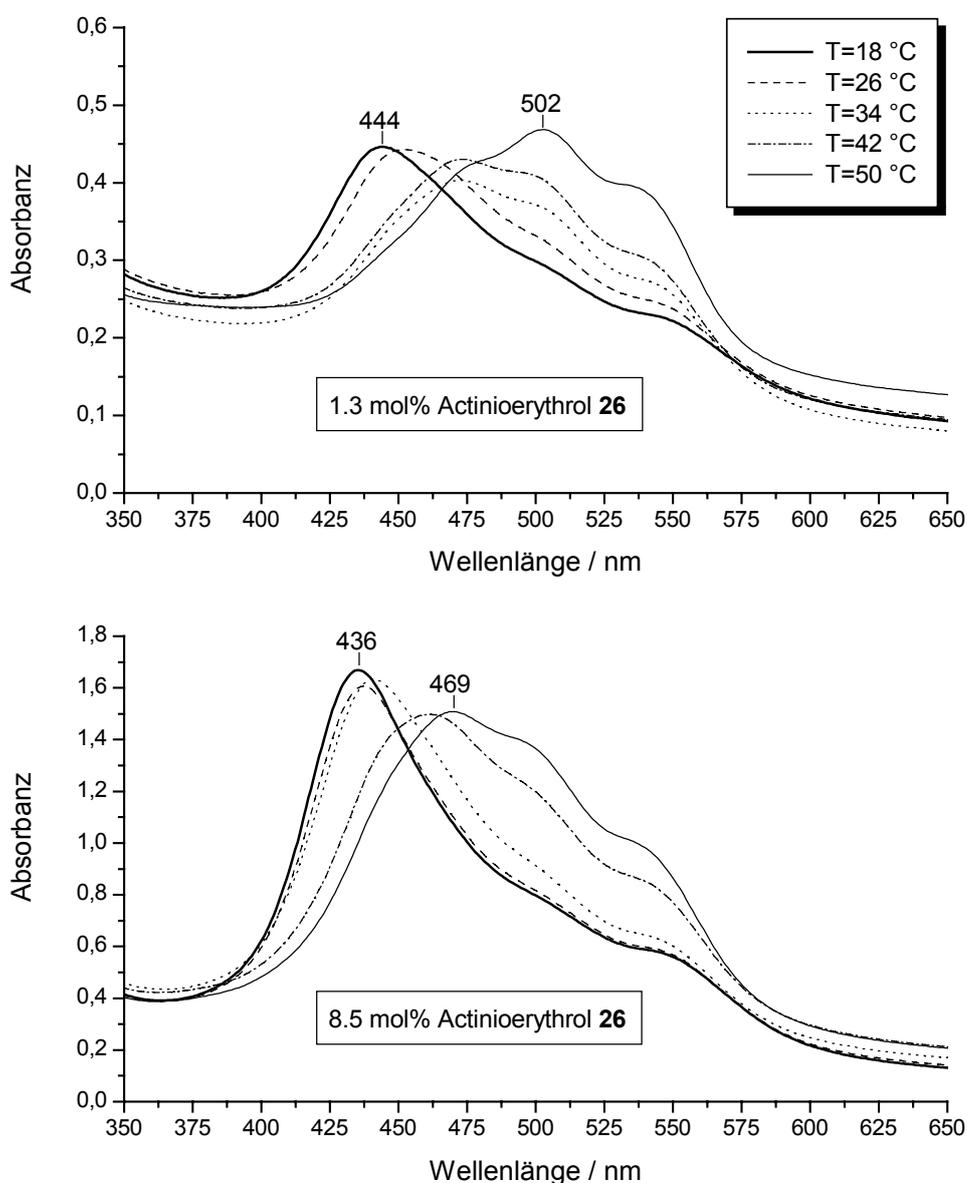


Abb. 48: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4$ °C) beladen mit verschiedenen Actinioerythrolmengen (1.3 bzw. 8.5 mol%)

Die H-Aggregatebande ist hier zur Monomerenbande im Vergleich zum Astaxanthin **9** noch um 20 nm (500 cm^{-1}) hypsochromer verschoben, was durch ein dichter gepacktes Aggregat von **26** erklärt werden kann, das wohl aus der erhöhten Planarität und möglicher *s-trans*-Konformation von Ring und Kette der Einzelmoleküle resultiert. Erhöht man nun die Actinioerythrolkonzentration in der Membran, bleibt die H-Bande bei Temperaturerhöhung immer länger erhalten. Ab 8.5 mol% Actinioerythrol bleibt oberhalb T_m sogar die Ausbildung der üblichen Carotinoidbandenstruktur aus und das Absorptionsmaximum bei ca. 470 nm entspricht dem sonst extinktionsschwächeren $0 \rightarrow 2$ Übergang. Während bei kleiner Carotinoidkonzentration eine vollständige Dissoziation der H-Aggregateeinheiten in Monomere erfolgen kann, wird dies bei höheren Konzentrationen bedingt durch die räumliche Nähe der Actinioerythrolmoleküle in der DPPC-Doppelschicht verhindert. Bei 14.0 mol% Actinioerythrol **26** lässt sich dann ein verstärkter Anstieg der Untergrundstreuung vermerken (Abb. 49) und die Vesikelsuspension ist auch nach der Extrusion stark getrübt.

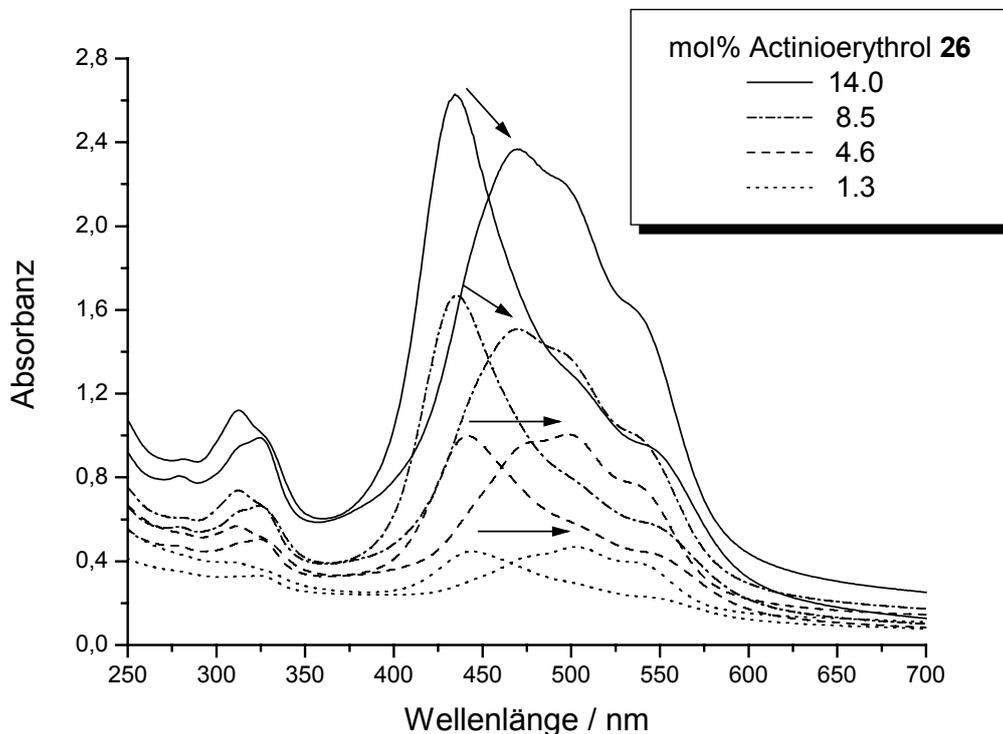


Abb. 49: Übersicht der UV/VIS-Spektren präparierter Actinioerythrol/DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4\text{ °C}$) mit unterschiedlichem *EV* (siehe Legende) bei steigendem Temperaturgradienten von 18 bis 58 °C (durch Pfeile angezeigt)

Der Anteil an DPPC-Molekülen, die sich zu gut definierten Liposomen formieren, ist geringer und die Bildung größerer undefinierter Lipid/Carotinoid-Einheiten wird möglich. Jedoch ist zu erwähnen, dass nach Temperaturerniedrigung auf 18 °C wiederum eine vollständige Rückkehr des Aggregatespektrums beobachtet wird. In wässrigem Aceton setzt die Aggregation von Actinioerythrol **26** bei etwa 70 % Wasseranteil durch die Bildung größerer J-Aggregatestrukturen ein, die sich bei höherem Wassergehalt schließlich zu H-Aggregateeinheiten umstrukturieren (Abb. 50).

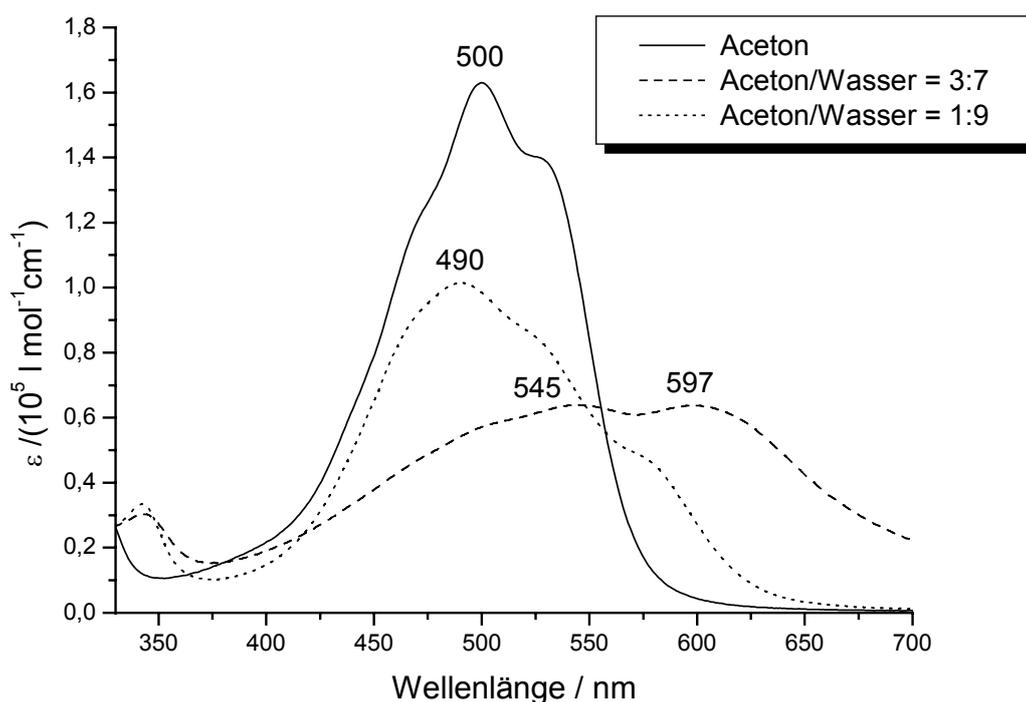


Abb. 50: UV/VIS-Spektren von Actinioerythrol **26** [$c = 2 \cdot 10^{-6}$ mol/l] in Aceton/Wasser-Gemischen

Mit 490 nm ist das Absorptionsmaximum der doch breiten H-Aggregatebande nur wenig zur Monomerenbande kurzwellig verschoben. Die bathochromen Absorptionen entstehen durch die Scherung der Moleküle in den Aggregaten. Trotz vorhandener Hydroxygruppen bleibt eine Anordnung der Carotinoidmoleküle in Form eines idealen H-Aggregats aus. Die intermolekulare Attraktion der polaren Endgruppen wird wie von Köpsel^[105] vermutet durch die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxy- und Ketogruppen des weitgehend planaren Actinioerythrolmoleküls verhindert und bedingt so die leichte Verschiebbarkeit der Carotinoide in den Aggregaten. In der DPPC-Membran hingegen lassen sich aufgrund

beobachteter größerer Exciton-Aufspaltung dichter gepackte Aggregate mit geringerem Scheranteil bestimmen. Es liegt die Vermutung nahe, dass in diesem Fall eine Stabilisierung über Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylfunktionen der Fettsäureester erfolgen kann, die bei Temperaturerhöhung mit der stärkeren Bewegung der Fettsäurereste geringer wird. Die so erreichte Fixierung von **26** in der Lipiddoppelschicht kann darüber hinaus zu einer einheitlicheren Aggregatestruktur führen.

2.3.5. Actinioerythroldiacetat 27

Nach Acetylierung der Hydroxygruppen in **26** und damit Verringerung der Polarität wird die Einlagerung des Carotinoids in die DPPC-Liposomen wie erwartet erschwert. Man erhält carotinoidbeladene Vesikel mit bis zu durchschnittlich höchstens 3.1 mol% Actinioerythroldiacetat **27** bezogen auf DPPC. Es werden dabei letztendlich nur noch 26 % der eingesetzten Xanthophyllmenge in die Liposomen eingelagert. Das Extrusionsvolumen muss dabei auf 300 μ l begrenzt werden, um einer gänzlichen Verstopfung des Polycarbonatfilters zu entgehen.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 \pm 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Actinio.diacetat}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$		
	0.13	0.39	0.65
	$c_{\text{end}}(\text{Actinio.diacetat}) / \text{mmol l}^{-1}$		
1	0.07	0.18	0.18
2	0.08	0.13	0.15
3	0.08	0.15	0.18
4	0.06	0.14	0.15
5	0.07	0.13	0.17
Mittelwert \pm SD	0.07 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
<i>CV</i> / mol%	54 \pm 9	39 \pm 6	26 \pm 4
<i>EV</i> / mol%	1.3 \pm 0.3	2.8 \pm 0.7	3.1 \pm 0.7

Tab. 8: Actinioerythroldiacetatkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

Die nach der Extrusion erhaltenen Lipiduspensionen sind dunkelrot-violett gefärbt. Die UV/VIS-Spektren zeigen unabhängig der Carotinoidkonzentration eine breite

Absorptionsbande mit einem Absorptionsmaximum um 516 nm (Abb. 51). Die Veresterung der Hydroxygruppen macht den in der Membran ausgeprägten H-Aggregatebildner Actinioerythrol **26** zu einem bevorzugten Bildner von J-Aggregatespezies. Bathochrome Schultern sind bei 530 und 590 nm zu erkennen, wobei letztere die Violettfärbung verursacht. Von 18–42 °C sind bis auf minimale Schwankungen der Untergrundstreuung keine charakteristischen Änderungen der Absorptionsbande zu vermerken. Überschreitet man T_m tritt sofortiger Farbumschlag nach hellrot ein und der Streuanteil nimmt drastisch zu, was wohl einer einsetzenden Agglomeration der Liposomen zuzuschreiben ist. Das Absorptionsspektrum ähnelt dem des Carotinoids in Lösung mit erkennbarer Schwingungsfeinstruktur. Abkühlen unter T_m reproduziert die Bildung der Aggregate in der Suspension unter Rückkehr der violetten Farbe.

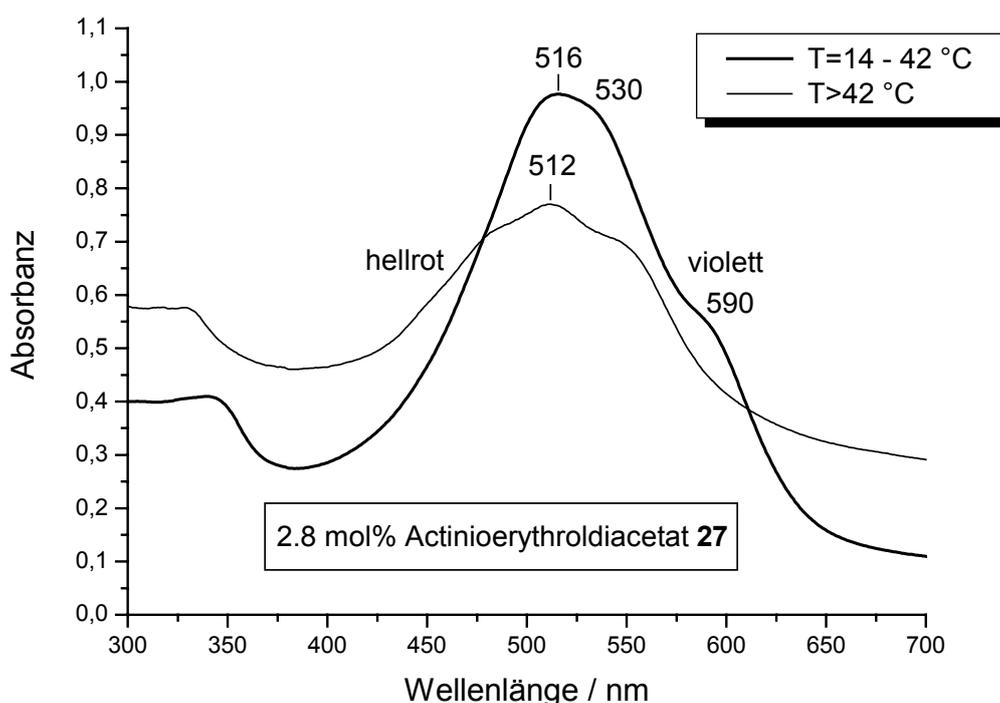


Abb. 51: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4$ °C) beladen mit 2.8 mol% Actinioerythroldiacetat **27**

Die Aggregation von **27** in der Membran wird aufgrund der geringen Polarität größtenteils durch Dispersionswechselwirkungen bestimmt. Wie auch schon beim Astaxanthindiacetat **19** bewirkt die fehlende Stabilisierung über die Carotinoidengruppen und die leichte sterische Hinderung der Acetylsubstituenten eine geschraubte

und gescherte Anordnung der Moleküle im Aggregat. Da hier nicht unbedingt eine favorisierte Ausrichtung der Carotinoidmoleküle in der Lipiddoppelschicht zu erwarten ist, sind auch leicht unterschiedliche gegenseitige Orientierungen von gebildeten kleinen Aggregateinheiten möglich. Die bis dato noch nicht untersuchte Aggregation von **27** in Aceton/Wasser-Gemischen ist UV/VIS-spektroskopisch in Abb. 52 dargestellt. Ab 70 % Wasseranteil setzt die Aggregation mit der Bildung größerer und nahezu farbloser J-Aggregatespezies ein. Mit 80 % Wassergehalt lassen sich J-Aggregate mit violetter Farbgebung nachweisen, während bei 90 % Wasseranteil eine über Stunden farbstabile gelb-orange Lösung entsteht, die nun die Bildung von H-Aggregaten anzeigt. Hier macht sich der in der Lipidmembran fehlende hydrophobe Effekt des Wassers bemerkbar, der nun die Carotinoidmoleküle zur Ausbildung von dicht gestapelten H-Aggregaten mit möglichst kleiner Oberfläche zwingt. Die Tendenz dorthin wird beim Actinioerythroldiacetat **27** durch die verstärkte Planarität von Polyenkette und Endgruppen unterstützt, so dass das Absorptionsmaximum der H-Bande etwa dem der sechsringanalogen Verbindung **19** entspricht, obwohl das Monomer um 27 nm bathochromer absorbiert.

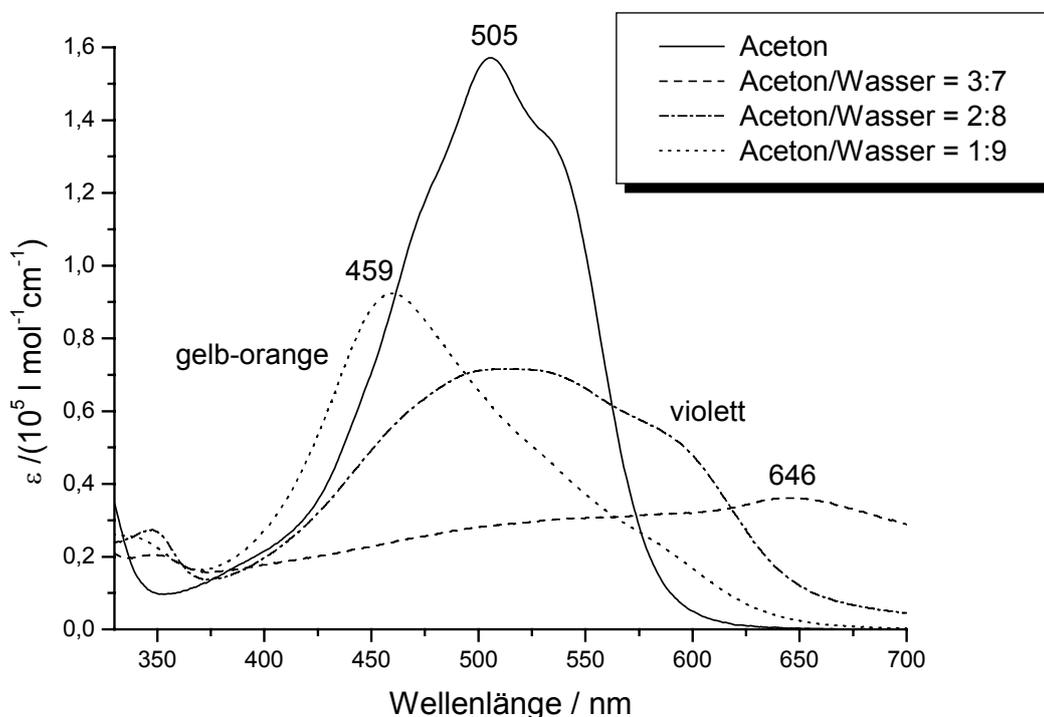


Abb. 52: UV/VIS-Spektren von Actinioerythroldiacetat **27** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

2.3.6. **Violerythrin 28**

Oxidation von Actinioerythrol **26** liefert das sich in Chloroform mit dunkelblauer Farbe lösende Violerythrin **28** mit 1,2-Diketoendgruppe. Das Aggregationsverhalten sollte dem des Ketocarotinooids Canthaxanthin **8** ähneln. Aufgrund der Schwerlöslichkeit von **28** werden bei der Präparation der unilamellaren Vesikel zunächst 4 ml einer nur 65 μM Violerythrinlösung in Dichlormethan zugesetzt, damit das Carotinoid vor der Extrusion in einer Konzentration von $c_{\text{ein}} = 0.13 \text{ mmol/l}$ vorliegt (vgl. Kap. 4.2.1.2.). Die Konzentrationsbestimmung von **28** nach der Extrusion in den leicht blau gefärbten Suspensionen durch Eintragen in Ethanol gelingt nicht, da sich Violerythrin **28** in Ethanol nicht vollständig löst. Abb. 53 zeigt das UV/VIS-Spektrum der erhaltenen Vesikelsuspension bei 18 °C. Anhand der kleinen Extinktion kann das Einlagerungsverhältnis Carotinoid/Lipid mit $EV < 1 \text{ mol\%}$ abgeschätzt werden. Zusätzlich ist das Spektrum von unbeladenen DPPC-Vesikeln abgebildet, welches allein durch die Streuung an den Liposomen entsteht und bei 800 nm an das Spektrum mit Carotinoidabsorption angepasst wurde, um diesem als Untergrundkorrektur zu dienen.

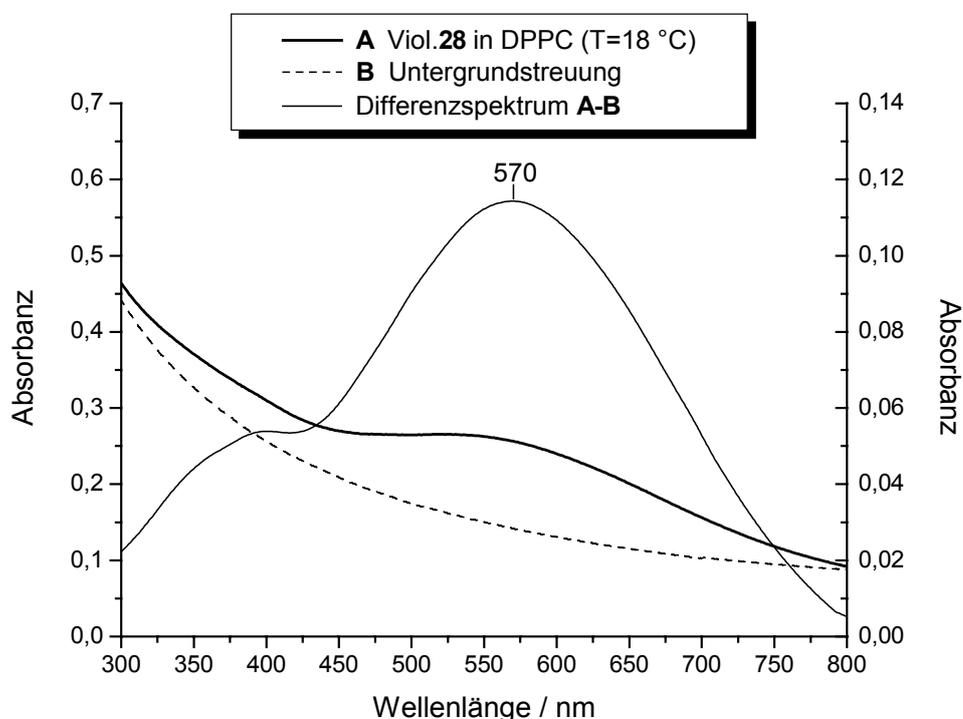


Abb. 53: UV/VIS-Spektren von DPPC-Vesikeln ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) bei 18 °C mit und ohne Violerythrin **28** und das durch Differenzbildung erhaltene „reine“ Carotinoidspektrum von Violerythrin **28** in der Membran (rechte Ordinate)

Als Differenzspektrum erhält man näherungsweise das reine Carotinoidspektrum der präparierten Vesikel (rechte Ordinate in Abb. 53). Gibt man nun die doppelte Menge Violerythrin **28** zu, lagert sich noch weniger in die DPPC-Membran ein, da sich größere Carotinoidassoziate bilden, die auch bei der Extrusion den Polycarbonatfilter schnell zusetzen. Wie auch schon beim Canthaxanthin **8** zeigen die UV/VIS-Spektren ungeachtet dem sich ändernden Streuanteil bei Temperaturerhöhung keine merkliche Veränderung. Die in die Membran integrierten Carotinoidaggregate bleiben demnach von der Zustandsform der Lipiddoppelschicht unbeeinflusst. Die Carotinoidabsorption erstreckt sich dabei weit in den bathochromen Bereich und erzeugt eine breite Bande mit $\lambda_{\max} = 570$ nm. Die gerichtete Einlagerung von Violerythrin in die Lipiddoppelschicht zur Generation von H-Aggregaten bleibt erwartungsgemäß auch hier aus. Für die Untersuchung der Aggregation im Aceton/Wasser-System geht man von einer gesättigten Lösung von **28** in Aceton aus, die dann für das jeweilige Mischungsverhältnis auf $1/10$ verdünnt wird. Die Endkonzentration kann dabei auf $2 \cdot 10^{-7}$ mmol/l abgeschätzt werden.

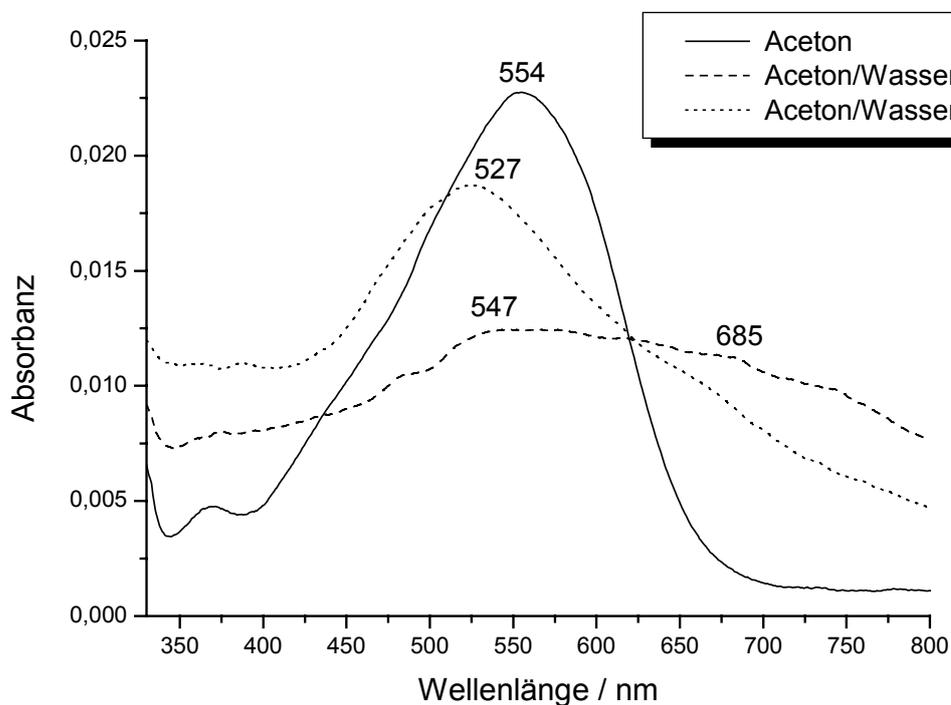


Abb. 54: UV/VIS-Spektren von Violerythrin **28** [$c \approx 2 \cdot 10^{-7}$ mol/l] in Aceton/Wasser-Gemischen

Ab 70 % Wasseranteil setzt die Bildung von unterschiedlichen größeren Aggregatestrukturen ein, die sich mit Erhöhung des Wassergehalts zu definierteren H-Aggregaten umformieren (Abb. 54). Durch den hydrophoben Effekt des Wassers forciert und gegenseitige van-der-Waals-Attraktion stabilisiert können sich die planaren Violerythrinmoleküle in einer schichtartigen Struktur übereinanderlagern. Es zeigt sich, dass für das Verhalten in der DPPC-Membran die Substitution der Carotinoidendgruppe maßgebender ist, als es Faktoren wie Planarität des Moleküls und *s-trans*-Anordnung von Polyenkette und Seitengruppe sein können. Letztere bewirken eher die leichte Kristallisationsbereitschaft und auch Schwerlöslichkeit von Violerythrin **28** im Vergleich zu analogen Sechsringcarotinoiden.

2.3.7. Zeaxanthin 6

Das natürlich vorkommende Dihydroxycarotinoid (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** ist das mit am häufigsten untersuchte Carotinoid bezüglich seiner membranbezogenen Eigenschaften und Funktionen. Unter Zuhilfenahme von Lineardichroismus-Messungen und Röntgenbeugungsdaten wird für die durchschnittliche Orientierung der Übergangsdipole von **6a** in einer DMPC-Membran ein Winkel von etwa 24 – 26 ° bezüglich der Normalen zur Membranoberfläche bestimmt^[84,144]. In der etwas dickeren DPPC-Doppelschicht sollte ebenfalls eine Vorzugsrichtung, jetzt aber mit der Tendenz zu einem kleineren Neigungswinkel zur Normalen, existieren. Das hier untersuchte Zeaxanthin **6** fällt nach der Synthese als ein Gemisch der drei stereoisomeren Formen (3*R*,3'*R*)-, (3*S*,3'*S*)- und (3*R*,3'*S*)-Zeaxanthin an. Die Präparation der unilamellaren Vesikel mit Zeaxanthin **6** verläuft reibungslos. Dabei fällt auf, dass auch bei den größeren Carotinoidkonzentrationen die Extrusion ohne großen Widerstand betrieben werden kann, was die Bildung von zunächst irreversiblen größeren Zeaxanthinaggregaten ausschließt und auf eine gute Integration des Carotinoids in die Membran schließen lässt. Über den ganzen Konzentrationsbereich belaufen sich die Carotinoidausbeuten bei der Präparation auf $CV = 60 - 80 \%$ (Tab. 9).

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Zeaxanthin}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$			
	0.13	0.39	0.65	1.30
	$c_{\text{end}}(\text{Zeaxanthin}) / \text{mmol l}^{-1}$			
1	0.07	0.20	0.45	0.84
2	0.10	0.27	0.54	0.89
3	0.10	0.26	0.50	0.79
4	0.09	0.27	0.46	0.74
5	0.10	0.28	0.49	0.60
Mittelwert ± SD	0.09 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.49 ± 0.04	0.77 ± 0.11
$CV / \text{mol}\%$	69 ± 10	67 ± 10	75 ± 8	59 ± 10
$EV / \text{mol}\%$	1.7 ± 0.4	4.8 ± 1.0	9.0 ± 1.7	14.2 ± 3.5

Tab. 9: Zeaxanthinkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln
zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (CV) und Einlagerungsverhältnis (EV)

Sogar die 10fache Menge der minimal zugesetzten Carotinoidmenge ist möglich und es resultieren Liposomen mit einem Zeaxanthingehalt von durchschnittlich 14.2 mol% bezogen auf DPPC. Dies ähnelt sehr dem gezeigten Einlagerungsverhalten von Actinioerythrol **26** in die DPPC-Membran. Im folgenden sind nun die temperaturabhängigen UV/VIS-Spektren der präparierten Liposomen mit unterschiedlichem Zeaxanthingehalt abgebildet (Abb. 55 und 56).

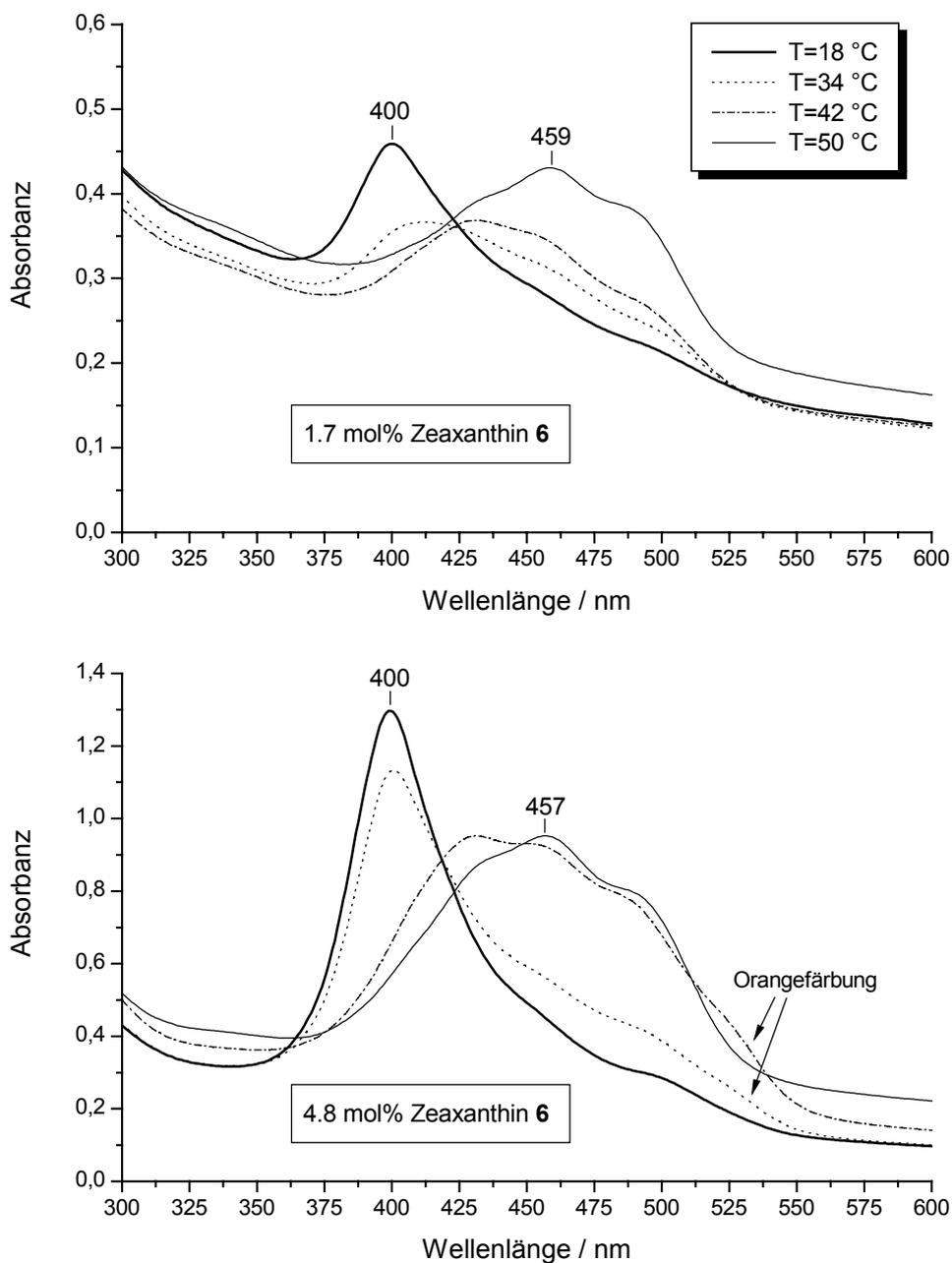


Abb. 55: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$) beladen mit verschiedenen Zeaxanthinmengen (1.7 bzw. 4.8 mol%)

Schon bei 1.7 mol% Zeaxanthin **6**, was einem Carotinoid/Lipid-Verhältnis von etwa 1:60 entspricht, bilden sich bei 18 °C in der Lipidmembran H-Aggregate aus, bewiesen durch die hypsochrom verschobene und schmale Absorptionsbande bei 400 nm. Dies deckt sich gut mit der Beobachtung der Aggregation von (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** in der DPPC-Membran sogar bei kleinen Pigmentkonzentrationen^[145], dort jedoch in einem geringeren Ausmaß mit deutlich größerem Anteil der monomeren Form. Ab 34 °C tritt dann langsam Monomerisierung auf Kosten der höheren Aggregate ein, erkennbar am Intensitätsverlust der H-Bande und Erhöhung der Extinktion an der bathochromen Flanke. Oberhalb T_m gibt sich charakteristische Carotinoidepektrum mit $\lambda_{max} = 459$ nm zu erkennen und jegliche Aggregation ist aufgehoben. Nach Abkühlung bildet sich die H-Aggregatebande zurück und beweist die Reversibilität des Prozesses in der Membran. Bei 4.8 mol% Zeaxanthin **6** aggregieren die Moleküle noch bei einer höheren Temperatur in einem verstärkten Ausmaß. Die ab 34 °C langsam einsetzende Dissoziation der Aggregate in Monomere geht im UV/VIS-Spektrum neben dem Vorhandensein der immer noch extinktionsstarken H-Bande mit deutlich bathochromen Absorptionen um 525 nm einher, die für eine Orangefärbung der Vesikelprouben sorgen und nach Überschreiten von T_m zurückgehen, so dass die Suspensionen wieder gelb gefärbt sind. Hier treten demnach Umstrukturierungsprozesse in den Aggregaten durch z. B. Verschiebung und Verdrillung der Pigmentmoleküle zueinander in Erscheinung, die bathochrome Übergänge erlauben und die Monomerisierung der Zeaxanthinmoleküle begleiten. Bei 50 °C liegt das Absorptionsmaximum 2 nm hypsochromer als bei der kleineren Zeaxanthinkonzentration mit leichter Intensitätsteigerung an der kurzwelligen Seite zugunsten des vibronischen 0→2 Übergangs. Dies lässt ähnlich wie bei Actinioerythrol **26** auf die Anwesenheit von noch kleinen Assoziaten wie Dimere in einem geringen Anteil schließen, deren hypsochrome Absorption der Monomerenbande überlagert ist. Dieser Effekt wird erwartungsgemäß mit Steigerung der Pigmentkonzentration verstärkt, da die Zeaxanthinmoleküle in der DPPC-Doppelschicht dichter gedrängt vorliegen. Mit Erhöhung auf 9.0 mol% Zeaxanthin **6** liegt das Absorptionsmaximum oberhalb T_m bei 452 nm und die kurzwellige Schulter ist verbreitert. Steigert man den Zeaxanthingehalt in der Präparation auf 14.2 mol%, liegt im flüssig-kristallinen Zustand der DPPC-Membran das Absorptionsmaximum bei 429 nm und auch bei 380 nm ist noch eine Absorption zu erkennen. Neben den kleinen Assoziaten existieren noch höher aggregierte Carotinoidepezies, deren Überführung in Monomere bei dem zu geringen DPPC-Gehalt nicht mehr gelingt.

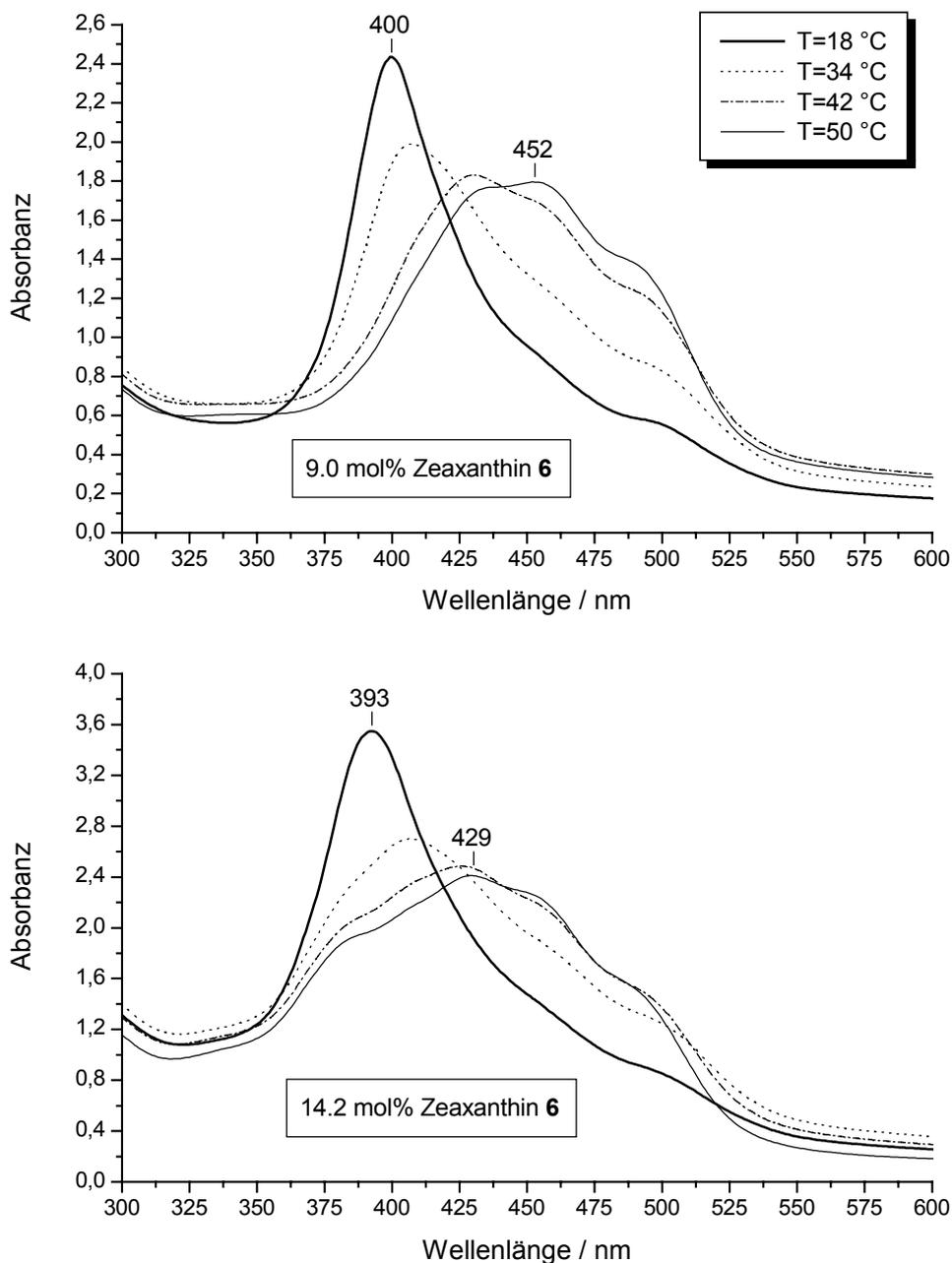


Abb. 56: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit verschiedenen Zeaxanthinmengen (9.0 bzw. 14.2 mol%)

Dabei ist zu beachten, dass die Präparation der Liposomen mit 14.2 mol% Zeaxanthin **6** mit einer großen Schaumbildung einhergeht, so dass die Formation der Lipidmoleküle allein zu Vesikeln nicht mehr gegeben ist. Die effektive Lipidkonzentration wird noch herabgesetzt und die Bildung unabhängiger Zeaxanthinaggregate und undefinierter Carotinoid/Lipid-Fragmente wird wahrscheinlicher. Bei 18 °C wandert das Absorptionsmaximum der H-Bande auf 393 nm hypsochrom und nähert sich der Lage der

scharfen H-Aggregatebande von Zeaxanthin **6** in einem Aceton/Wasser-Gemisch von 9:1 (Abb. 57). Dort konvergiert die kurzwellige Verschiebung durch die Bildung von Aggregaten ab einer Größe von 10 – 12 Monomeren gegen einen konstanten Wert^[105], der bei 388 nm liegt. Damit vergleichend sind also in einer DPPC-Membran mit einem Zeaxanthingehalt < 10 mol% im Aggregationsstatus kleinere Assoziate als Decamere vorherrschend. Die kleinen Absorptionen an der bathochromen Flanke unterhalb 500 nm sind wohl noch einem Monomeranteil mit den entsprechenden 0→0 und 0→1 Übergängen zuzuschreiben. Die energieärmeren Übergänge im Wässrigen geben indes Aufschluss über eine vom idealen H-Aggregat abweichende gescherte und helical tordierte Aggregategeometrie. In Aceton mit 60 % Wasseranteil erkennt man die einsetzende Aggregation an den bei 378 und 516 nm auftretenden Absorptionsbanden, die die noch zunächst ungeordnete Annäherung der Carotinoidmoleküle beschreiben. Im Gegensatz zu den isomerenrein untersuchten Zeaxanthinen^[105] sind hier bathochrom absorbierende Primärspezies nachweisbar. Bei höherem Wassergehalt bilden sich dann H-Aggregate mit regelmäßiger Anordnung aus.

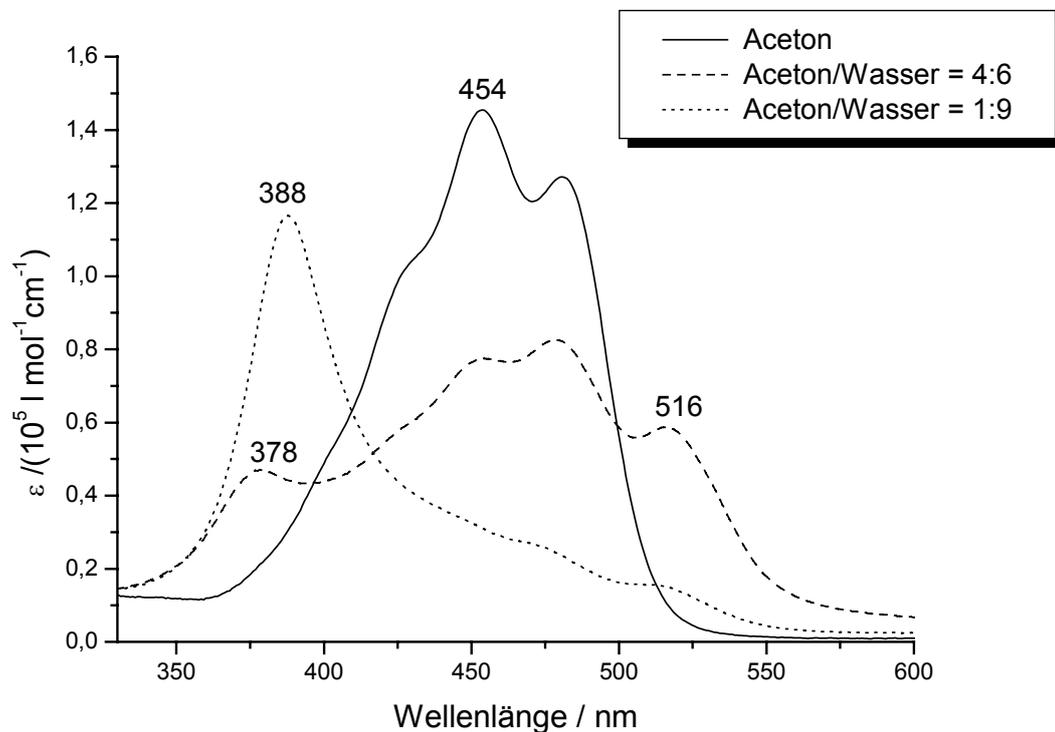


Abb. 57: UV/VIS-Spektren von Zeaxanthin **6** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

2.3.8. Lutein 7

Lutein 7 unterscheidet sich von Zeaxanthin 6 grundsätzlich in der Position einer terminalen Ringdoppelbindung, die sich in Lutein 7 zwischen C-4' und C-5' befindet. Sie steht somit nicht mehr in Konjugation zum Polyensystem, was nicht nur Auswirkungen auf die spektroskopischen Eigenschaften, sondern auch auf die stereochemischen Konformationen der Moleküle hat. Beim Lutein 7 ist die Möglichkeit zur Rotation einer Endruppe um die Einfachbindung C6'-C7' gegeben, was eine große Anzahl von Orientierungen der Hydroxygruppe an C-3' ermöglicht. Aus diesem Grund wird dem Luteinmolekül in einer Lipiddoppelschicht die Fähigkeit zugesprochen, mit beiden Hydroxygruppen an C-3 und C-3' mit derselben polaren Zone der Membran zu wechselwirken, was in direkter Konsequenz eine Anordnung parallel zur Membranoberfläche ermöglicht^[146,147]. Bezeichnenderweise sind für Lutein 7 im Vergleich zu (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin 6a bei gleichen Ausgangskonzentrationen die effektiv eingelagerten Carotinoidmengen in den unilamellaren DPPC-Vesikeln stets größer, bei kleinen Konzentrationen sogar um bis zu 20 %, was auch von Schmitz^[104] beobachtet wurde und auch für SUV hauptsächlich bestehend aus Eidotter-Phosphatidylcholin gilt^[148]. In MLV aus gesättigten Lipiden dagegen ist die Ausbeute der Einlagerung für (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin 6a stets höher als für Lutein 7, so dass auf eine höhere interlamellare Verteilung bei 6a geschlossen wird, während 7 intralamellar stärker gebunden scheint^[90,91].

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Lutein}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$		
	0.13	0.39	0.65
	$c_{\text{end}}(\text{Lutein}) / \text{mmol l}^{-1}$		
1	0.10	0.34	0.47
2	0.08	0.36	0.53
3	0.12	0.30	0.49
4	0.12	0.31	0.54
5	0.11	0.37	0.60
Mittelwert ± SD	0.11 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.53 ± 0.05
<i>CV</i> / mol%	85 ± 18	87 ± 10	82 ± 10
<i>EV</i> / mol%	2.0 ± 0.6	6.3 ± 1.2	9.7 ± 1.9

Tab. 10: Luteinkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

Bei der Vesikelpräparation lässt sich mit steigender Luteinkonzentration die Extrusion immer leichter praktizieren. Beim Einsatz von 0.65 mmol/l Lutein 7 tritt dann schon deutlich störende Schaumbildung auf, so dass keine größeren Ausgangskonzentrationen eingesetzt werden. In den UV/VIS Spektren erkennt man bei 18 °C im ganzen Konzentrationsbereich erwartungsgemäß die stark ausgeprägte H-Aggregatebande bei 398 nm, mit jedoch zusätzlich deutlichen Absorptionen bei 450 und 490 nm (Abb. 58). Diese weisen mit ihrer Lage ähnlich der Monomerenbande auf das Vorhandensein von einzelnen Luteinmolekülen hin, deren erhöhter Anteil im Vergleich zu Zeaxanthin 6 Hinweise auf einen bestimmten Pool von Luteinmolekülen in der Doppelschicht liefert, denen die Aggregation nicht möglich ist. Dies trifft für Carotinoidmoleküle mit ihrer möglichen Orientierung parallel zur Membranoberfläche zu, die aufgrund der zwischengeschobenen Fettsäurereste schlecht aggregieren können. Ab 34 °C verliert in allen Fällen von 2.0 bis 9.7 mol% Lutein 7 bezogen auf DPPC die H-Bande an Intensität, das Absorptionsmaximum wandert bathochrom und die Extinktion im Bereich der Monomerenabsorption nimmt zu. Bis zum Erreichen von T_m tritt nun sukzessive die Auflösung der Aggregate über kleinere Unterstrukturen wie Di-, Tri- und Tetramere in Monomere ein, bis bei 50 °C das Monomerspektrum in Erscheinung tritt. Bei den beiden höheren Luteinkonzentrationen ist an der kurzwelligen Flanke der Bande Extinktionssteigerung zu erkennen, da hier eine vollständige Monomerisierung nicht erreicht werden kann. Bei 9.7 mol% Lutein 7 lässt sich vermehrt Untergrundstreuung beobachten, was für eine Agglomeration der präparierten Liposomen sprechen kann. Bei dieser höchst erreichten Konzentration ist auch eine Instabilität der Vesikel denkbar, die dann vor allem durch die parallel zur und an der Membranoberfläche gelegenen Luteinmoleküle verursacht wird. Damit wird die Bildung größerer undefinierter Carotinoid/Lipid-Fragmente auf Kosten der sonst favorisierten globulären Phospholipidstrukturen begünstigt. Die Aggregation von Lutein 7 im wässrigen Aceton zeigt sich ab einem Wassergehalt von 60 % an, indem sich übergangslos H-Aggregate bilden (Abb. 59). Für die Absorptionen bei 450 und 480 nm sind noch zunächst vorhandene Monomere verantwortlich. Bei Steigerung des Wassergehalts bildet sich die H-Bande bei 380 nm deutlich aus und die bathochromen Schultern, von denen eine über 500 nm liegt, werden nun nicht mehr durch Einzelmoleküle, sondern durch die Abweichungen der Aggregatestrukturen von der idealen „card-stacked“-Geometrie verursacht.

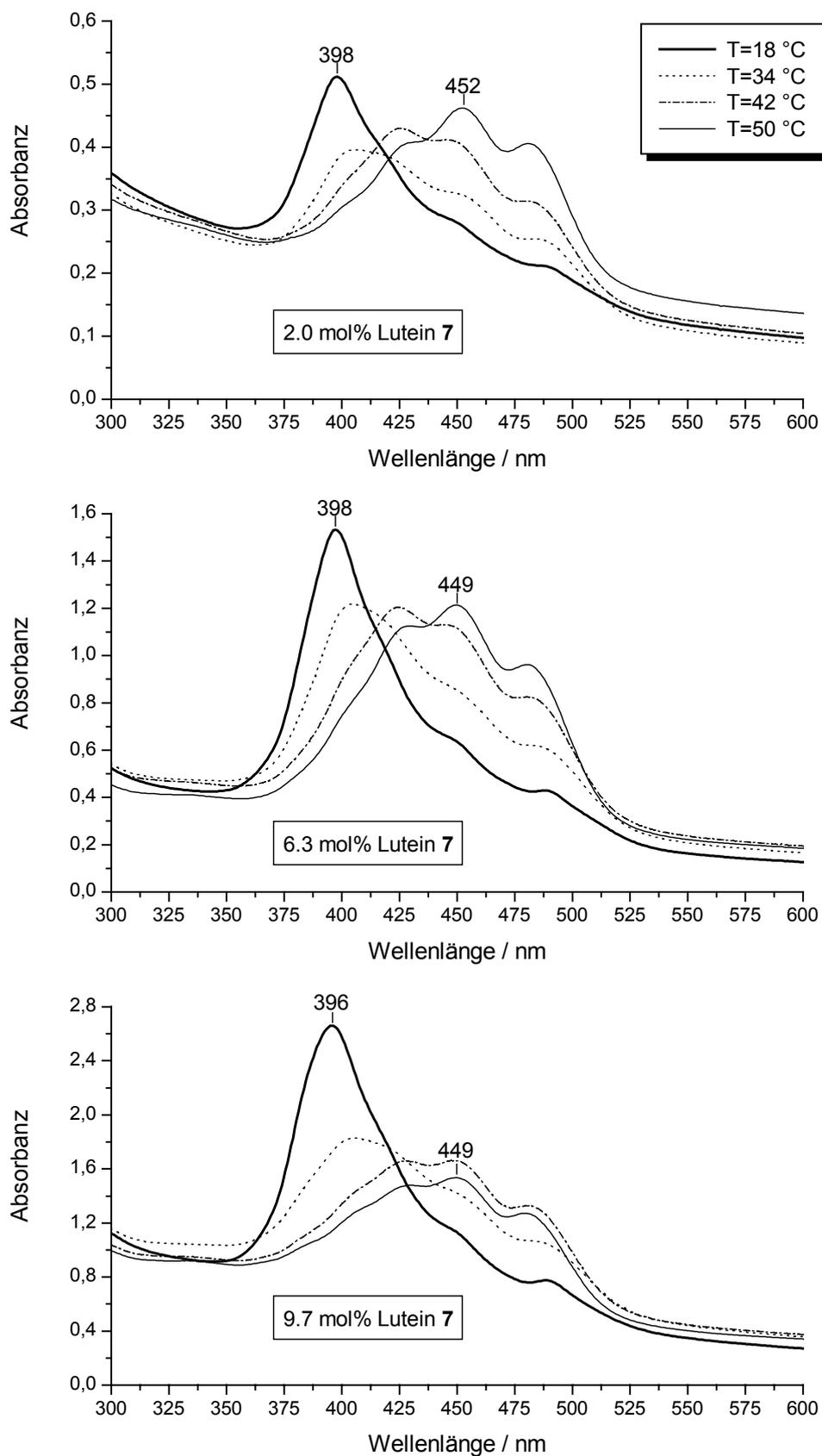


Abb. 58: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$) beladen mit verschiedenen Luteinmengen (2.0, 6.3 bzw. 9.7 mol%)

Damit liegt das Absorptionsmaximum der Aggregate im Wässrigen etwa 20 nm hypsochromer als das der Aggregate, die in der DPPC-Membran gebildet werden, was den höheren Assoziationsgrad im wässrigen System beschreibt und vielleicht auch für eine dichter gepackte Struktur dort spricht. Zudem ist dem Aggregatespektrum von **7** in der Lipiddoppelschicht stets ein erkennbarer Anteil des Monomerspektrums überlagert, der mit Temperaturerhöhung dann noch deutlich zunimmt. So existieren beim Lutein **7** wie beim Zeaxanthin **6** in der DPPC-Membran temperaturabhängige Gleichgewichte zwischen gleichmäßig strukturierten höheren H-Aggregaten, kleineren Aggregateinheiten (Di-, Tri- und Tetramere) und Monomeren. Die zunehmende Membranfluidität stört die Dispersions- und elektrostatischen Wechselwirkungen der Dihydroxyxanthophyllmoleküle untereinander, die im Festphasenzustand der Membran die geordnete H-Aggregation bewirken. In dem noch folgenden Kap. 2.4.3.1. kann beim isomerenreinen und chiralen Carotinoid Lutein **7** mithilfe der CD-Spektroskopie Näheres über die in der Membran auftretenden Aggregatestrukturen ausgesagt werden.

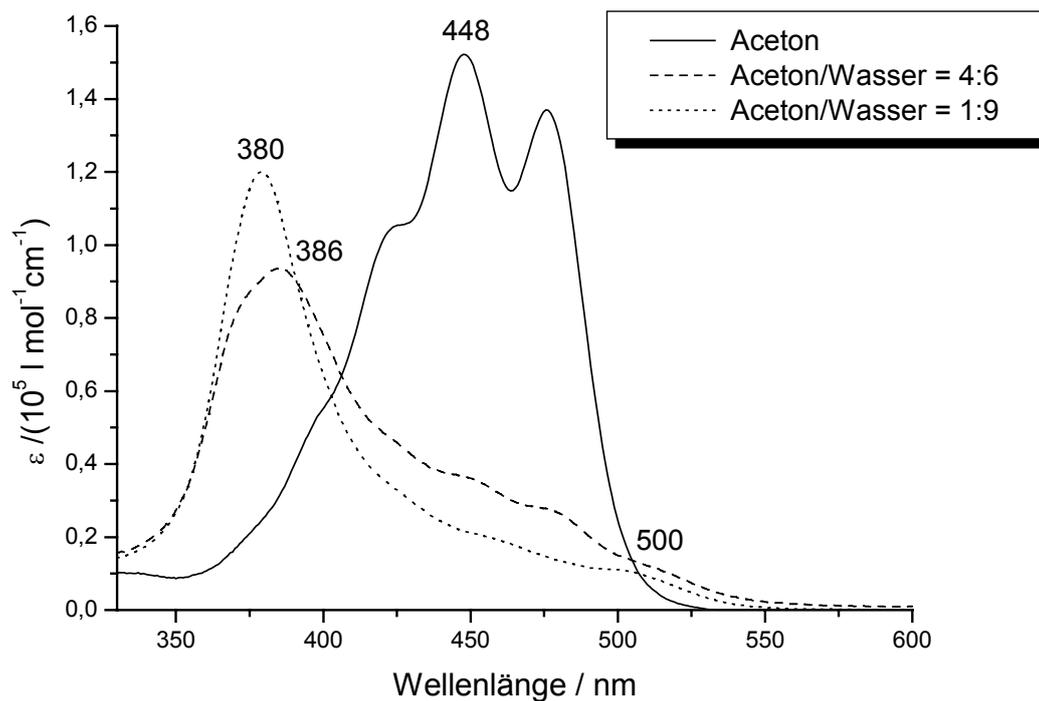


Abb. 59: UV/VIS-Spektren von Lutein **7** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

2.3.9. Zeaxanthindiacetat 17

Die Änderung der Ringsubstituenten durch die Einführung der sterisch anspruchsvolleren Acetylgruppen auf Kosten der Hydroxyfunktionen in Zeaxanthin 6 zeigt enorme Auswirkungen nicht nur auf das Aggregations-, sondern auch auf das Einlagerungsverhalten in Liposomen. Schon bei der kleinsten eingesetzten Carotinoidkonzentration wird nur annähernd die Hälfte des Zeaxanthindiacetats 17 in den Präparationen wieder-

gefunden. Man erhält Vesikelsuspensionen mit durchschnittlich 1.1 mol% Zeaxanthindiacetat 17 bezogen auf DPPC. Versucht man größere Mengen von 17 einzulagern, bleiben schon bei der Präparation gelbe Carotinoidreste an der Glaskolbenwand zurück und die nachfolgende Extrusion endet mit dem Zerreißen des Polycarbonatfilters. Hierbei blockieren große Carotinoidaggregate die Membranporen und verhindern das weitere

Durchtreten der Lipidsuspension. Die UV/VIS-Spektren der erhaltenen Proben (Abb. 60) lassen Aggregate des J-Typs erkennen. Der Verlust der Hydroxygruppen im Carotinoidmolekül geht wiederum mit dem Unvermögen einher, sich in einem kartenstapelähnlichen H-Aggregat zu formieren, da sich nun die sterisch anspruchsvolleren Endgruppen durch Scherung und Torsion der Polyketten eher aus dem Weg gehen. Die Aggregate zeigen sich dabei nahezu unbeeinflusst vom Fluiditätszustand der DPPC-Membran. Das Überschreiten von T_m ist mit einem starken Anstieg der Untergrundstreuung verbunden, so dass eine Veränderung im Vesikelsystem deutlich wird. Hierbei ist eine Agglomeration der Liposomen unter gleichzeitiger „Entmischung“ der Aggregate möglich, da auch die Carotinoidabsorption etwas abnimmt.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Zeax.diacetat}) \pm 3 \%$ / mmol l ⁻¹
	0.13
	$c_{\text{end}}(\text{Zeax.diacetat})$ / mmol l ⁻¹
1	0.061
2	0.070
3	0.056
4	0.058
5	0.066
Mittelwert ± SD	0.062 ± 0.008
<i>CV</i> / mol%	48 ± 8
<i>EV</i> / mol%	1.1 ± 0.3

Tab. 11: Zeaxanthindiacetatkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

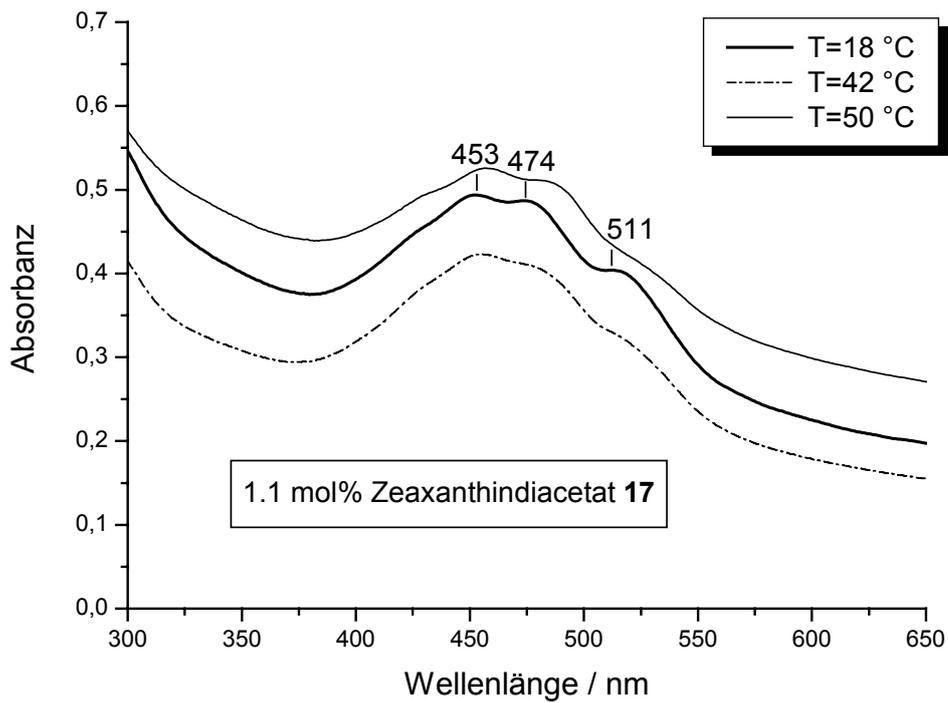


Abb. 60: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit 1.1 mol% Zeaxanthindiacetat 17

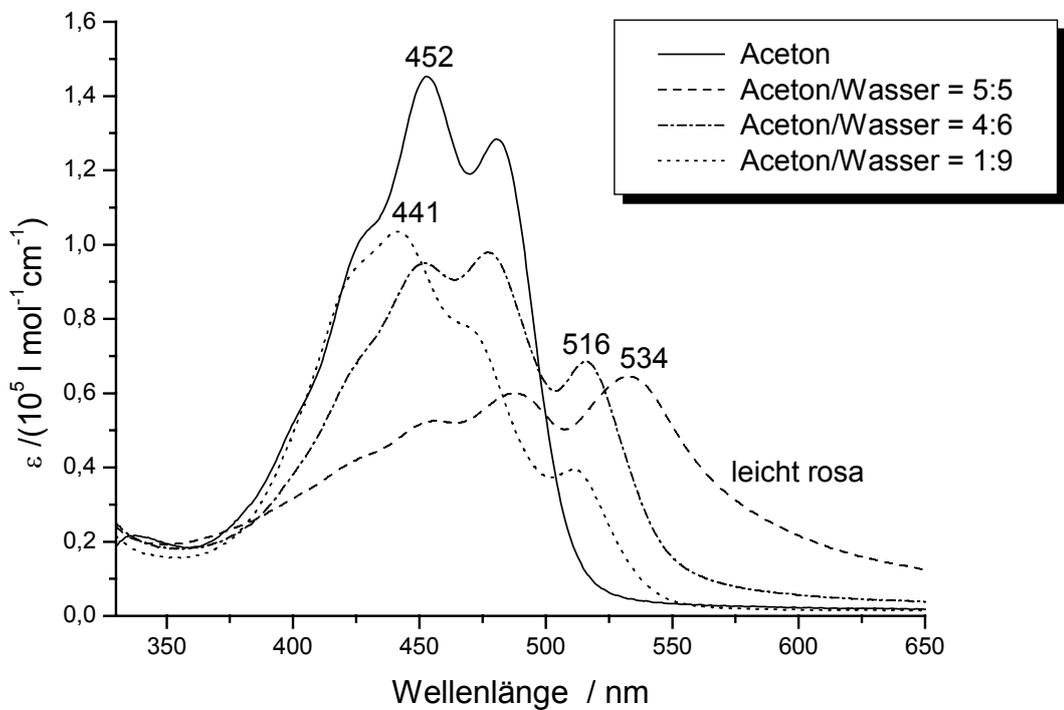


Abb. 61: UV/VIS-Spektren von Zeaxanthindiacetat 17 [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

Das hier untersuchte Zeaxanthindiacetat **17** besteht aus einem Gemisch des (3*R*,3'*R*)-, (3*S*,3'*S*)- und (3*R*,3'*S*)-Isomeren. Die Aggregation im Wässrigen lässt daher eine Vielfalt an Aggregatespezies erkennen (Abb. 61), die bei Untersuchungen der isomerenreinen (3*R*,3'*R*)-Form in Ethanol/Wasser^[63] bzw. (3*S*,3'*S*)-Form in Aceton/Wasser^[105] nicht auftreten. Bei letzteren ergeben sich lediglich UV/VIS-Spektren der Gestalt, wie sie sich hier bei einem Wassergehalt von 60 % zeigt. Gerade diese Bandenform und Lage findet sich in den Spektren der Aggregate von **17** wieder, die in den Liposomen gebildet werden. Im wässrigen System wandeln sich die Aggregategeometrien des Isomerengemisches **17** mit abnehmendem Acetongehalt vom J-Typ zum H-Typ. Die Hauptabsorptionsbanden der Aggregate liegen bei 534 bzw. 441 nm. Hierbei scheint der durch die Wassermoleküle ausgeübte hydrophobe Effekt eine zunehmende H-Aggregation zu forcieren, die die Gesamtoberfläche der Carotinoidmoleküle verkleinert und den sterischen Anspruch der Acetylreste überkompensiert. Die sterische Hinderung in den Aggregaten wird dabei wohl durch die unterschiedlichen Konfigurationen an C-3 und C-3' im Zeaxanthindiacetat **17** vermindert, was für die jeweils nur (*R*)- bzw. nur (*S*)-konfigurierten Verbindungen nicht gilt, die ihre Aggregatestruktur ab 60 % Wasseranteil beibehalten. Somit übt die Orientierung der Acetylgruppe einen erkennbaren Einfluss auf die Aggregation aus. Bei Anwesenheit von DPPC bleibt bei Einsatz des Isomerengemisches **17** die Bildung der weniger gescherten Aggregatespezies aus, was die Einbettung der Carotinoidaggregate in die Lipidvesikel beweist.

2.3.10. Luteindiacetat 18

Das Aggregationsverhalten von acetyliertem Lutein **18** sollte dem von Zeaxanthindiacetat **17** parallel gehen. Wie auch schon für **17** wurden auch für Luteindiacetat **18** bisher keine Untersuchungen in Modellliposomen durchgeführt. Die Acetylierung von Lutein **7** hat durch die Blockierung der Hydroxygruppen eine Abnahme des Einlagerungsvermögens in eine DPPC-Membran zur Folge. Im Vergleich zu Zeaxanthindiacetat **17** kann man bei der Vesikelpräparation zwar die fünffache Menge an Luteindiacetat **18** einsetzen, jedoch ist die Extrusion nur noch mit 300 µl Vesikelsuspension praktikabel, ohne dass sich der Polycarbonatfilter zusetzt. Bezeichnenderweise findet sich dann nur knapp die Hälfte des eingesetzten Luteindiacetats **18** in den extrudierten

Proben wieder. Immerhin kann das Carotinoid/Lipid-Verhältnis auf noch durchschnittlich 5.7 mol% gesteigert werden.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(\text{Luteindiacetat}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$		
	0.13	0.39	0.65
	$c_{\text{end}}(\text{Luteindiacetat}) / \text{mmol l}^{-1}$		
1	0.09	0.28	0.30
2	0.11	0.31	0.28
3	0.09	0.23	0.29
4	0.09	0.22	0.33
5	0.10	0.24	0.35
Mittelwert ± SD	0.10 ± 0.01	0.26 ± 0.04	0.31 ± 0.03
<i>CV</i> / mol%	77 ± 10	67 ± 12	48 ± 6
<i>EV</i> / mol%	1.8 ± 0.4	4.8 ± 1.2	5.7 ± 1.1

Tab. 12: Luteindiacetatkonzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

Die Flexibilität der einen Luteindiacetat-Endgruppe durch mögliche Rotation um die C6'-C7' Einfachbindung im Vergleich zum Zeaxanthinderivat **17** kann eine mögliche Erklärung für die stärkere Einbindung in eine DPPC-Membran sein, da verschiedene Carotinoidgeometrien unter Umständen unterschiedliche Lokalisationen in den Liposomen ermöglichen, wie dies auch schon bei den entsprechenden nicht acetylierten Xanthophyllen **6** und **7** beschrieben wurde. Andererseits könnten einfach kleinere Aggregate existent sein, die sich leichter in die Membran integrieren können. Dafür sprechen die gleich strukturierten UV/VIS-Spektren der präparierten Vesikelsuspensionen, egal bei welcher Carotinoidkonzentration oder Temperatur sie aufgenommen wurden (Abb. 62). Sie beschreiben J-Aggregate mit ihrem langwelligsten Absorptionsmaximum bei 507 nm. Maxima bei 471 und 446 nm schließen sich auf der kurzwelligen Seite an, gefolgt von einer Schulter bei 420 nm. Die von Luteindiacetat **18** in unterschiedlichen Medien gebildeten Aggregate liefern nahezu identische UV/VIS-Spektren von dieser Form. In wässrigem Aceton bilden sich die Aggregate ab etwa 50 % Wassergehalt (Abb. 63). Gleiches gilt für die Aggregation von **18** in wässrigem Ethanol^[61]. Sogar die UV/VIS-spektroskopische Untersuchung eines Luteindiacetat-Films auf einem Quarzträger liefert wieder das gleiche Spektrum^[60].

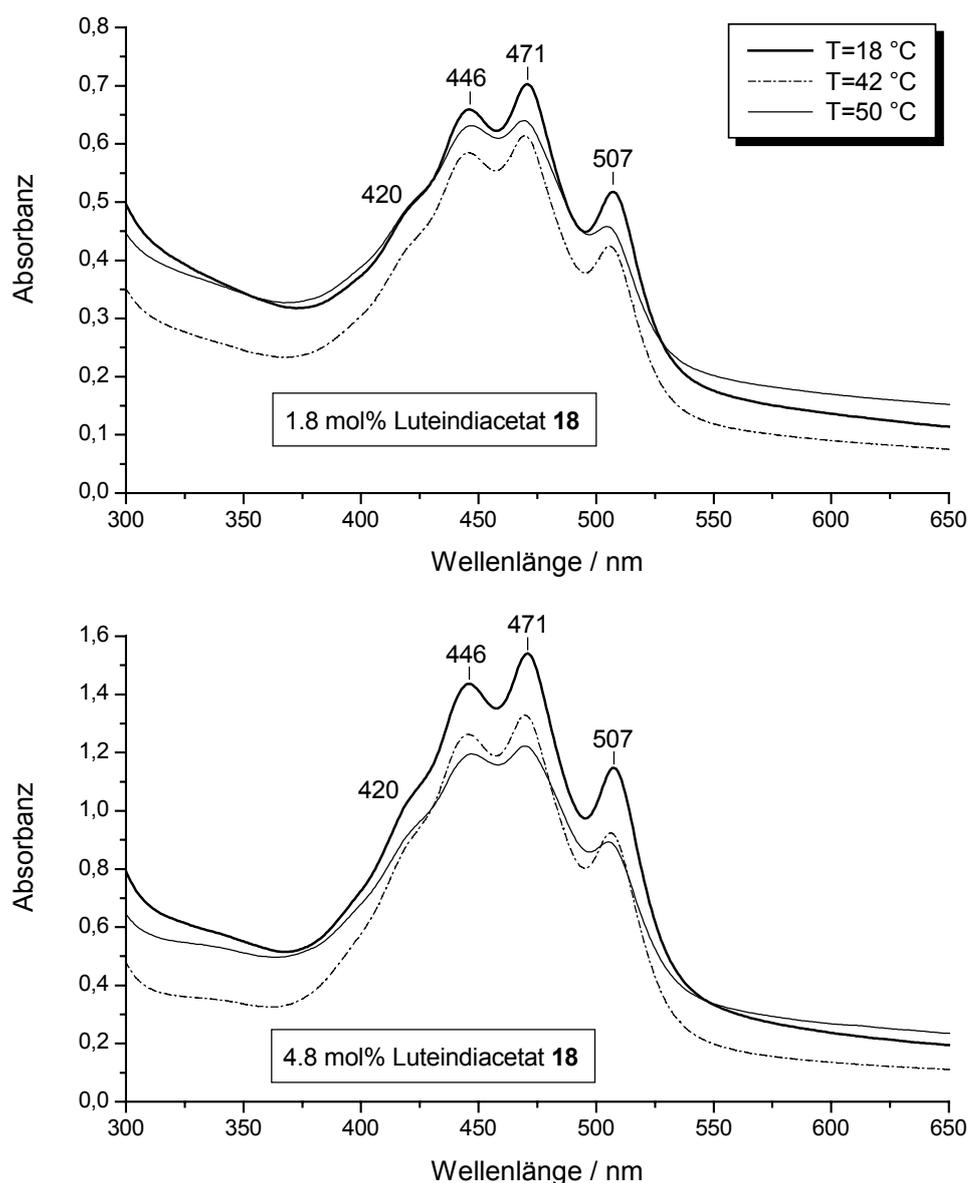


Abb. 62: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit verschiedenen Luteindiacetatmengen (1.8 bzw. 4.8 mol%)

Die zugehörigen kraftmikroskopischen Aufnahmen lassen die Bildung von faserartigen Strukturen erkennen, deren Morphologie charakteristisch für nematische Flüssigkristalle sind. Somit kann man sich die fadenförmigen Aggregate aus gegeneinander verdrehten nematischen Schichten aufgebaut vorstellen, innerhalb denen sich die Luteindiacetatmoleküle mit ihren Längsachsen parallel zueinander und hinsichtlich ihrer Polykettenebenen orthogonal zu den Schichten ausrichten^[60]. In den einzelnen Molekülschichten sind die Carotinoide wenig dicht gepackt und entlang ihrer Polyketten

relativ frei beweglich, so dass die Bandenstruktur des zugehörigen UV/VIS-Spektrums auf Schwingungsprogressionen des elektronischen Übergangs zurückzuführen ist. Die Anwesenheit solcher Strukturen kann auch in den hier präparierten Vesikelsuspensionen vermutet werden. Die aufgenommenen Spektren lassen sich von der Membranfluidität nicht beeinflussen, so dass ein direkt gerichtetes Einbinden der einzelnen Luteindiacetatmoleküle in die Lipiddoppelschicht ausgeschossen werden muss. Vielmehr scheinen die primär vorgebildeten Carotinoidaggregate in einer nicht näher verstandenen Art und Weise unabhängig in die Liposomen eingebunden. Dass die Aggregate sich nicht direkt im Wasser befinden, resultiert aus der Beobachtung, dass sich bei den UV/VIS-spektroskopisch vermessenen Proben nach etwa 12-stündiger Lagerung bei 4 °C die gelb gefärbten Phospholipide am Boden abgesetzt haben und eine klare farblose Pufferlösung zurückbleibt. Im Vergleich dazu bleibt in wässrigem Aceton bei Aggregation des Luteindiacetats **18** die Gelbfärbung der klaren Lösung mindestens 24 h erhalten.

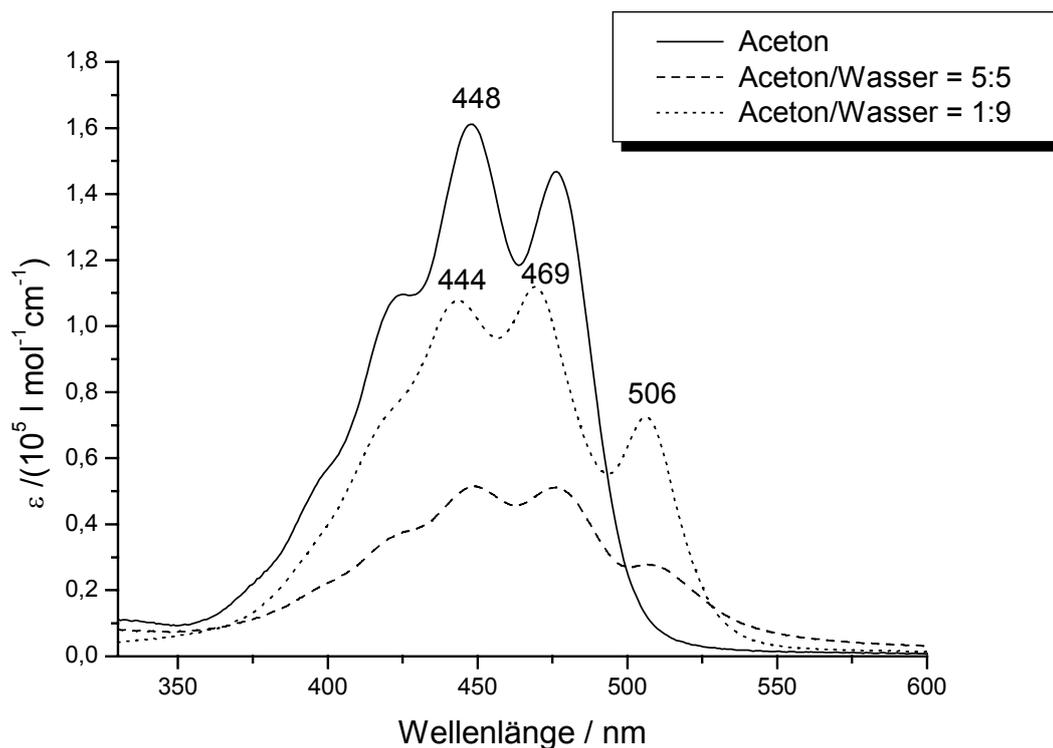


Abb. 63: UV/VIS-Spektren von Luteindiacetat **18** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

2.3.11. *m*-Hydroxyphenyl-Carotinoid 48

Als ein Vertreter der phenolischen Carotinoide wird ein Polyen mit einfachen Phenyl-Endgruppen und jeweils einer Hydroxygruppe in meta-Stellung zur Polyenkette in DPPC-Liposomen eingelagert. Mit steigender Carotinoidkonzentration wird ein immer größerer Prozentsatz davon in die Vesikel eingebettet, was für eine gute Integration des *m*-Hydroxyphenyl-Carotinoids **48** in die Lipiddoppelschicht spricht. Ausschlaggebendes Strukturmerkmal sind die vorhandenen Hydroxygruppen, die eine gerichtete Einlagerung der Carotinoidmoleküle in die DPPC-Membran ermöglichen. Dementsprechend lässt sich bei allen präparierten Liposomen mit 1 – 10 mol% *m*-Hydroxyphenyl-Carotinoid **48** bezogen auf DPPC deutlich unterhalb T_m bei 18 °C starke H-Aggregation beobachten (Abb. 64). Die scharfe H-Absorptionsbande bei etwa 410 nm ist fast 70 nm (3400 cm^{-1}) zum extinktionsstärksten 0→1 Schwingungsübergang des Monomerspektrums verschoben und beschreibt ein noch dichter gepacktes Aggregat als die durch Hydroxycarotinoide mit Cyclopentenyl- oder Cyclohexenyl-Endgruppen in der Membran gebildeten. Stets ist aber noch ein gewisser Monomeranteil anhand der Absorptionen an der bathochromen Schulter zu erkennen. Die langwelligste Absorption bei etwa 530 nm hingegen ist bei der höchsten Carotinoidkonzentration am besten zu erkennen und kann dem H-Aggregat zugeschrieben werden. Sie verweist dabei auf eine leicht verdrillte und gescherte Geometrie des Aggregats.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(m\text{-Hydroxyphenyl-Car}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$		
	0.13	0.39	0.65
	$c_{\text{end}}(m\text{-Hydroxyphenyl-Car}) / \text{mmol l}^{-1}$		
1	0.071	0.23	0.55
2	0.053	0.24	0.58
3	0.056	0.20	0.49
4	0.044	0.19	0.54
5	0.053	0.24	0.54
Mittelwert ± SD	0.055 ± 0.010	0.22 ± 0.02	0.54 ± 0.03
<i>CV</i> / mol%	42 ± 9	56 ± 7	83 ± 7
<i>EV</i> / mol%	1.0 ± 0.3	4.0 ± 0.8	9.9 ± 1.6

Tab. 13: *m*-Hydroxyphenyl-Car-Konzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

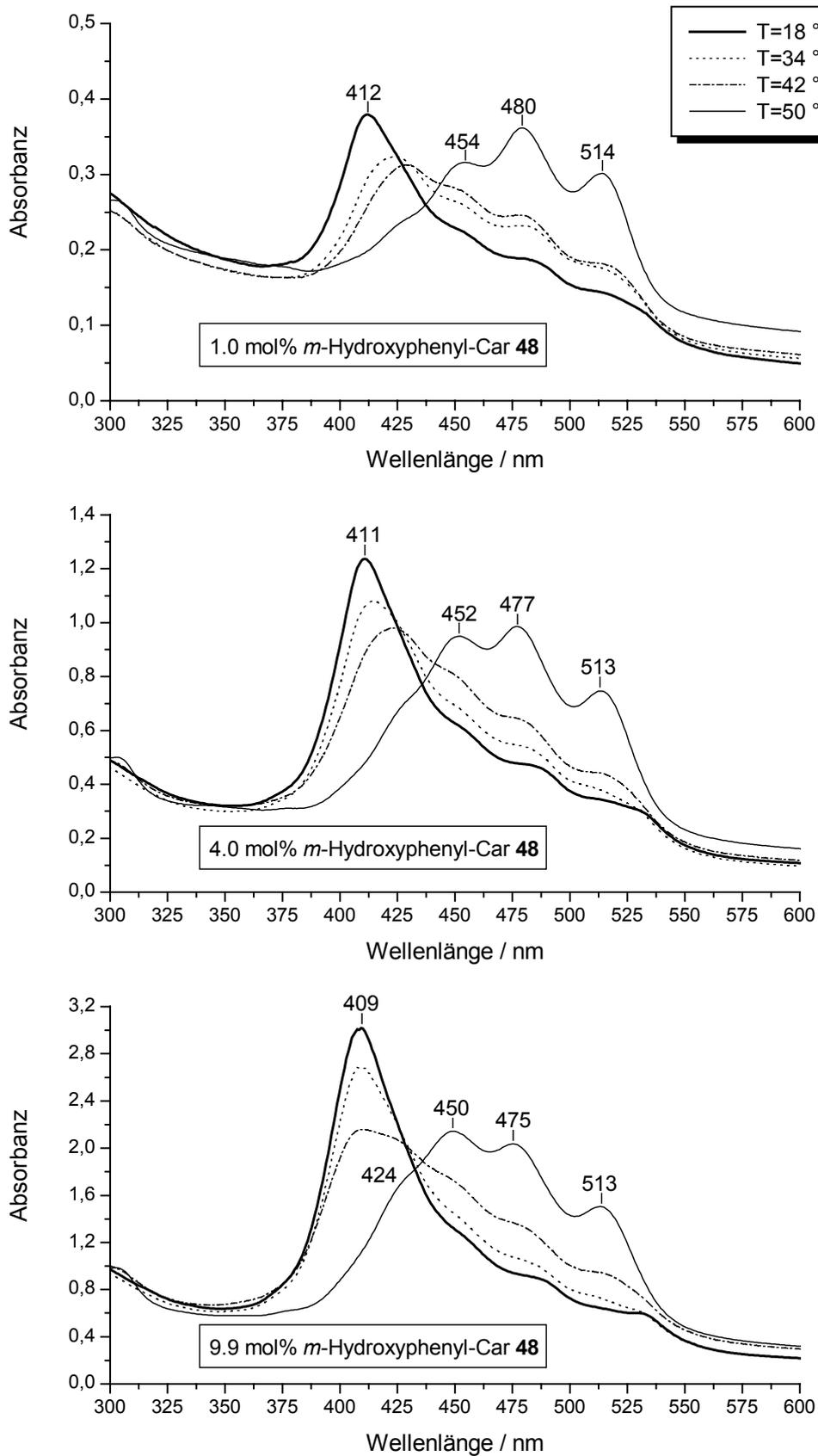


Abb. 64: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$) beladen mit verschiedenen *m*-Hydroxyphenyl-Car-Mengen (1.0, 4.0, bzw. 9.9 mol%)

Ab 34 °C ist dann unter Extinktionsverlust der Aggregatebande verstärkt Monomerisierung der Aggregateeinheiten zu verzeichnen. Dabei wird vor allem eine Absorptionsbande bei etwa 424 nm existent, die noch oberhalb T_m bei 50°C auftritt und mit steigendem Carotinoid/Lipid-Verhältnis stärker ins Gewicht fällt. Diese kann den kleinen Aggregateeinheiten, allen voran den Dimeren zugeordnet werden, von denen bei der höchsten Carotinoidkonzentration im flüssig-kristallinen Zustand der Membran ein höherer Anteil vorhanden ist als bei den kleineren Konzentrationen. Die Überlagerung dieser Absorptionsbande mit der Monomerenbande macht deren 0→2 Schwingungsübergang zur extinktionsstärksten Absorption. Bei 1.0 mol% *m*-Hydroxyphenyl-Carotinoid **48** liegt das Absorptionsmaximum des Monomers in der DPPC-Membran oberhalb T_m bei 480 nm und entspricht dem λ_{max} von **48** in Chloroform. In Ethanol oder Aceton zeigt **48** ein λ_{max} von 471 nm ebenso wie das entsprechende nicht hydroxylierte (all-*E*)-Polyen 16,17,18,16',17',18'-Hexanor- ϕ,ϕ -carotin^[126]. Hiermit wird im Monomer die Koplanarität der Polyenkette mit den Phenylresten bestätigt, da isorenieratenartige Carotinoide mit ihren Methylsubstituenten in den ortho Positionen zur Polyenkette wegen Verdrillung der Phenylringe um etwa 20 nm hypsochromer absorbieren^[149]. Ein geringes Herausdrehen der Endruppen von **48** aus der Monomerenlage bei einsetzender H-Aggregation^[105] kann dann einen Beitrag zur kurzwelligen Verschiebung der H-Aggregatebande liefern. Obwohl **48** an den C-Atomen 7/7' bis zu einem 25%igen Anteil (*Z*)-konfiguriert ist, zeigt dies noch keine markanten Auswirkungen auf die untersuchten optischen Eigenschaften im Vergleich zum (all-*E*)-Isomeren.

Im Wässrigen ergeben sich für **48** andere Aggregate als in der DPPC-Membran. In wässrigem Aceton lässt sich die Aggregation von **48** nicht gut verfolgen, da die dabei einzigen unterhalb 330 nm auftretenden Absorptionen durch die Eigenabsorption des Acetons verdeckt werden. Deshalb wurde die Aggregation von **48**, die bei jeweils 60 % Wasseranteil einsetzt, zusätzlich in Wasser/Ethanol-Gemischen untersucht (Abb. 65). Es tritt zunächst deutlich Aufhellung und ab einem Wassergehalt von 70 % dann Entfärbung der gelben Lösung ein, wobei eine extinktionsschwache H-Aggregatebande bei nur 326 nm erscheint. Dies spricht nach vollständigem Verlust der Monomere für die Ausbildung großer H-Aggregate, die nur noch schwer löslich sind und im bathochromen Bereich für einen leichten Streuanteil sorgen. Eine Bande um 410 nm wie bei der Aggregation von **48** in den DPPC-Liposomen lässt sich bei keinem untersuchten Ethanol/Wasser-Verhältnis nachweisen. Wird dem phenolischen

Carotinoid **48** also eine hinreichende Menge Wasser zugegeben, setzt die Bildung von H-Aggregaten ein, die sofort zu größeren Partikeln wachsen, um den Wasserkontakt zu minimieren. In einer DPPC-Doppelschicht hingegen wird der Aggregationsgrad von **48** über die Membranfluidität reversibel gesteuert. Nach Abkühlen unterhalb T_m werden allmählich in verschiedenen Membranregionen nach Einschränkung der Mobilität der Fettsäurereste die Dispersionskräfte zwischen den Carotinoidmolekülen wirksam und Aggregation setzt ein. Das Wachstum dieser Primäraggregate, deren Entstehungszentren über den gesamten Lipiddoppelschichtbereich der Liposomen verteilt sind, bleibt dabei aufgrund der räumlichen Eingrenzung stark eingeschränkt. Der maximale Aggregationsgrad kann dabei nicht sehr hoch liegen, da diese Spezies selbst bei einem Carotinoid/Lipid-Verhältnis von nur 1:100 schon existent sind.

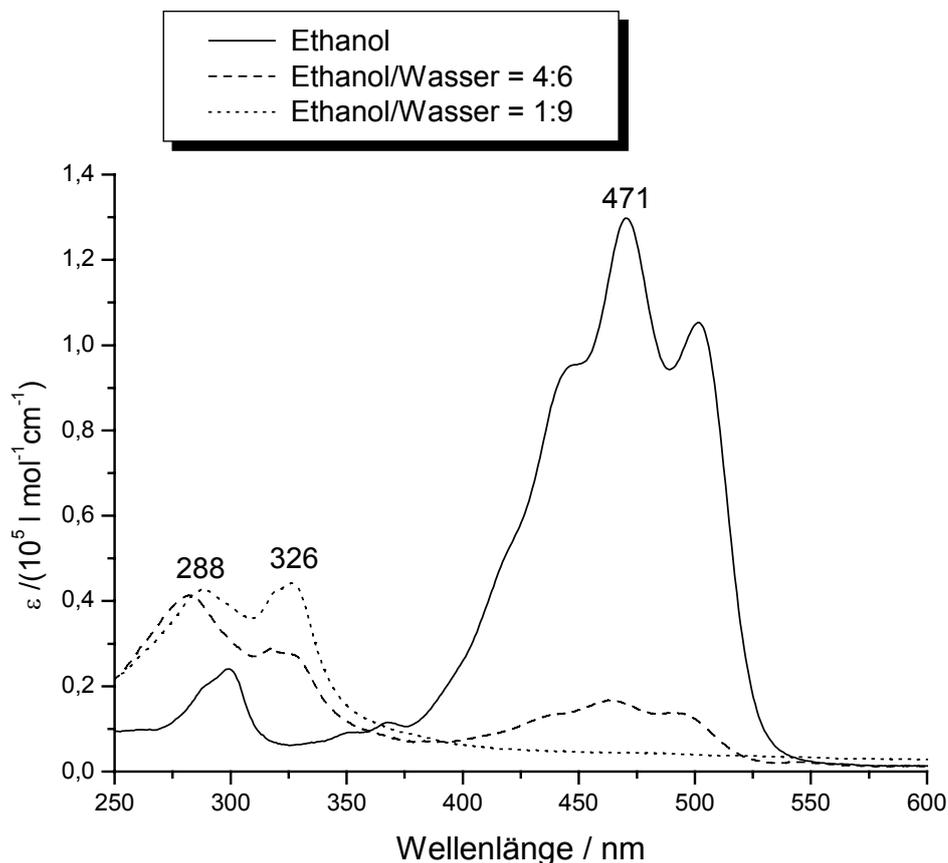


Abb. 65: UV/VIS-Spektren von *m*-Hydroxyphenyl-Car **48** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Ethanol/Wasser-Gemischen

2.3.12. *m*-Acetoxyphenyl-Carotinoid 49

Nach Acetylierung der Hydroxygruppen des phenolischen Carotinoids **48** wird dessen Einlagerungsvermögen in eine DPPC-Membran stark herabgesetzt. Die Ausbeuten der Carotinoideinlagerung liegen deutlich unter 50 %. Dabei lässt sich maximal ein durchschnittliches Carotinoid/Lipid-Verhältnis von 1:67 ($EV = 1.5 \text{ mol}\%$) erreichen (Tab. 14). Die Extrusion geht mit dem Ausschluss größerer Carotinoidaggregate einher, die den Polycarbonatfilter schnell zusetzen.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(m\text{-Acetoxyphenyl-Car}) \pm 3 \% / \text{mmol l}^{-1}$	
		0.13
	$c_{\text{end}}(m\text{-Acetoxyphenyl-Car}) / \text{mmol l}^{-1}$	
1	0.044	0.073
2	0.053	0.096
3	0.050	0.096
4	0.036	0.080
5	0.037	0.076
Mittelwert ± SD	0.044 ± 0.008	0.084 ± 0.011
$CV / \text{mol}\%$	34 ± 7	22 ± 4
$EV / \text{mol}\%$	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.4

Tab. 14: *m*-Acetoxyphenyl-Car-Konzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (CV) und Einlagerungsverhältnis (EV)

Für die Darstellung der UV/VIS-Spektren (Abb. 66) wird eine Eliminierung des Streuanteils vorgenommen (vgl. Kap. 2.3.6.), der sich bei kleinen Pigmentkonzentrationen besonders störend auswirkt und den eigentlichen Absorptionsanteil nur schlecht erkennen lässt. Zur Untergrundkorrektur werden die, mit unbeladenen Liposomen aufgenommenen und bei 600 nm angeglichenen, reinen Streuspektren abgezogen, so dass negative Extinktionswerte auftreten können, die aus der unterschiedlichen Größenverteilung der Vesikel in den Proben resultieren. Deutlich tritt die bei 18 °C auftretende H-Aggregatebande um 380 nm in Erscheinung, die noch von der extinktionsschwächeren Monomerenbande auf der langwelligen Seite begleitet wird. Im Gegensatz zu den untersuchten acetylierten Hydroxycarotinoiden mit alicyclischen Fünf- oder Sechsringen lässt sich keine Bildung von J-Aggregaten nachweisen.

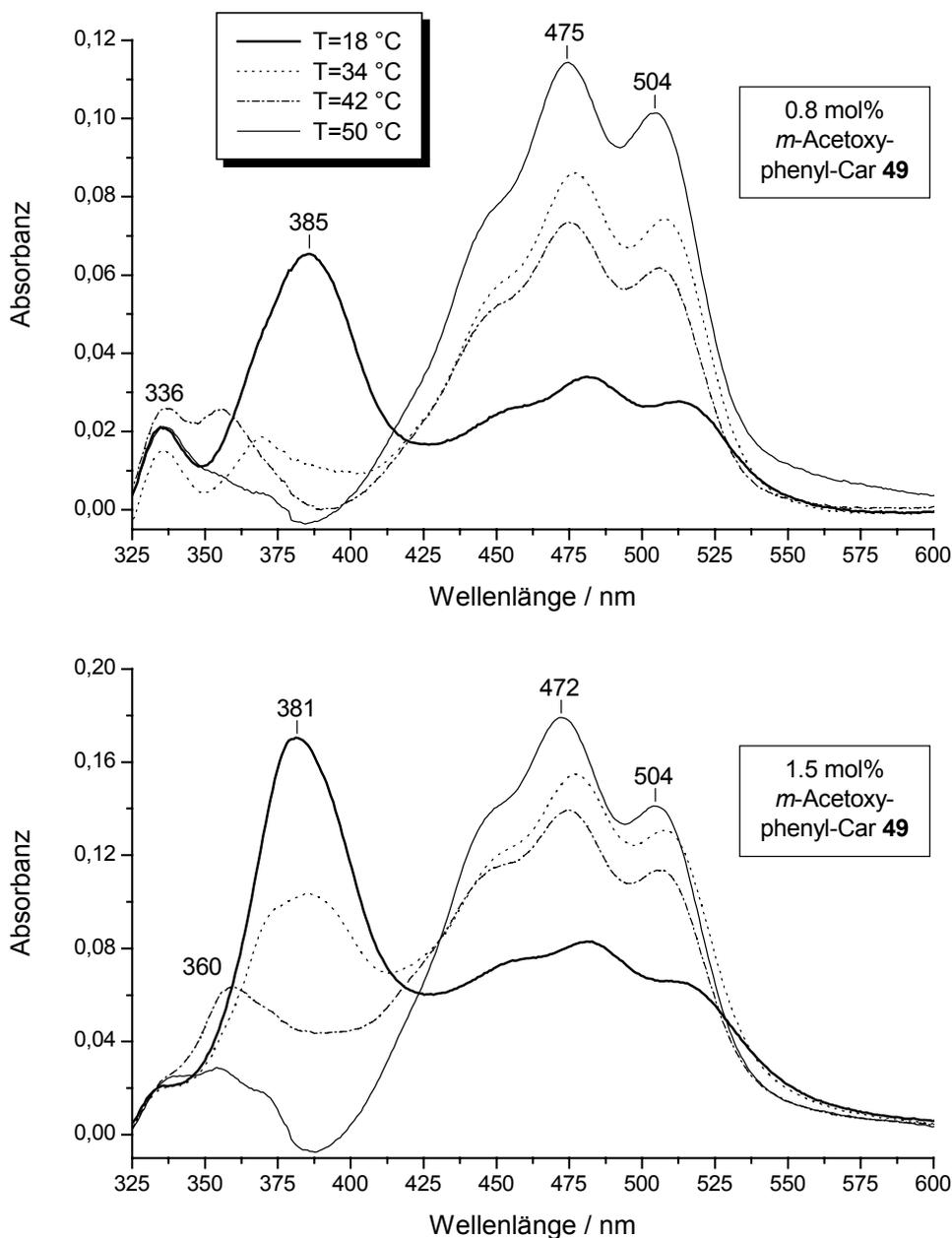


Abb. 66: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit verschiedenen *m*-Acetoxyphenyl-Car-Mengen (0.8 bzw. 1.5 mol%) nach vorgenommener Untergrundkorrektur

Demnach üben die aromatischen Endgruppen in **49** bei der Aggregation eine stark strukturierende Funktion aus, indem sie eine sandwichartige Stapelung favorisieren. Die Raumerfüllung vorhandener Substituenten an den Phenylringen nimmt dabei keinen gravierenden Einfluss auf die Aggregation, so dass bei **49** trotz Acetoxysubstituenten eine kartenstapelähnliche Anordnung im Aggregat begünstigt ist. Ab 34 °C beginnen die Aggregate zu dissoziieren, und zwar vornehmlich in Monomere, so dass die

Monomerenbande nun das Absorptionsmaximum liefert. Bei 0.8 mol% *m*-Acetoxyphenyl-Carotinoid **49** verschwindet die Aggregatebande hier schon fast vollständig. Oberhalb T_m bei 50 °C erreicht die Absorbanz für beide Pigmentkonzentrationen bei 472 bzw. 475 nm schließlich ihren Maximalwert. Noch vorhandene minimale Absorptionen zwischen 325 und 375 nm können Aggregaten zugeordnet werden, die sich nicht im hydrophoben Inneren der Membran befinden sondern außerhalb. Nach Abkühlen auf RT bildet sich die scharfe H-Bande wieder zurück. Im wässrigen Aceton setzt Aggregation bei 50 % Wasseranteil ein. Unter gleichzeitigem Extinktionsverlust der Monomerenbande und damit Farbaufhellung der Lösung nimmt die Absorbanz unter 380 nm zu. Eine weitere Steigerung des Wassergehalts lässt eine H-Bande bei 342 nm entstehen (Abb. 67).

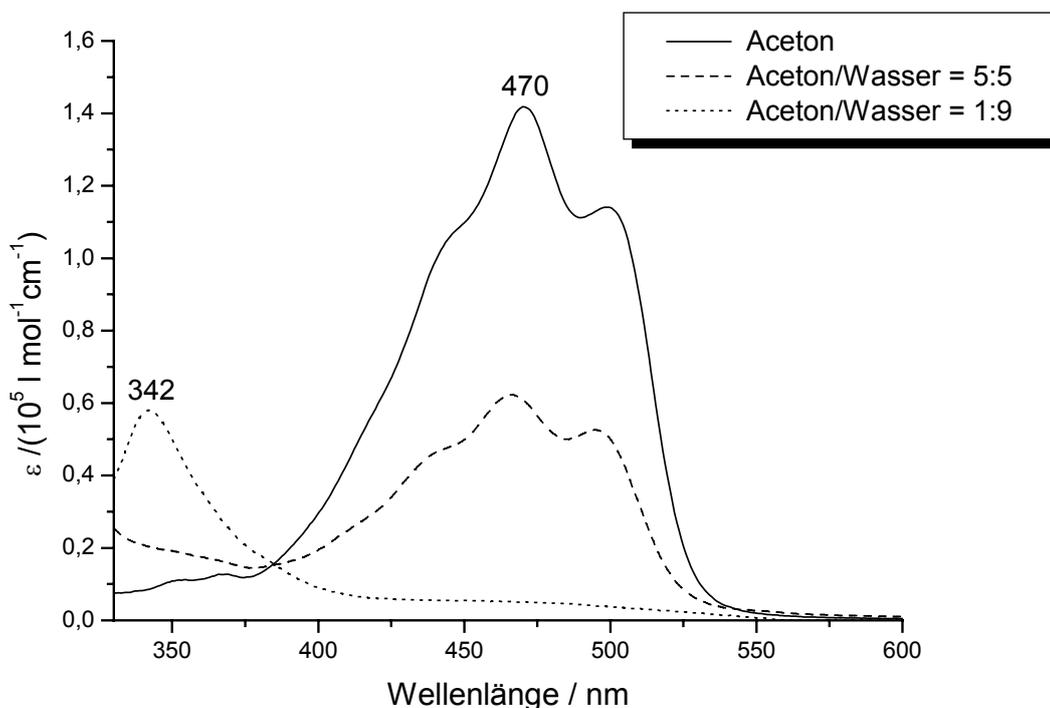


Abb. 67: UV/VIS-Spektren von *m*-Acetoxyphenyl-Car **49** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

Die aromatischen Ringe in **49** erwirken auch hier bei eintretender Aggregation eine nicht gegeneinander versetzte Stapelung der Moleküle. Wie man sieht, ist für die Aggregategeometrie die Einführung eines Hydroxy- oder Acetoxysubstituenten an den Phenylingen von nur untergeordneter Bedeutung und kann über die Änderung der Polarität lediglich Einfluss auf die Aggregatstabilität ausüben^[105]. Im wässrigen Milieu

wird das Wachstum der geordneten Aggregate unterstützt, da dadurch die ungünstige Solvataion der Carotinoidmoleküle zurückgedrängt wird. In der Membran absorbiert das H-Aggregat 40 nm (3100 cm^{-1}) bathochromer, was auf ein womöglich weniger dicht gepacktes Aggregat mit niedrigem Assoziationsgrad schliessen lässt. Dessen schon deutlich unterhalb T_m beginnende Auflösung zeigt zudem seine Empfindlichkeit gegenüber Konformationsänderungen der Lipidmoleküle.

2.3.13. *p*-Methoxyphenyl- und *p*-Benzoyloxyphenyl-Carotinoid 35 und 40

Als Variation werden zwei aromatische Carotinoide mit Methoxy- bzw. Benzoyloxy-substituenten in para-Position zur Polyenkette auf ihr Aggregationsverhalten hin untersucht. Dabei sind die endständigen Doppelbindungen der Polyenkette nach Präparation jeweils zu über 70 % (*Z*)-konfiguriert. Unter gleichzeitigem Verlust von Schwingungsfeinstruktur absorbieren diese Isomere bis zu 15 nm hypsochromer als ihre entsprechenden hoch planaren (all-*E*)-Formen, deren Verwendung aufgrund ihrer Unlöslichkeit nicht möglich ist.

DPPC-Probe \bar{c} (DPPC) = 5.44 ± 0.56 mmol/l	$c_{\text{ein}}(p\text{-Methoxyphenyl-Car})$ ± 3 % / mmol l ⁻¹		$c_{\text{ein}}(p\text{-Benzoyloxyphenyl-Car})$ ± 3 % / mmol l ⁻¹
	0.13	0.39	0.13
	$c_{\text{end}}(p\text{-Methoxyphenyl-Car})$ / mmol l ⁻¹		$c_{\text{end}}(p\text{-Benzoyloxyphenyl-Car})$ / mmol l ⁻¹
1	0.038	0.14	0.033
2	0.042	0.12	0.031
3	0.043	0.11	0.027
4	0.036	0.11	0.033
5	0.045	0.13	0.030
Mittelwert ± SD	0.045 ± 0.004	0.12 ± 0.01	0.031 ± 0.002
<i>CV</i> / mol%	32 ± 4	31 ± 4	24 ± 2
<i>EV</i> / mol%	0.8 ± 0.2	2.2 ± 0.4	0.6 ± 0.1

Tab. 15: *p*-Methoxyphenyl-Car- und *p*-Benzoyloxyphenyl-Car-Konzentrationen in präparierten DPPC-Vesikeln zuzüglich gemitteltem Carotinoid- (*CV*) und Einlagerungsverhältnis (*EV*)

Aufgrund ihrer sterischen Wechselwirkung mit der Methylgruppe an C-9 bzw. C-9' werden beim *p*-Methoxyphenyl-Carotinoid **35** und *p*-Benzoyloxyphenyl-Carotinoid **40** die Phenylringe aus der Ebene der Polyenkette herausgedreht und liefern somit nur einen geringen Beitrag zur Delokalisation der π -Elektronen.

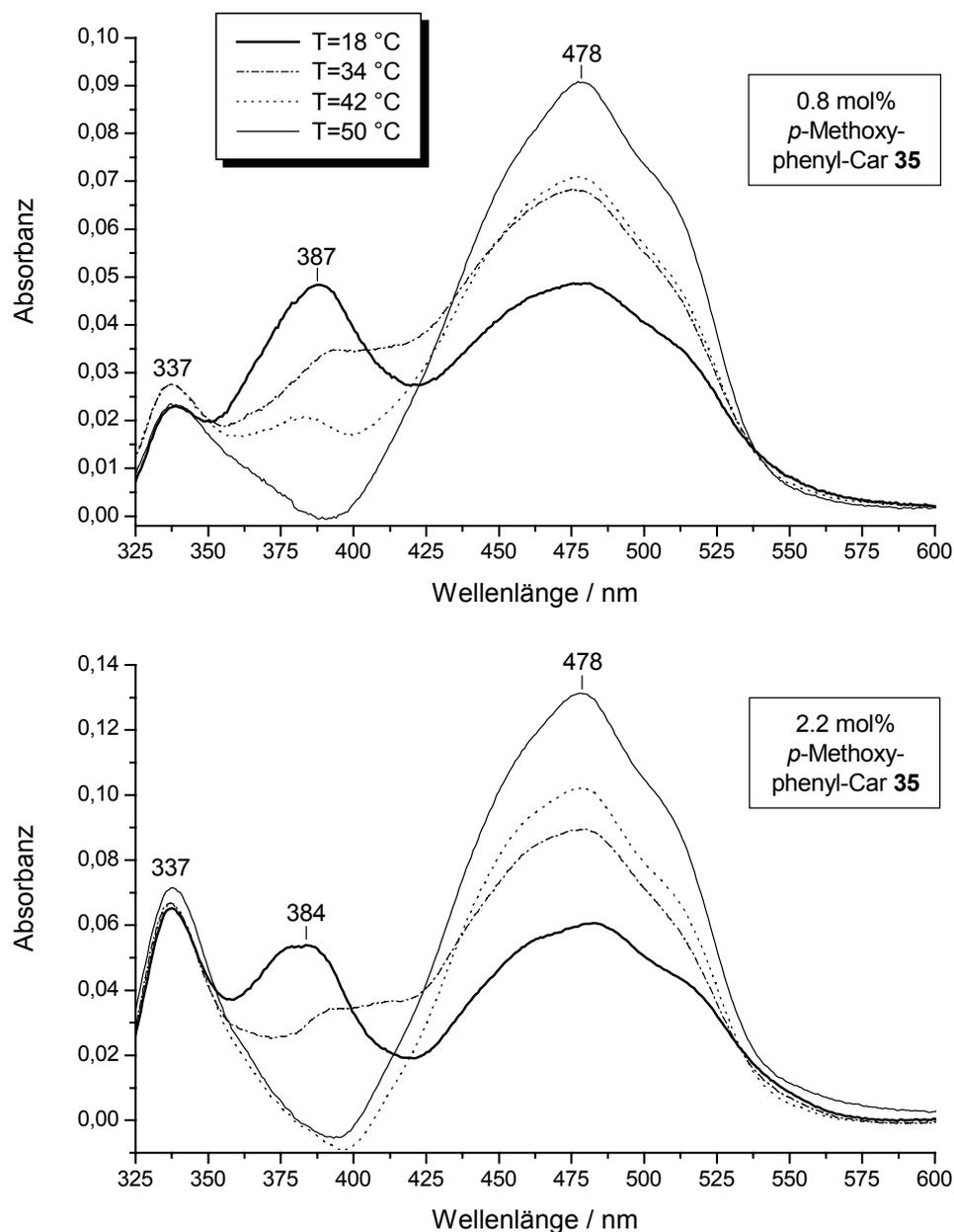


Abb. 68: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4$ °C) beladen mit verschiedenen *p*-Methoxyphenyl-Car-Mengen (0.8 bzw. 2.2 mol%) nach vorgenommener Untergrundkorrektur

Der Einlagerung von **35** und **40** in eine DPPC-Doppelschicht ist schnell eine Grenze gesetzt. Bei **40** wirkt sich die Einführung des großen Benzoyloxysubstituenten mit

seinem voluminösen und hydrophilen Phenylring besonders störend aus, so dass das Carotinoid/Lipid-Verhältnis in den erhaltenen Präparationen deutlich unterhalb 1:100 ($EV < 1 \text{ mol}\%$) liegt. Höhere Carotinoidmengen als die hier beschriebenen (Tab. 15) lassen sich bei der angewandten Präparationsmethode nicht einsetzen, da die Extrusion schnell durch irreversibel gebildete Carotinoidaggregate behindert wird. Zur Übersichtlichkeit werden auch hier die UV/VIS-Spektren zur Entfernung des Streuanteils einer Untergrundkorrektur unterzogen (vgl. Kap. 2.3.11.). Im Fall von **35** absorbiert die bei 18 °C reversibel in der Membran gebildete H-Aggregatespezies im Bereich 384 – 388 nm und geht ab 34 °C bis zur vollständigen Auflösung ab 42 °C in Monomere über (Abb. 68). Die Erhöhung der Pigmentkonzentration von 0.8 auf 2.2 mol% liefert jedoch keinen Beitrag zu diesem Aggregat, sondern die Absorption einer weiteren bei 337 nm absorbierenden Aggregatespezies gewinnt an Intensität, die auch oberhalb T_m unverändert erhalten bleibt. Diese H-Aggregatebande tritt auch nach eingesetzter Aggregation von **35** in einer wässrigen Acetonlösung mit 90 % Wasseranteil auf (Abb. 70). Dies spricht dafür, dass in den erhaltenen DPPC-Proben zum Teil größere regelmäßig gestapelte Aggregate vorhanden sind, die sich nicht im Inneren der Lipiddoppelschicht, sondern vielmehr in einer wässrigen Umgebung befinden.

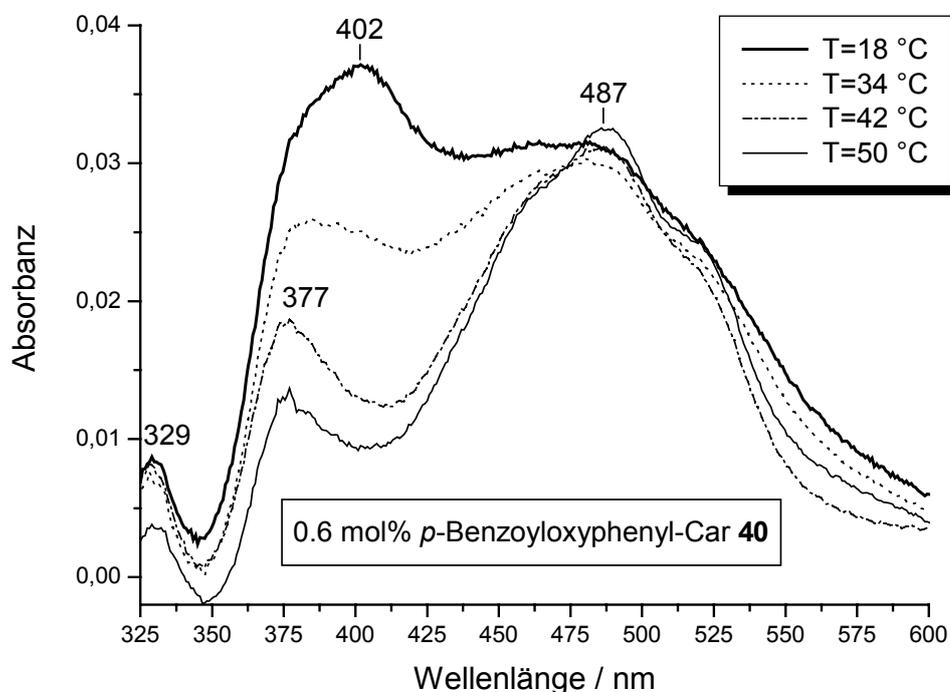


Abb. 69: Temperaturabhängige UV/VIS-Spektren unilamellarer DPPC-Vesikel ($T_m = 41.4 \text{ °C}$) beladen mit 0.6 mol% *p*-Benzoyloxyphenyl-Car **40** nach vorgenommener Untergrundkorrektur

Man erreicht also schnell eine Sättigungsgrenze des Carotinoids **35** in der DPPC-Membran. Diese Grenze wird beim Übergang zu **40** mit sperrigen Benzoyloxy-substituenten noch herabgesetzt. Die Absorption um 402 nm wird einem H-Aggregat in der Lipiddoppelschicht zugeschrieben, während die Absorptionsmaxima bei 377 und 329 nm den irreversibel im Wässrigen gebildeten Assoziaten zugeschrieben werden können (Abb. 69). Die letzteren erscheinen auch in dem UV/VIS-Spektrum von **40** in einem Aceton/Wasser-Gemisch mit 90 % Wasseranteil, wobei die kurzwelligere Bande eben noch im Ansatz zu erkennen ist (Abb. 70).

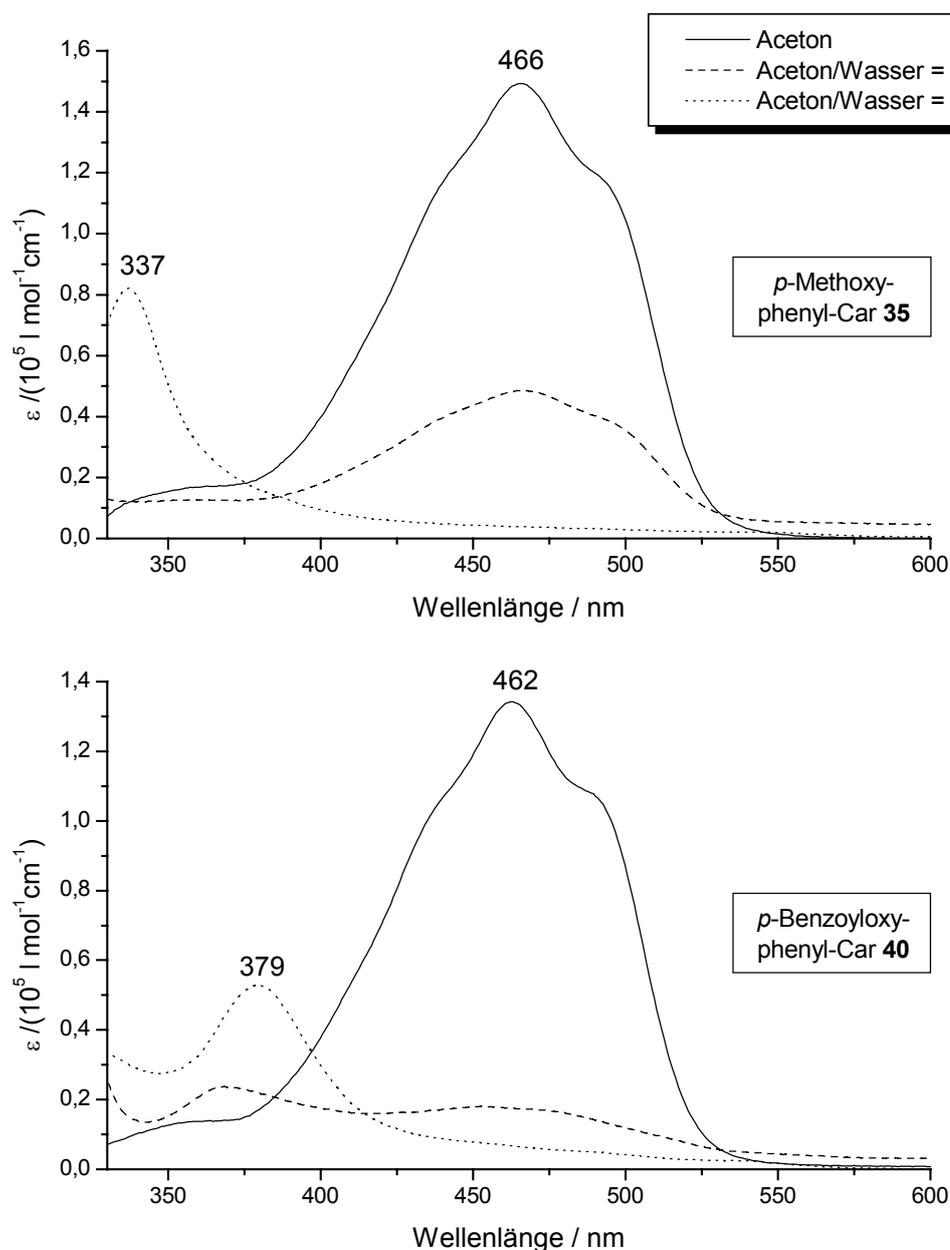


Abb. 70: UV/VIS-Spektren von *p*-Methoxyphenyl-Car **35** (oben) und *p*-Benzoyloxyphenyl-Car **40** (unten) [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

Selbst bei einem raumerfüllenden Substituenten an den aromatischen Endgruppen wie bei **40** ermöglichen die Phenylringe die Stapelung der Carotinoidmoleküle im Sinne eines idealen H-Aggregats, wobei hier eine koplanare Anordnung der Benzoylreste eine zusätzliche stabilisierende Funktion ausübt. Demzufolge treten in den UV/VIS-Spektren auch keine zur Monomerenbande bathochrom verschobene Absorptionen auf. Die primären Attraktionskräfte bleiben weiterhin die Dispersionskräfte der Polyketten untereinander, da ansonsten auch die Bildung von Kopf-Schwanz-verknüpften J-Aggregaten zu erwarten wäre, bei denen zwei sandwichartig gestapelte Benzolringe die Verknüpfung darstellen. Generell zeigen die beiden wenig polaren aromatischen Carotinoide **35** und **40** nur eine schwache Tendenz, sich in die DPPC-Membran zu integrieren. Letzteres mit seinen äußeren Benzoyl estergruppen zeigt sich der Einlagerung besonders abgeneigt, da seine Moleküllänge die Lipiddoppelschichtdicke zudem deutlich übertrifft. Trotz des geringen Carotinoid/Lipid Verhältnisses von unter 1 mol% lässt sich aber unterhalb T_m stets Aggregation eines gewissen Carotinoidanteils feststellen, die über eine Dimerenbildung nicht sehr weit hinausgehen kann. Die spektroskopische Abgrenzung von den in Wasser gebildeten und nicht auf Temperaturänderung reagierenden Aggregaten ist hier offensichtlich.

2.4. CD-Spektroskopie

Bei chiralen Molekülen finden chiroptische Methoden enormen Anklang zur Strukturaufklärung. Optisch aktive Stoffe drehen die Ebene von linear polarisiertem Licht, welches man sich zum Verständnis zerlegt denkt in eine rechts- und linkszirkular polarisierte Welle gleicher Amplitude und Phase. Diese beiden Wellen mit entgegengesetztem Drehsinn durchlaufen ein optisch aktives Medium mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ($\bar{c}_L \neq \bar{c}_R$), d. h. ihre Brechungsindizes sind verschieden ($n_L \neq n_R$). Die resultierende Phasendifferenz der beiden Lichtstrahlen führt zur Drehung des elektrischen Vektors \vec{E} des bei der Überlagerung der zirkular polarisierten Wellen wieder entstehenden linear polarisierten Lichtes und damit zur Drehung der Schwingungsebene um den Winkel α (Abb. 71 A).

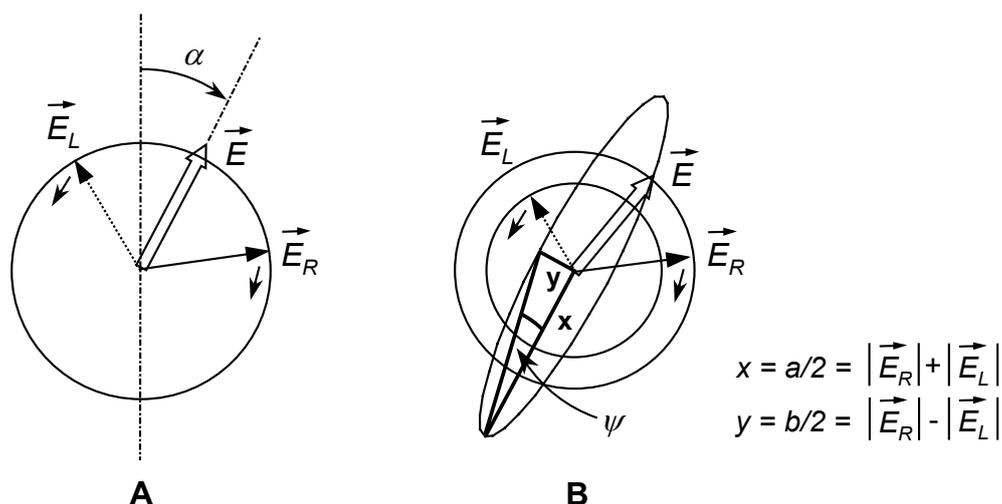


Abb. 71: A Entstehung von optischer Rotation durch Überlagerung von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht gleicher Frequenz und Intensität, aber unterschiedlichen Geschwindigkeiten: $\bar{c}_L < \bar{c}_R \Rightarrow$ Drehwinkel $\alpha > 0$

B Entstehung von elliptisch polarisiertem Licht nach zusätzlicher unterschiedlicher Schwächung der beiden entgegengesetzt polarisierten Teilwellen: $|\vec{E}_L| < |\vec{E}_R|, \varepsilon_L > \varepsilon_R \Rightarrow$ Elliptizität $\psi > 0$, positiver CD

Die Wellenlängenabhängigkeit von α bzw. $\Delta n = n_L - n_R$ bezeichnet man als optische Rotationsdispersion (ORD), wobei der Betrag der hier beschriebenen normalen ORD zu längeren Wellenlängen hin monoton fällt. Im Bereich von Absorptionsbanden wird der normalen ORD-Kurve ein S-förmiger Anteil zur anomalen ORD-Kurve überlagert (Abb. 72)^[150]. Gleichzeitig werden beim Durchgang durch die optisch aktive Probe die

beiden zirkularen Teilwellen verschieden stark absorbiert ($\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$). Da sie nun nach dem Austritt aus der Probe nicht mehr die gleichen Amplituden besitzen ($|\vec{E}_L| \neq |\vec{E}_R|$), ist das ursprünglich linear polarisierte Licht jetzt elliptisch polarisiert (Abb 71 B). Dabei ist der Circular-dichroismus (CD) als Differenz der molaren dekadischen Extinktions-

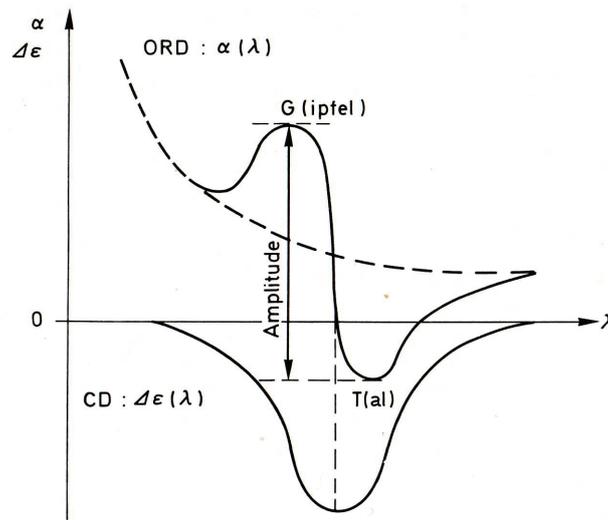


Abb. 72: Cotton-Effekt (hier negativ, d. h. $\lambda_{\text{Gipfel}} < \lambda_{\text{Tal}}$, $\text{CD} < 0$) – Zusammenhang zwischen anomaler ORD- und CD-Kurve; die normale ORD (gestrichelte Kurve) ist hier positiv

koeffizienten $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ definiert. Mit CD-Spektrometern lässt sich die differentielle Absorbanz $\Delta A = A_L - A_R$ bestimmen, woraus man über das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz den CD erhält^[151]:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot d} \quad \text{Gl. 3}$$

c = Konzentration in [mol/l]
 d = Schichtdicke in [cm]

Häufig wird auch die Elliptizität ψ angegeben, die die durch das elliptisch polarisierte Licht beschriebene Ellipse mit $\psi = \arctan(b/a)$ mathematisch eindeutig beschreibt, mit a und b als Haupt- bzw. Nebenachse der Ellipse (Abb. 71 B). Als entsprechende von Konzentration und Schichtdicke unabhängige Größe wird die spezifische Elliptizität $[\psi]$, oder auf die molare Masse M bezogen, die molare Elliptizität $[\Theta]$ definiert^[150]:

$$[\psi] = \frac{\psi}{c_g \cdot d} \quad \text{Gl. 4}$$

$$[\Theta] = \frac{[\psi] \cdot M}{100} = \frac{\psi \cdot M}{100 \cdot c_g \cdot d} \quad \text{Gl. 5}$$

c_g = Konzentration in [g/ml]
 d = Schichtdicke in [dm]
 M = molare Masse in [g/mol]

Die molare Elliptizität [Θ] liefert den direkten proportionalen Zusammenhang zu $\Delta\varepsilon$:

$[\Theta] = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$	Gl. 6
-------------------------------------------	--------------

Anomale ORD, CD und Elliptizität innerhalb einer Absorptionsbande bezeichnet man auch gemeinsam als Cotton-Effekt (Abb. 72)^[150].

Voraussetzung für das Vorliegen des elektronischen Circular dichroismus ist die Existenz eines elektronischen Übergangs, der sowohl elektrische als auch magnetische Anteile besitzt. Bei Lichtabsorption muss außer einem elektrischen Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}$, das die Translation von Elektronenladung beschreibt, ein magnetisches Übergangsdipolmoment \vec{m} vorhanden sein, was durch Ladungsrotation mit daraus resultierendem Kreisstrom erzeugt wird. Die zirkulare Komponente tritt z. B. typischerweise bei $n \rightarrow \pi^*$ -Übergängen auf, bei denen das Startorbital formal durch eine 90°-Drehung ins Zielorbital überführt wird. Bildlich gesprochen muss das Elektron auf einem helicalen Weg angeregt werden, da ja Translation und Rotation gemeinsam eine Schraubenbewegung darstellen. Ein quantitatives Maß für den CD innerhalb einer Absorptionsbande ist die Rotationsstärke R , die nach der Theorie gegeben ist durch das Skalarprodukt von elektrischem und magnetischem Übergangsdipolmoment:

$R = \vec{\mu} \cdot \vec{m} = \vec{\mu} \cdot \vec{m} \cdot \cos(\vec{\mu}, \vec{m})$	Gl. 7
--------------------------------------------------------------------------------------------	--------------

Das Vorzeichen des CD wird demzufolge nur durch den von den beiden Übergangsdipolmomenten eingeschlossenen Winkel $\sphericalangle(\vec{\mu}, \vec{m})$, also durch deren relative Orientierung zueinander, bestimmt. Steht ein Moment senkrecht zum anderen, wird wegen $\cos 90^\circ = 0$ der CD Null, obwohl beide Momente vorhanden sind. Größe und Vorzeichen des CD reagieren sehr empfindlich auf die molekulare Umgebung eines Chromophors, weshalb die Messung des CD ein probates Hilfsmittel zur Festlegung der absoluten Konformation chiraler Moleküle darstellt^[152].

2.4.1. Exciton-gekoppelter Circular dichroismus

Der Cotton-Effekt kann in Lösung nur durch Moleküle ausgelöst werden, denen eine Drehspiegelachse ($S_1 = \sigma$, $S_2 = i$) fehlt (notwendige und hinreichende Bedingung für Chiralität). Ein Spezialfall tritt auf, wenn zwei oder mehr sich in räumlicher Nähe befindliche Chromophore mit identischer oder ähnlicher Anregungsenergie chiral zueinander angeordnet sind. Ist eine ihrer Anregungen mit einem starken elektrischen Übergangsdipolmoment verbunden, kann sich der Anregungszustand über alle Chromophore des Systems delocalisieren und wird zum Exciton. Durch Kopplung der Excitonen kommt es im entsprechenden Absorptionsbereich zum Auftreten eines CD-Couplets, d. h. zur Entstehung von zwei nebeneinanderliegenden intensiven CD-Banden entgegengesetzten Vorzeichens und vergleichbarer Intensität bzw. Bandenfläche („bisignate CD-Kurve“)^[151]. Die theoretische Analyse des Phänomens der Excitonenkopplung basiert auf der Kuhnschen Theorie der gekoppelten Oszillatoren^[151] und findet u. a. seine Anwendung in der „Exciton-Chirality Methode“ der Dibenzoate von Glykolen nach *Nakanishi et al.*^[153]. Die chirale Wechselwirkung von zwei identischen Chromophoren, die einen positiven Dihedralwinkel Θ einschließen, ist in Abb. 73 veranschaulicht.

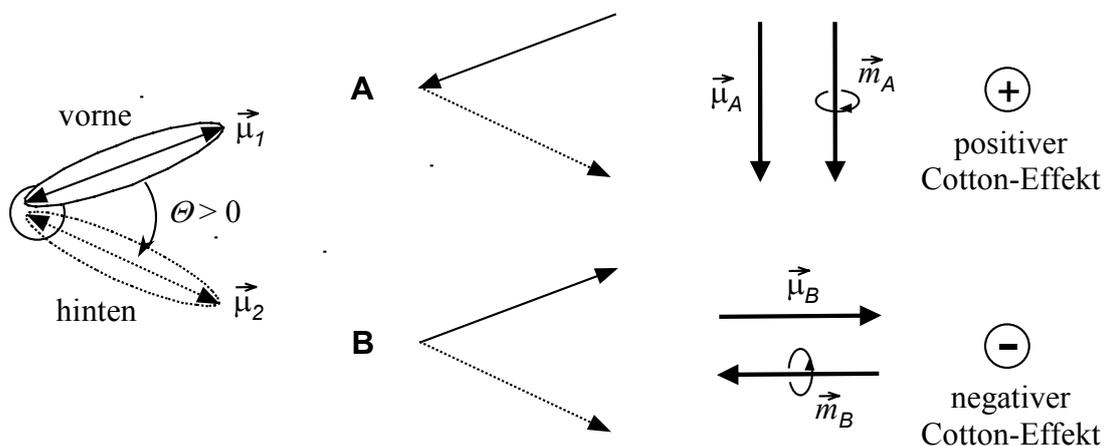


Abb. 73: Exciton-Wechselwirkung zweier Chromophore. Verschiedene Kombinationen **A** und **B** der Übergangsdipole resultieren in zueinander unterschiedlich orientierten elektrischen und magnetischen Übergangsmomenten.

Danach treten zwei mögliche Kombinationen **A** und **B** der einzelnen Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}_1$ und $\vec{\mu}_2$ zum elektrischen Gesamtübergangsdipolmoment $\vec{\mu}_A$ bzw. $\vec{\mu}_B$ durch einfache Vektoraddition auf. Die dabei auftretende Rotation von Elektronen-

ladung generiert jeweils zusätzlich ein magnetisches Übergangsdipolmoment \vec{m}_A bzw. \vec{m}_B , welches im ersten Fall parallel, im zweiten Fall antiparallel zur entsprechenden elektrischen Komponente gerichtet ist. Die parallele Einstellung führt nach Gl. 7 wegen $\cos(\vec{\mu}, \vec{m}) = \cos 0^\circ = 1$ zu einem positiven CD ($R > 0$) und positiven Cotton-Effekt, die antiparallele Einstellung wegen $\cos(\vec{\mu}, \vec{m}) = \cos 180^\circ = -1$ zu einem negativen CD ($R < 0$) und negativen Cotton-Effekt. Die relative Lage der beiden Banden im CD-Spektrum ergibt sich aus dem Coulombschen Gesetz für die elektrostatische Wechselwirkung der Übergangsdipole $\vec{\mu}_1$ und $\vec{\mu}_2$ gemäß der *Davydov*-Aufspaltung (vgl. Kap. 1.1.3.1.). Bei der Anregung **A** führt die anziehende Kombination der Dipole zur Energieabsenkung, während bei der Anregung **B** die Abstoßung gleicher Ladungen zwischen den Dipolen Energieerhöhung bedeutet. Daraus folgt, dass der definitionsgemäß bei längeren Wellenlängen auftretende erste Cotton-Effekt hier positiven Vorzeichens (positiver CD für **A**), der bei kürzeren Wellenlängen auftretende zweite Cotton-Effekt negativen Vorzeichens (negativer CD für **B**) ist. Bei einer plus-minus Abfolge der von längeren Wellenlängen herkommenden CD-Banden spricht man von einem positiven CD-Couplet^[151] oder auch von einer „positiven Excitonenchiralität“^[153]; die entgegengesetzte minus-plus Kombination stellt dann ein negatives CD-Couplet dar. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Positionen, an denen die Extrema der beiden einzelnen CD-Kurven liegen, repräsentiert die *Davydov*-Aufspaltung ($\Delta\lambda$ in Abb. 74). Dabei ist zu beachten, dass im Fall von sehr kleinen Exciton-Wechselwirkungsenergien ($\Delta\tilde{\nu} < 500 \text{ cm}^{-1}$) die im CD-Spektrum beobachtete Summe der beiden einzelnen Übergänge ein nur schwaches CD-Couplet liefern kann, das

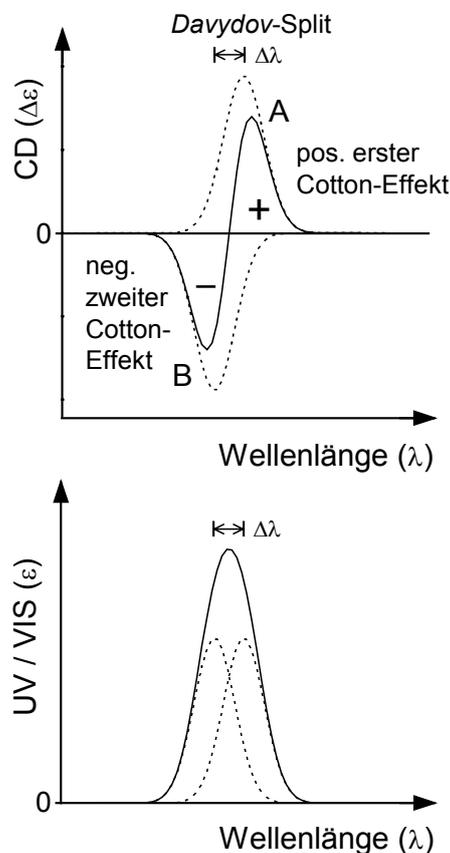


Abb. 74: positives CD-Couplet im CD- bzw. UV/VIS-Spektrum als Summation zweier einzelner Excitonenübergänge (gepunktet)

darüber hinaus einen viel zu großen *Davydov*-Split ($\Delta\tilde{\nu}_{\text{beob.}} > 3000 \text{ cm}^{-1}$) vorgibt^[154]. Im UV/VIS-Spektrum addieren sich die in der Regel dicht beieinanderliegenden Übergänge aufgrund des gleichen Vorzeichens gewöhnlich zu einem einzigen Absorptionsmaximum und sind dort nicht direkt identifizierbar.

2.4.2. CD-Spektroskopie an Carotinoidaggregaten

Bei Aggregaten von Carotinoiden geben positive oder negative CD-Couplets im CD-Spektrum Aufschluss über die Drehrichtung der Helix, die von den Polyenkettensystemen als chiral angeordnete Chromophore gebildet wird. Wenn wie im vorher vorgestellten Beispiel die individuellen elektrischen Übergangsmomente von zwei koppelnden Chromophoren eine rechtsgängige Schraube bilden, kann man ein positives CD-Couplet im CD-Spektrum beobachten. Umgekehrt beschreibt ein negatives CD-Couplet dann eine linkshelicale Anordnung der involvierten Übergangsmomente, die bei Carotinoiden etwa in Richtung der Polyenkettensystemen liegen. Für monomere Carotinoide, deren größte Rotationsstärken unter 300 nm oft durch $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge aus den Endgruppen verursacht werden, sind die CD-Effekte im Bereich des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs über 400 nm vernachlässigbar klein^[50], so dass dort auftretende Cotton-Effekte über Excitonenkopplung der Chromophore im Aggregat entstehen. In Anlehnung an Untersuchungen von *Lematre et al.*^[59] (vgl. Kap. 1.1.3.2.) untersuchte *Köpsel* CD-spektroskopisch vor allem die Aggregationsbildung der beiden enantiomerenreinen Formen von Zeaxanthin **6** und Astaxanthin **9** in wässrigem Aceton und fand aus den CD-Spektren eine Helizität der Aggregate. Diese wurde durch Molecular-Modelling bestätigt^[105]. Die intensive aber unterschiedliche CD-Aktivität von Aggregaten der Xanthophylle Lutein **7** und Luteindiacetat **18** mit ihren H- bzw. J-artigen Strukturen konnte in wässriger Lösung und als dünner Film beschrieben und analysiert werden^[60]. Die Übereinstimmung der CD-Spektren von aggregiertem Luteindiacetat **18** mit denen von carotinoidhaltigen Blütenblättern gibt einen Hinweis auf die chirale Selbstorganisation der Carotinoide in den Chromoplasten^[61]. Nur vereinzelt findet man in der Literatur, dass die Aggregation von chiralen Carotinoiden in einer Lipidmembran mit CD-Spektroskopie verfolgt wurde. So wurde von dem Erscheinen eines intensiven negativen CD-Couplets im bei RT aufgenommenen CD-Spektrum von unilamellaren DPPC-Liposomen, in die mindestens 3 % (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** eingelagert wurden,

berichtet^[155]. *Milon et al.*^[86] führten temperaturabhängige CD-spektroskopische Untersuchungen mit zusätzlich (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin und den entsprechenden C₅₀-Homologen, jeweils eingelagert in unilamellare DMPC-Liposomen, durch. Während in allen Fällen oberhalb $T_m(\text{DMPC}) \approx 23 \text{ }^\circ\text{C}$ kein CD-Signal nachweisbar ist, tritt mit fallender Temperatur zunächst um das Absorptionsmaximum des Monomers und später auch mit erhöhter Pigmentkonzentration im Wellenlängenbereich des H-Aggregats ein CD-Couplet auf. Dieses Phänomen lässt unterschiedliche Aggregationsprozesse und Aggregatespezies der verwendeten Carotinoide in der Lipiddoppelschicht vermuten.

2.4.3. Aufnahme der CD-Spektren

Für die Aufnahme der CD-Spektren werden die mit Carotinoiden im Konzentrationsbereich von 0.1 – 0.4 mmol/l beladenen Vesikelpuben (entspricht einem Carotinoide/Lipid-Verhältnis von etwa 1:50 bis 1:15, $EV \approx 2 - 7 \text{ mol}\%$) auf $1/10$ verdünnt und vermessen (Küvettenlänge 1 cm bzw. 0.5 cm bei Temperierung, Einstrahl-Referenzverfahren^[156]). Zur Korrektur wird die mit den entsprechend präparierten reinen Lipidvesikeln aufgenommene CD-Kurve abgezogen. Die als Elliptizitäten ψ ausgegebenen CD-Signale werden mit Gl. 5 und Gl. 6 in $\Delta\varepsilon$ -Werte umgerechnet, um einen konzentrations- und schichtdickenunabhängigen Vergleich zu gewährleisten.

Die Carotinoidlösungen in Aceton/Wasser-Gemischen werden wie bei der UV/VIS-Spektroskopie beschrieben angesetzt (vgl. Kap. 2.3.) und dann CD-spektroskopisch vermessen ($c(\text{Car}) = 2.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$, Küvettenlänge 2 cm). Die Angabe des CD erfolgt wie oben beschrieben nach Umrechnung in $\Delta\varepsilon$ -Einheiten.

2.4.3.1. (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin 9a

Lagert man anstelle eines Gemisches der drei möglichen Stereoisomere des Astaxanthin **9** die enantiomerenreine Komponente (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin **9a** in unilamellare DPPC-Liposomen ein, ergeben sich für die temperaturabhängigen UV/VIS-Spektren grundsätzlich keine Veränderungen. Das CD-Spektrum zeigt ein negatives CD-Couplet von 529 bis 434 nm ($\Delta\varepsilon_{529} - \Delta\varepsilon_{434} = -38$), dessen Minimum an der bathochromen Schulter der UV/VIS-Bande liegt. Die Maxima der beiden Spektren befinden sich bei

etwa gleicher Wellenlänge (Abb. 75). Die zwei Cotton-Effekte koinzidieren mit den beiden UV/VIS-Übergängen, von denen der langwellige einen kleineres elektrisches Übergangsdipolmoment hat und daher extinktionsschwächer ist. Diese Beobachtungen sprechen für die Existenz von H-Aggregat-Dimeren, bei denen die Einzelmoleküle linkshelical gegeneinander verdrillt sind. In diesem Fall repräsentiert die Energiedifferenz zwischen den beiden Stellen im CD-Spektrum, an denen sich die Extrema der beiden weit genug auseinanderliegenden Cotton-Effekte befinden, eine obere Grenze für die Excitonen-Wechselwirkung bzw. den *Davydov*-Split ($\Delta\tilde{\nu} = 4140 \text{ cm}^{-1}$). Ein weiteres um 375 nm auftretendes positives CD-Signal findet keine Entsprechung im UV/VIS-Spektrum und lässt sich keinem bestimmten Übergang zuordnen. Es sei noch zu erwähnen, dass keine CD-spektroskopischen Veränderungen eintreten, wenn bei der Präparation anstelle des natürlichen L-DPPC das Enantiomergemisch DL-DPPC eingesetzt wird. Die optische Aktivität der Carotinoidaggregate in der Lipidmembran wird demnach nicht durch chirale Wechselwirkungen der Carotinoidmoleküle mit dem umgebenden Medium gesteuert, sondern allein über die gegenseitige Wechselwirkung der chiralen Carotinoidendruppen untereinander im Aggregat generiert.

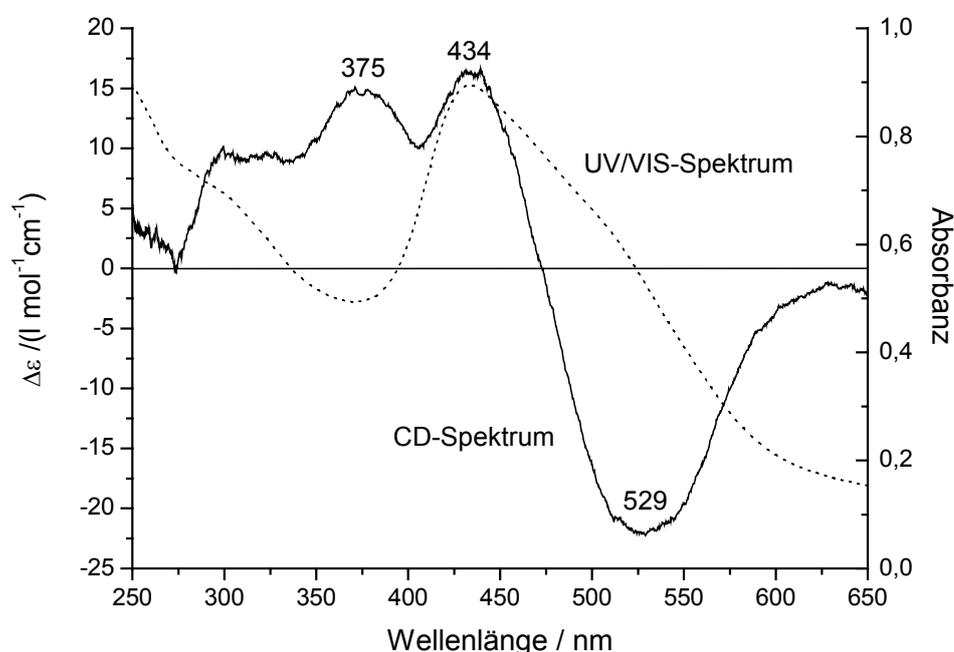


Abb. 75: CD- und UV/VIS-Spektrum von (3R,3'R)-Astaxanthin **9a** ($EV = 4 \text{ mol}\%$) in unilamellaren DPPC-Vesikeln ($T_m = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$) bei RT

Im Wässrigen hingegen sind die CD-Effekte der gebildeten Aggregate bis zu viermal größer. Bis zu einem Wassergehalt von 60 % lässt sich in einem Aceton/Wasser-Gemisch im untersuchten Wellenlängenbereich zunächst kein CD beobachten, da die Astaxanthinmoleküle noch monomer vorliegen. Mit einsetzender Aggregation erscheint ein negatives CD-Couplet mit Signalen bei 525 und 421 nm ($\Delta\epsilon_{525} - \Delta\epsilon_{421} = -145$). Der Nulldurchgang verschiebt sich mit steigendem Wasseranteil hypsochrom (Abb. 76).

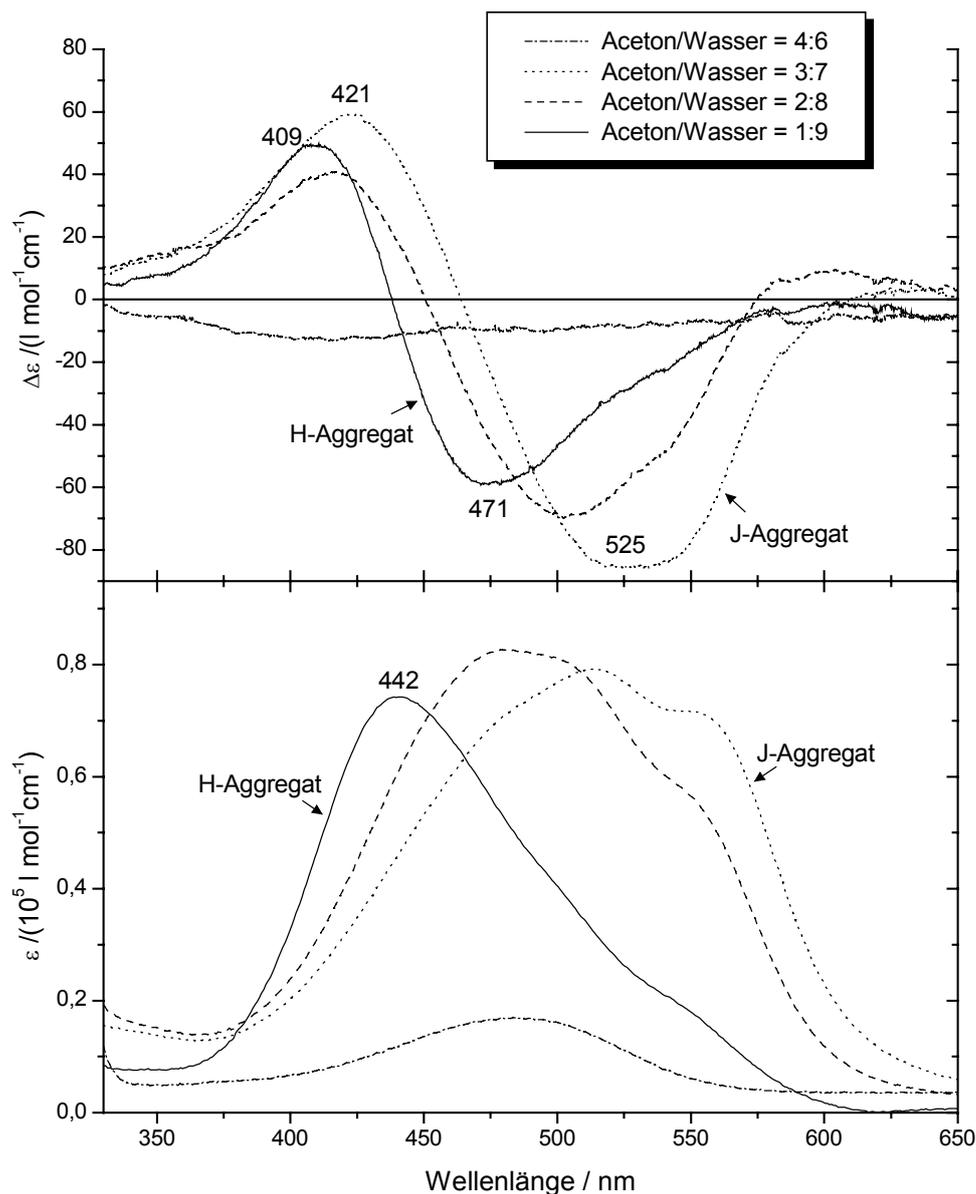


Abb. 76: CD- und UV/VIS-Spektren von (3R,3'R)-Astaxanthin **9a** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

Dabei nimmt die Amplitude etwas ab und die Cotton-Effekte rücken energetisch näher zusammen. Aus den zunächst lose gebundenen, aber schon Chiralität aufweisenden J-

Aggregaten bilden sich dichter gepackte H-Aggregate aus, die die linksgängige helicale Struktur beibehalten. Diese Aggregate sind deutlich größer als die in der Membran postulierten Dimere. Aus der Kopplung mehrerer Chromophore resultiert sowohl die kurzwellige Verschiebung als auch die größere Intensität des Excitonencouplets in Bezug zu dem in der DPPC-Membran beobachteten. Der resultierende größere Excitonensplit wird nun nicht mehr durch die Lage der beiden intensivsten Cotton-Effekte entgegengesetzten Vorzeichens angezeigt, sondern auf der bathochromen Seite durch das energieärmste Energieniveau der n koppelnden Chromophoren bestimmt, dessen Anregung im UV/VIS- bzw. CD-Spektrum nur wenig Dipol- bzw. Rotationsstärke zukommt und um etwa 550 nm erfolgt (Schulter in den Spektren).

2.4.3.2. Lutein 7

CD-spektroskopische Messungen an Aggregaten von Lutein 7 oder seinen Derivaten in einer Lipiddoppelschicht wurden bis dato noch nicht durchgeführt. *Takagi et al.* erzeugten und beobachteten Luteinaggregate vornehmlich bei hohen pH-Werten in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen nur dispergiert in Phosphatidylcholin-Liposomen^[70], jedoch nicht direkt im Membraninneren. Abb. 77 zeigt die CD-Aktivität von Lutein 7 in unilamellaren DPPC-Vesikeln in Korrelation zur Absorbanz und in Abhängigkeit von der Temperatur. Bis zu einer Erwärmung auf 30 °C liefert das CD-Spektrum ein negatives Excitonencouplet mit Extremwerten bei etwa 432 und 395 nm ($\Delta\epsilon_{432} - \Delta\epsilon_{395} = -31$), begleitet von zwei weiteren bathochrom dazu verschobenen CD-Effekten bei 450 und 486 nm. Für jedes Carotinoid/Lipid-Verhältnis von 2 – 7 mol% ergibt sich ein analoger CD-Kurvenverlauf von ähnlicher Intensität und bezeichnend negativer Excitonenchiralität. Der positive Cotton-Effekt fällt dabei ungefähr mit dem Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{max}} = 398$ nm zusammen, während auch die drei weiteren CD-Signale (bei 432, 450 und 486 nm) ihre Übereinstimmung in der Lage mit UV/VIS-Absorptionen in der langwelligen Schulter der Absorptionsbande finden. Die Aufspaltung eines Signals durch Excitonen-Wechselwirkung in vier erkennbare Energieniveaus bedeutet, dass mindestens Tetramere vorliegen. Während die ideale kartenstapelähnliche Anordnung der Moleküle nur eine kurzwellig verschobene H-Absorptionsbande und keinerlei CD-Effekte erzeugt, wird nur dann optische Aktivität im H-Aggregat generiert, wenn die Einzelmoleküle unter leichter Verschiebung gegeneinander helical arrangiert sind.

Dabei werden im UV/VIS-Spektrum auch die energieärmeren Übergänge erlaubt, durch deren schwache Intensität die Lage der kurzwelligsten Hauptabsorptionsbande jedoch nur unwesentlich verschoben wird. Bei 34 °C wandert das Absorptionsmaximum unter Extinktionsabnahme langsam bathochrom und die Aggregate beginnen sich aufzulösen. Gleichzeitig wird das CD-Spektrum unter Intensitätsverlust invertiert. Das positive CD-Couplet erstreckt sich von ungefähr 444 bis 393 nm ($\Delta\epsilon_{444} - \Delta\epsilon_{393} = +20$). Der Nulldurchgang bleibt in etwa erhalten.

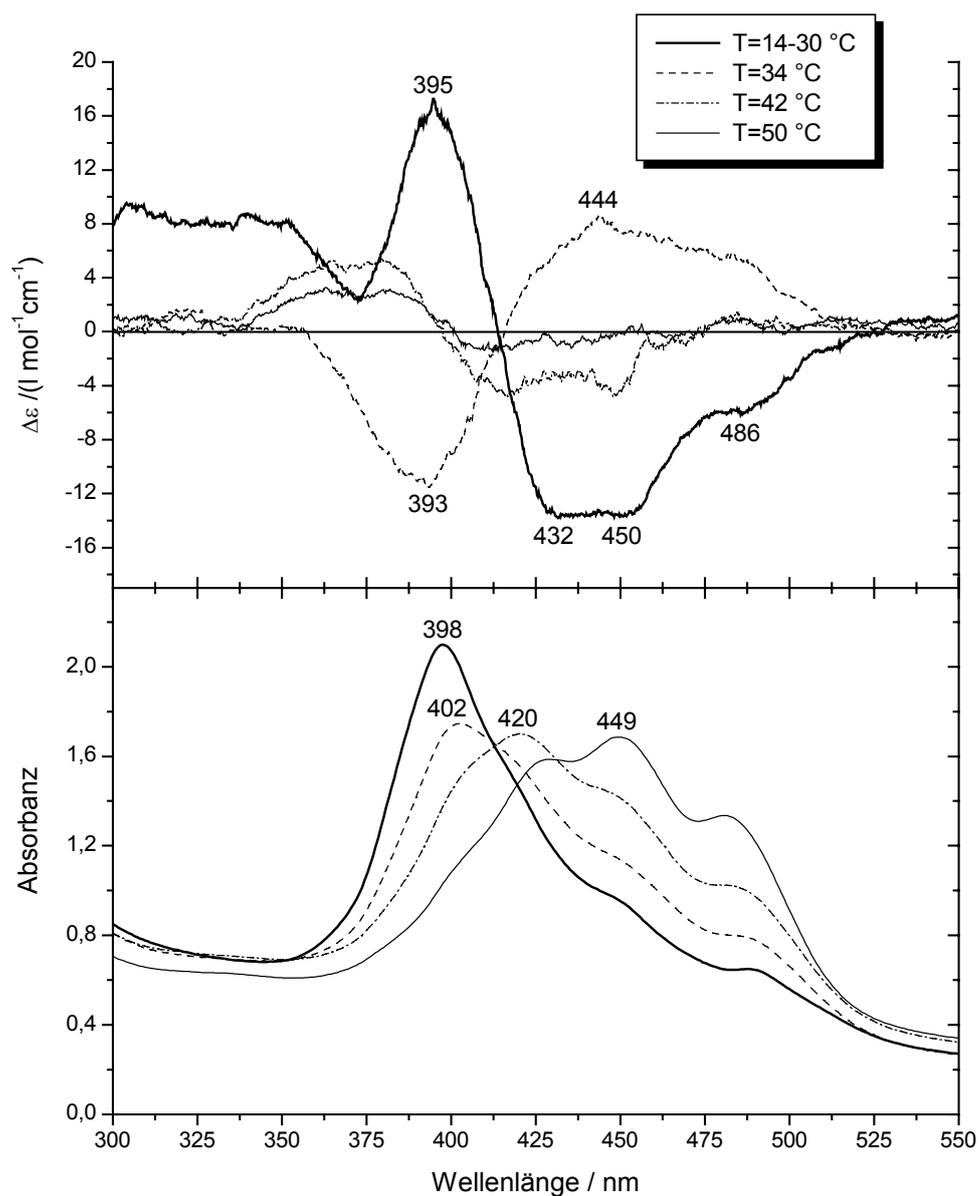


Abb. 77: Temperaturabhängige CD- und UV/VIS-Spektren von Lutein 7 ($EV = 7\text{ mol}\%$) in unilamellaren DPPC-Vesikeln ($T_m = 41.4\text{ }^\circ\text{C}$)

Dieser „invertierte Kurvenverlauf“ wurde von *Takagi et al.*^[69] bei Lutein 7 in wässrigem Aceton ebenfalls beobachtet, und zwar bei annähernd 45 % Acetonanteil, bei dem Aggregation und das „in Lösung Gehen“ der Luteinmoleküle gerade in Konkurrenz treten. Weiterhin tritt auch bei der Solubilisation von Lutein 7 in einer wässrigen Pufferlösung mit Natriumdodecylsulfat als anionisches Tensid mit Erhöhung der Detergensenkonzentration eine Umkehrung der ursprünglich negativen Excitonenchiralität ein, bevor sich nach weiterer Zugabe des Tensids die Luteinmoleküle monomer in Micellen einbinden und ihre CD-Aktivität verlieren^[66,67].

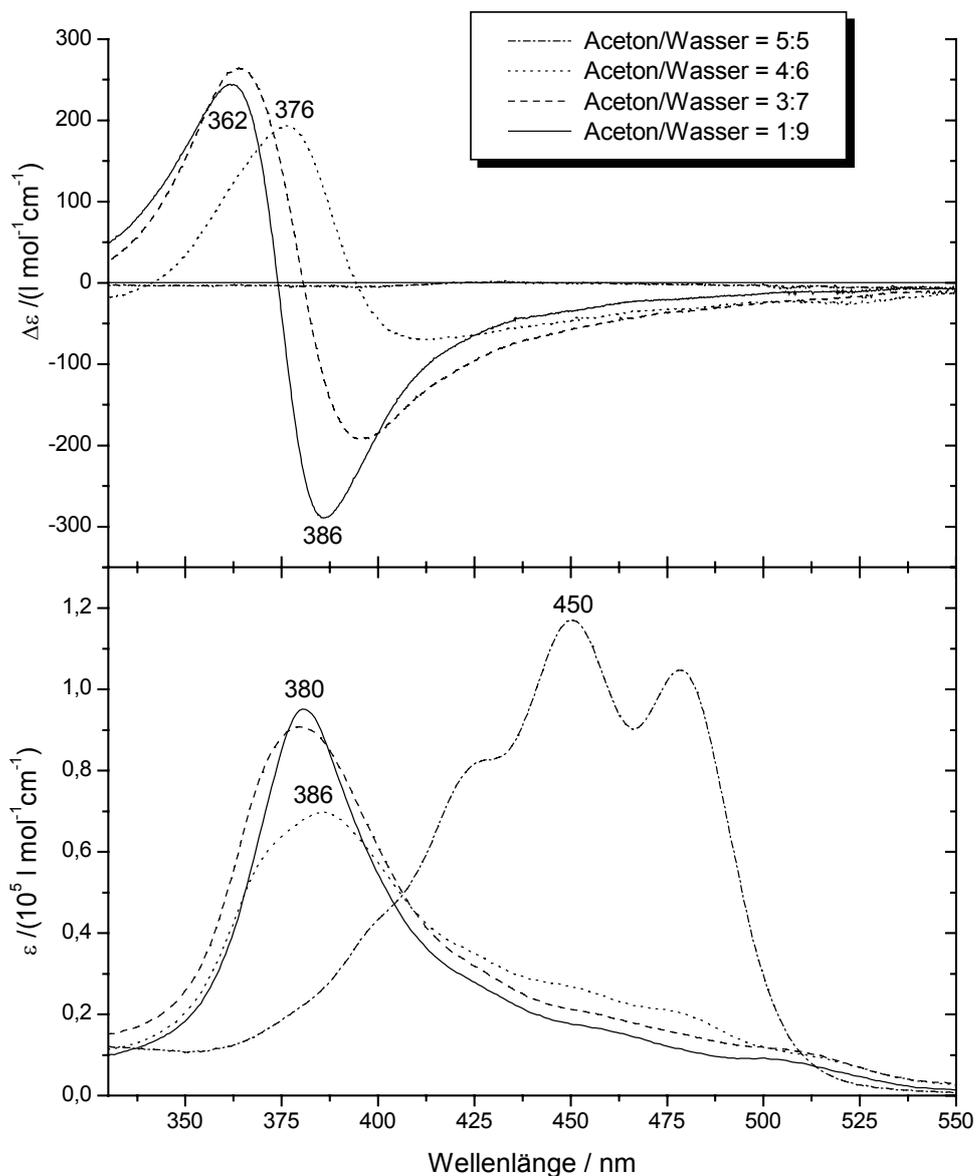


Abb. 78: CD- und UV/VIS-Spektren von Lutein 7 [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

Dieses Phänomen der CD-Inversion scheint spezifisch für den Dissoziationsprozess von Luteinaggregaten zu sein. Während dies in den hier angeführten Fällen stets durch Änderung des die Luteinaggregate umgebenden Mediums herbeigeführt wird, vollzieht sich die chirale Umstrukturierung der Luteinaggregate in der Lipidmembran allein über thermische Energiezufuhr. Bei beginnender Monomerisierung wechselt in den nun dominierenden Aggregatespezies der Drehsinn der von benachbarten Chromophoren gebildeten Helix von minus nach plus. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich leicht in Richtung des Wendepunktes des CD-Couplets, was auf einen vergrößerten Absolutbetrag des nun positiven Diederwinkels zwischen zwei Luteinmolekülen in den wohl nun überwiegend auftretenden Dimeren hinweist. Bei 42 °C verschwindet das positive CD-Couplet und die CD-Aktivität im sichtbaren Bereich wird stark vermindert. Weitere Temperaturerhöhung zerstört die restliche optische Aktivität fast vollständig und das UV/VIS-Spektrum belegt den Zerfall der Aggregate in Einzelmoleküle oberhalb T_m . Ein weiterer Beweis für die Tatsache, dass sich die Luteinmoleküle innerhalb der DPPC-Doppelschicht befinden, ist der Vergleich der CD-Spektren mit CD-Untersuchungen an Lutein 7, welches in Suspensionen von SUV aus reinem Lecithin dispergiert ist^[70]. Dort erreicht der CD deutlich höhere Werte wie bei den Luteinaggregaten in wässrigem Aceton (Abb. 78). Bei einem Wasseranteil von 90 % offenbart sich ein schmales negatives Excitonencouplet mit Signallagen bei 386 und 362 nm. Dieses ist mehr als 15-mal so intensiv wie das durch Luteinaggregate in der DPPC-Membran hervorgerufene ($\Delta\epsilon_{386} - \Delta\epsilon_{362} = -534$).

Die Ursache eines solch intensiven CD-Couplets kann die excitonische Wechselwirkung sein, die zwischen chiral angeordneten kleinen Aggregaten entsteht, so wie sie in einer Lipidmembran separat auftreten. Demgemäß ist zwischen einem primären intermolekularen CD in Membranen und einem übergeordneten, größeren supramolekularen exciton-gekoppelten CD in wässriger Lösung zu unterscheiden. Ersterer geht aus der chiralen Anordnung von Chromophoren zu kleinen Untereinheiten hervor, deren weiterführende chirale Organisation dann zu Letzterem führt. In einer Lipiddoppelschicht bleibt den Luteinaggregaten die Ausbildung von supramolekularen, helicalen Strukturen verwehrt und nur die aus intermolekularer Excitonenchiralität herrührenden schwächeren CD-Effekte sind vorhanden.

2.4.3.3. Luteindiacetat **18**

Luteindiacetat **18** zeichnet sich strukturell im Vergleich zum Lutein **7** durch den Ersatz der freien Hydroxyfunktionen durch Acetylgruppen aus. Bei der Aggregation werden die Moleküle nicht in eine dichte parallele Anordnung gezwungen, da eine mögliche Stabilisierung über die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken fehlt. Vielmehr sind die Moleküle im Aggregat seitwärts gegeneinander verschoben und bewirken eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums. Das CD-Spektrum von **18** in DPPC-Liposomen präsentiert intensitätsstarke positive und negative Cotton-Effekte im sichtbaren Bereich (Abb. 79).

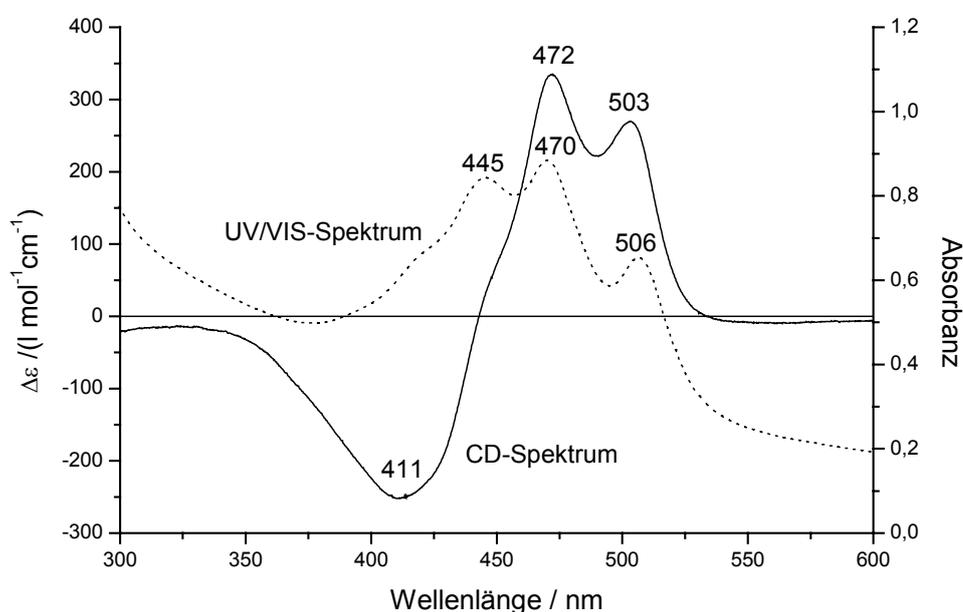


Abb. 79: CD- und UV/VIS-Spektrum von Luteindiacetat **18** ($EV = 1 \text{ mol}\%$) in unilamellarer DPPC-Vesikelsuspension ($T_m = 41.4 \text{ }^\circ\text{C}$) bei RT

Das positive CD-Couplet ($\Delta\epsilon_{472} - \Delta\epsilon_{411} = 587$) lässt auf eine rechtsgängige Helizität zwischen den koppelnden Chromophoren im Aggregat schließen. Carotinoid/Lipid-Verhältnisse von 1 – 7 mol% liefern stets das gleiche CD-Spektrum, welches auch im gesamten Temperaturbereich von 14 – 50 °C keine nennenswerten Veränderungen zeigt. Lediglich eine minimale Abnahme der Signalintensität bei höheren Temperaturen, ebenfalls bemerkbar im UV/VIS-Spektrum, mag von einer leichten Zersetzung des Luteindiacetats **18** herrühren. Die gebildeten Aggregate mit beachtlicher CD-Aktivität bleiben demnach vom Fluiditätszustand der DPPC-Membran unbeeinflusst. Die

Übereinstimmung des CD-Spektrums sowohl in der Lage als auch Rotationsstärke der CD-Bande mit dem von Luteinaggregaten in 10%igem wässrigen Aceton (Abb. 80) lässt gleichartige große Aggregatespezies in beiden Medien vermuten. Während z. B. Lutein **7** als stärker polares Dihydroxycarotinoid schwächere Aggregate bildet^[105] und sich bevorzugt oberhalb T_m monomer in eine DPPC-Doppelschicht durch Stabilisierung über Wasserstoffbrücken einlagert, wirken beim weniger polaren Diacetat **18** verstärkt die Dispersionskräfte der Moleküle untereinander, bevor eine mögliche Integration in die Lipidmembran erfolgt.

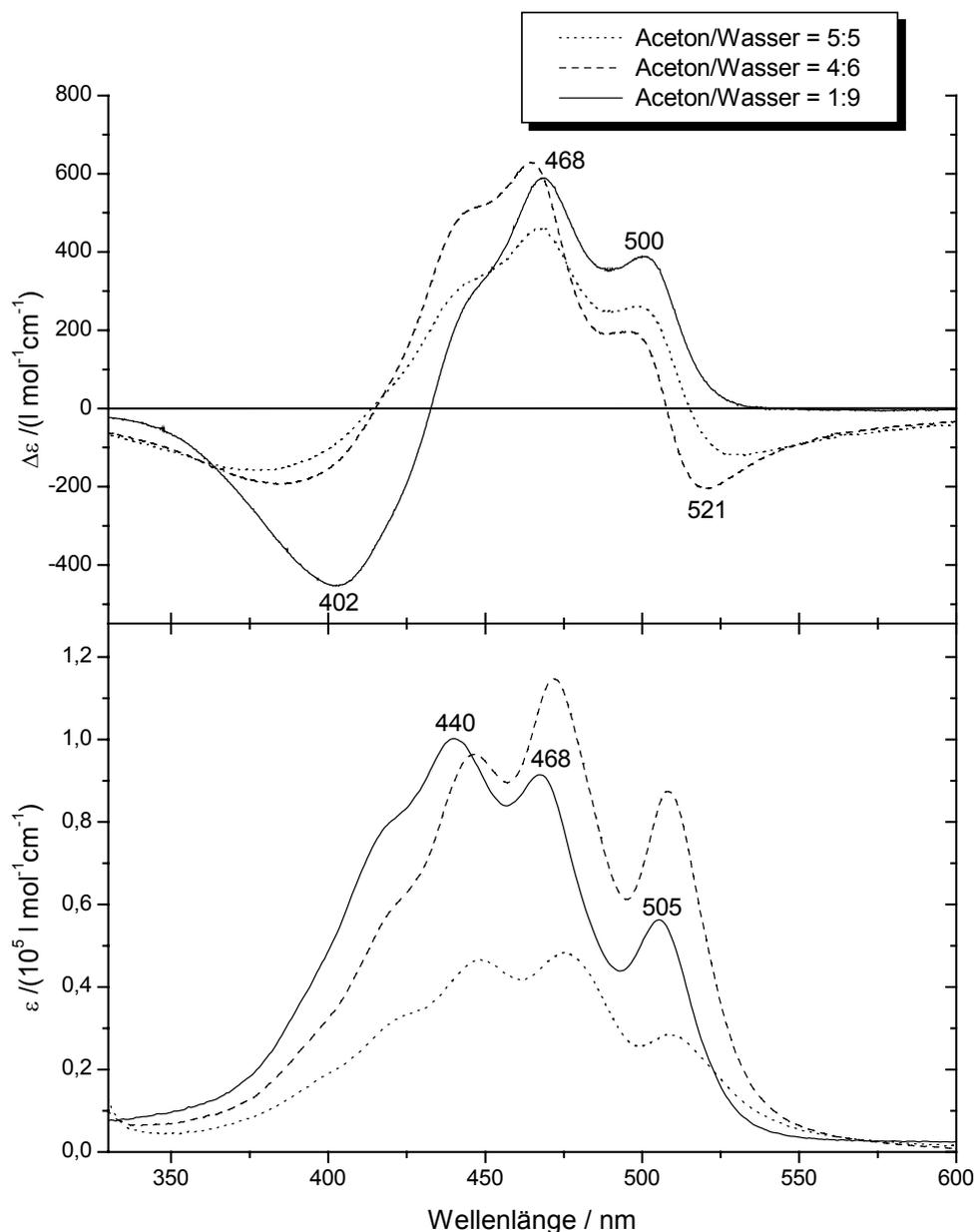


Abb. 80: CD- und UV/VIS-Spektren von Luteindiacetat **18** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen

Die Aggregate erreichen so ähnliche Dimensionen wie im wässrigen Medium, in welchem sich das CD-Couplet ab 90 % Wassergehalt deutlich herausbildet. Selbst die Anwesenheit eines Phospholipids wie DPPC vermag diese einmal gebildeten geordneten Aggregatestrukturen nicht zu zerstören. Vielmehr ist eine Zerstörung der Liposomenstruktur durch die stabilen Carotinoidaggregate vorstellbar und wahrscheinlich. Diese Aggregate sind demnach hauptsächlich in den Lipidvesikeln und deren Fragmenten dispergiert. Dies kommt mit der schon zuvor vorgestellten Vermutung überein (vgl. Kap. 2.3.10.), dass bei der Carotinoidaggregation eine chirale nematische Phase nahezu unbeteiligt von Lipidmolekülen erzeugt wird. Bei diesen Strukturen bilden die aus den fadenförmigen Luteindiacetatmolekülen bestehenden nematischen Schichten eine Rechtsschraube und rufen so die starke positive Excitonenchiralität im sichtbaren Bereich hervor.

2.4.3.4. Luteindimethylether 20

Ein nahezu identisches Aggregationsverhalten zum acetylierten Derivat **18** zeigt der Dimethylether **20**. Bei der Präparation der unilamellaren Vesikel mit **20** liegt die Carotinoideausbeute CV bei einem erreichten Carotinoid/Lipid-Verhältnis von $EV = 4 \text{ mol\%}$ bei nur knapp 60 % und somit noch unterhalb der mit **18** erreichten. Dies spricht für die Ausbildung größerer Carotinoidassoziate, die bei der Extrusion eliminiert werden. Im CD-Spektrum der mit **20** angefertigten Vesikelproben erscheint ebenfalls ein intensives positives CD-Couplet zwischen 473 und 410 nm ($\Delta\epsilon_{473} - \Delta\epsilon_{410} = +423$) (Abb. 81). Während von 14 – 50 °C die Struktur der CD-Kurve unverändert bleibt, nimmt ihre Intensität bei höheren Temperaturen etwas ab. Entsprechend geht auch im Absorptionsspektrum die Extinktion oberhalb T_m unter Verlust der Feinstruktur etwas zurück. Unter der Annahme, dass die Aggregate wie bei Luteindiacetat **18** aus übereinanderliegenden nematischen Schichten bestehen, in denen die Carotinoidmoleküle eine Vorzugsrichtung (Direktor) behalten, die jedoch in den abfolgenden Schichten, gesteuert über die molekulare Chiralität von **20**, jeweils um den gleichen Winkel gedreht ist, kann eine Temperaturerhöhung durch die höhere Beweglichkeit der Luteinmoleküle die regelmäßige Rechtsdrehung der Schichten stören und zu einer leichten Verringerung der optischen Aktivität führen.

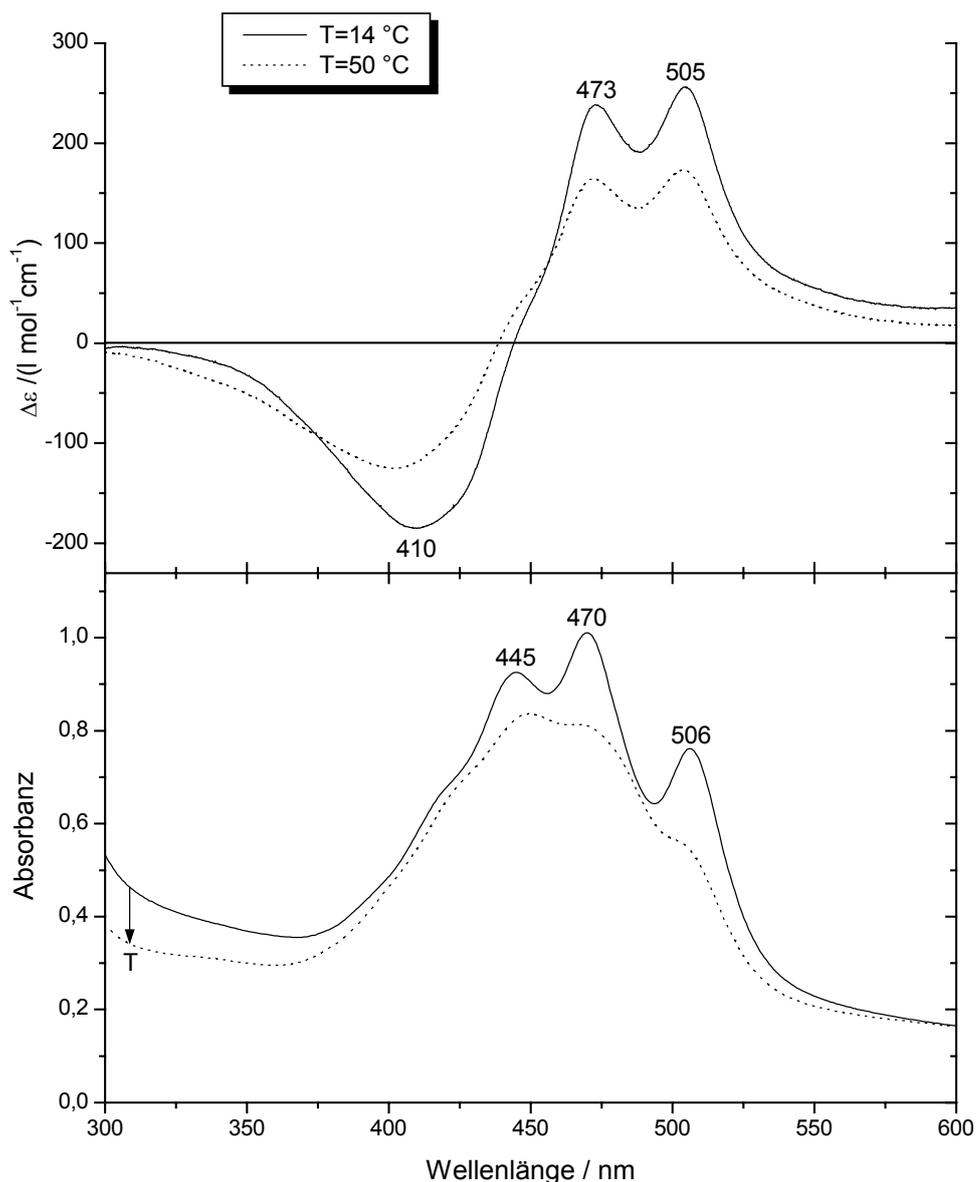


Abb. 81: CD- und UV/VIS-Spektren von Luteindimethylether **20** ($EV = 4 \text{ mol\%}$) in unilamellarer DPPC-Vesikelsuspension ($T_m = 41.4 \text{ °C}$)

In Aceton/Wasser-Gemischen nimmt die positive Excitonenchiralität der Aggregate im sichtbaren Bereich mit steigendem Wassergehalt von 60 – 90 % kontinuierlich zu (Abb. 82), da die zunächst schwachen van-der-Waals-Wechselwirkungen, aus denen die erzeugte Chiralität resultiert, zwischen den Schichten gestärkt werden.

Die leichte Hypsochromie der Spektren zuzüglich mehr als doppelt intensive CD-Effekte im Vergleich zu den in der Liposomensuspension beobachteten lassen auf die Existenz von weiter gewachsenen Aggregaten schließen.

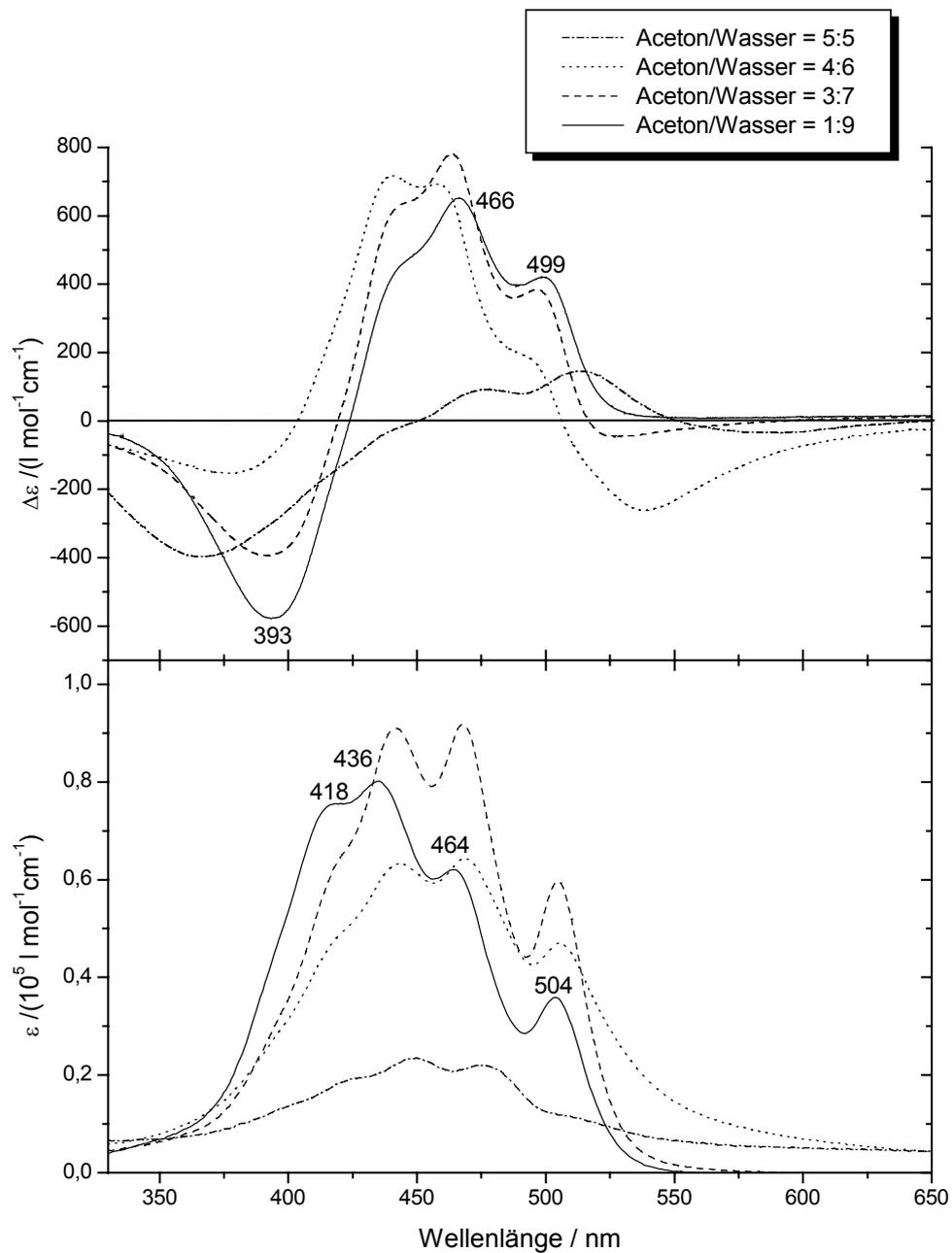


Abb. 82: CD- und UV/VIS-Spektren von Luteindimethylether **20** [$c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$] in Aceton/Wasser-Gemischen (Maximawerte gelten für Ac/Wa = 1:9)

2.5. Elektronenmikroskopie

Eine Methode, um Informationen über die Beschaffenheit der Liposomen in den Präparationen zu bekommen, ist die direkte Beobachtung der Membranstrukturen unter dem Elektronenmikroskop. Die Wechselwirkung zwischen Elektronen und Phospholipiden ist jedoch zu gering, um einen genügenden Kontrast zu erzeugen. Bei dem Verfahren der Negativfärbung („Negativ-Staining-Verfahren“) wird das Präparat deshalb mit der Lösung eines Schwermetallsalzes (hier Phosphorwolframsäure) behandelt. Die Umgebung der Liposomen, in der sich verstärkt die Schwermetallionen abgelagert haben, erscheint im Elektronenmikroskop dunkel, da dort die Elektronen stark gestreut werden^[72]. Demnach ist nicht die Struktur selbst, sondern die Umgebung durch hohen Kontrast gekennzeichnet.

In den Aufnahmen können keine multilamellaren Strukturen beobachtet werden, die dort als abwechselnd helle und dunkle konzentrische Lamellen angezeigt werden. Ihr Erscheinungsbild ist zur Zeit noch unverstanden^[72]. Vielmehr lassen sich in der Regel gleichmäßig rund bis oval geformte, helle Bereiche in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen als unilamellare Liposomen identifizieren. Ihr Durchmesser liegt erwartungsgemäß in der Größenordnung des Porendurchmessers der Filtermembran (400 nm), durch die die Suspension extrudiert wurde. Abb. 74 repräsentiert Elektronenmikroskopaufnahmen von DPPC-Vesikelsuspensionen, die unter Zugabe verschiedener Carotinoide präpariert wurden. Im Fall von Abb. 74 la enthält die Probe 4.0 mol% Actinioerythrol **26**, das sich unter Ausbildung von H-Aggregaten gut in die Lipiddoppelschicht integriert. Unten im Bild sind drei unilamellare Liposomen zu erkennen, die sich an derselben Stelle des Trägernetzchens abgesetzt haben, umgeben von amorph eingetrockneter Phosphorwolframsäure, die die dunkel gefärbte Umgebung hervorruft. Untersucht man eine in gleicher Weise präparierte Probe nach viertägiger Lagerung bei 4 °C unter dem Elektronenmikroskop (Abb. 74 lb), so haben sich die Liposomen zu größeren Strukturen zusammengeballt. Ähnliche Agglomerationsphänomene können auch beobachtet werden, wenn die untersuchte Suspension vorher kurzzeitig 5 min oberhalb T_m auf 50 °C erhitzt wurde. Eine Verstärkung des langwelligen Streuanteils im Absorptionsspektrum einiger Vesikelpräparationen bei Erreichen von T_m mag das Resultat der Bildung solch größerer Agglomerate sein.

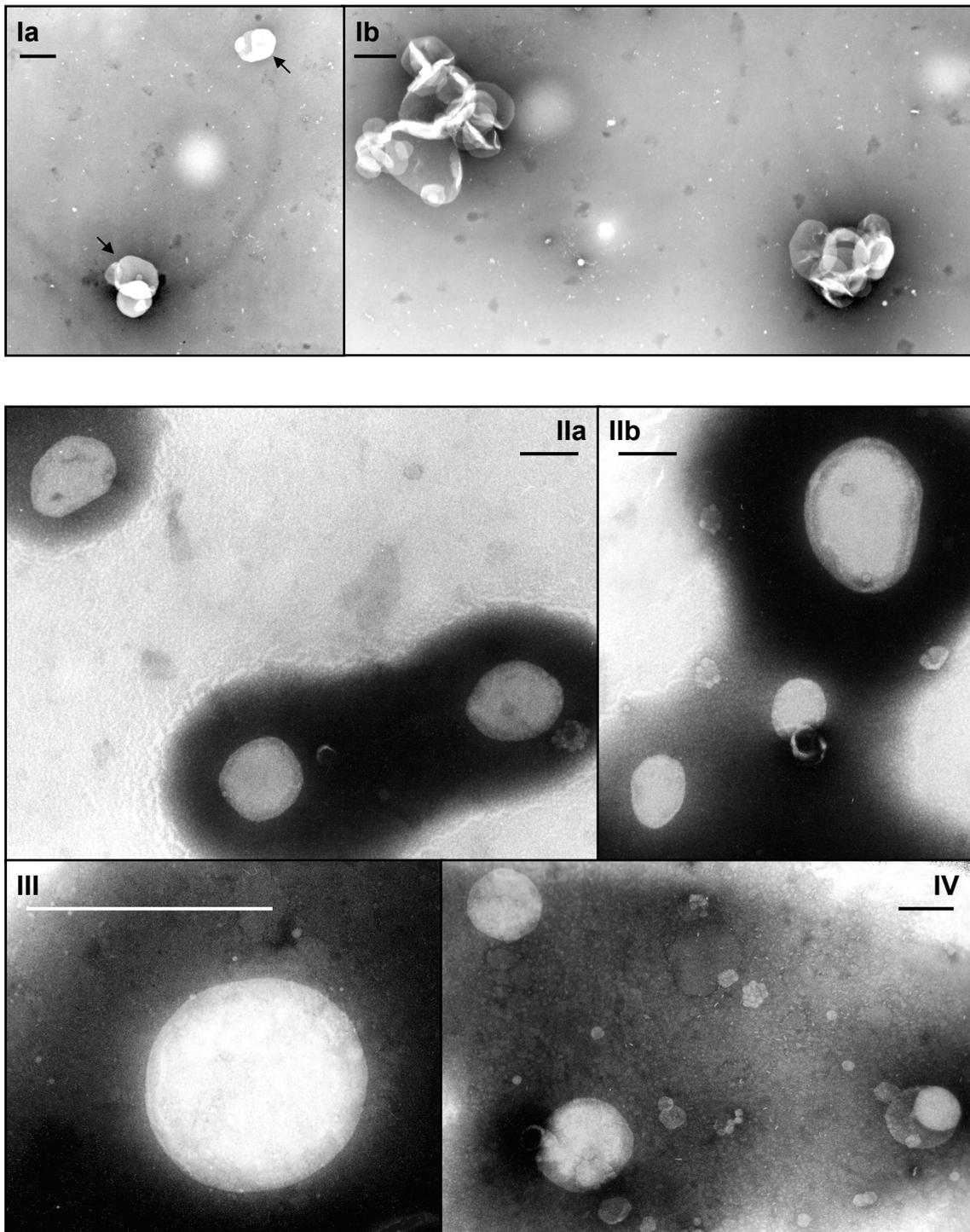


Abb. 74: Elektronenmikroskopaufnahmen von carotinoidbeladenen DPPC-Liposomen nach Extrusion (Balkenlängen repräsentieren 400 nm Porendurchmesser), kontrastiert mit 1%iger Phosphorwolframsäure (pH = 6.8)

- I** mit 4.0 mol% Actinioerythrol **26**, **a** nach 12 h Lagerung, **b** nach 96 h Lagerung bei 4 °C (13000fache Vergrößerung)
- II** mit 1.3 mol% Actinioerythroldiacetat **27** (9500fache Vergrößerung)
- III** mit 4.0 mol% *m*-Hydroxyphenyl-Car **48** (28000fache Vergrößerung)
- IV** mit 0.8 mol% *m*-Acetoxyphenyl-Car **49** (9500fache Vergrößerung) (nur elektronenmikroskopischer Vergrößerungsfaktor angegeben)

Abb. 74 IIa/b präsentieren Aufnahmen von DPPC-Proben, die 1.3 mol% Actinioerythroldiacetat **27** enthalten, das in der Membran Aggregate des J-Typs bildet. Auch hier sind unilamellare Strukturen nachweisbar. Die Vesikel sind größer als ebenso präparierte unbeladene DPPC-Liposomen, deren durchschnittlicher Durchmesser unter 300 nm liegt^[104]. In Abb. 74 IIb zeigt sich oben rechts ein überdurchschnittlich großes Lipidvesikel. Carotinoid/Lipid-Verhältnisse über 1 mol% scheinen die Beibehaltung größerer Vesikelstrukturen zu fördern, während reines DPPC sich in Wasser nach Extrusion durch eine gleich große Filterpore zu kleineren Vesikeln organisiert. Auch nach Einlagerung des phenolischen Carotinoids *m*-Hydroxyphenyl-Car **48** zu 4 mol% in die DPPC-Membran beobachtet man unter dem Elektronenmikroskop intakte unilamellare Liposomen, von denen ein Beispiel, 28000fach vergrößert aufgenommen, in Abb. 74 III abgebildet ist. Ein etwas anderes Bild ergeben Vesikelpräparationen, die 0.8 mol% *m*-Acetoxyphenyl-Car **49** enthalten (Abb. 74 IV). Mehrere kleine helle und runde Fragmente sind in der Elektronenmikroskopaufnahme erkennbar. Die Extrusion einer mit **49** versetzten Vesikelsuspension wird dadurch erschwert, dass sich der Polycarbonatfilter schnell mit größeren Carotinoidaggregaten zusetzt. Das hat nicht nur zur Folge, dass nur wenig Carotinoid in die Proben gelangt, sondern auch dass die effektive Porengröße der Polycarbonatmembran abnimmt. Daraus resultiert mit steigender Zahl der Extrusionsdurchgänge eine erhöhte Anzahl von kleinen Lipidvesikeln, die sich unter dem Elektronenmikroskop ebenfalls als helle kreisförmige Strukturen zu erkennen geben.

2.6. Diskussion der Ergebnisse

Die UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen der verschiedenen Carotinoide, die in unilamellare DPPC-Liposomen eingelagert wurden, lassen unterschiedliche Aggregationsmuster erkennen. Grundsätzlich zählen die Carotinoide mit Variation ihrer Endgruppen innerhalb der DPPC-Membran entweder zu den H- oder den J-Aggregatebildnern. Darüber hinaus lassen sich weitere Differenzierungen bezüglich Integrationsfähigkeit in die Lipidmembran und Reversibilität des Aggregationsprozesses vornehmen. Auf diese Gesichtspunkte wird in der folgenden Übersicht näher eingegangen, die zunächst eine Einteilung in der Hinsicht vornimmt, ob die Carotinoide in der Membran H- oder J-Aggregate bilden. Dabei wird der Einfluss von Art und Struktur der Endgruppen auf das Verhalten der Carotinoide in Membransystemen untersucht.

2.6.1. H-Aggregatebildner in der Lipidmembran

Von den untersuchten Carotinoiden zeigen alle Carotinoide mit Hydroxyfunktion in den Endgruppen (6, 7, 9, 26, 48 Abb. 84) grundsätzlich dasselbe Aggregationsverhalten in einer DPPC-Membran.

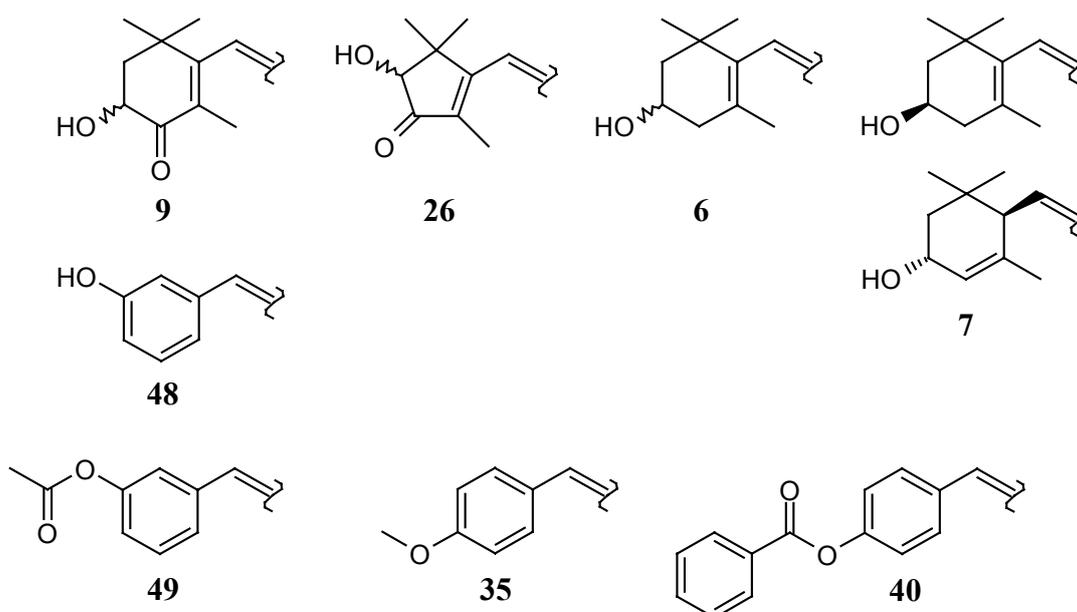


Abb. 84: Endgruppen der Carotinoide mit Neigung zur H-Aggregation in der Membran

Im starren Zustand der Membran bilden sich H-Aggregate aus, die mit steigender Temperatur oberhalb T_m überwiegend in Monomere dissoziieren. Dieser Vorgang ist stets reversibel. Dieses Verhalten legt folgende Schlüsse nahe:

- Die Carotinoidmoleküle sind im hydrophoben Innern der Lipiddoppelschicht lokalisiert und bleiben im gesamten Temperaturbereich von 18 – 58 °C dort eingelagert.
- Die Carotinoidmoleküle sind dazu geneigt, sich im flüssig-kristallinen Zustand der Membran monomer in die Membran zu integrieren.

Bei der verwendeten Präparationstechnik der Liposomen werden die Carotinoide stets in hohen Ausbeuten und erst einmal monomer eingelagert. Erst anschließend kann so in der Lipiddoppelschicht die Aggregation erfolgen. Dies wiederum erlaubt zunächst die spezielle Ausrichtung der Carotinoide in der Lipiddoppelschicht mit ihren Polyketten nahezu senkrecht zur Membranoberfläche, indem ihre endständigen Hydroxygruppen über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylsauerstoffatomen der Fettsäurereste wechselwirken. Wie auch die Lipidmoleküle selbst sind die eingelagerten Carotinoidmoleküle im Zustand hoher Membranfluidität lateral beweglich, während nach Phasenwechsel der Doppelschicht in den geordneten Zustand Aggregation der Carotinoide einsetzt, die nun in der gefestigten Lipidmatrix verankert sind. Bezüglich des Einlagerungsverhaltens in eine DPPC-Membran lassen sich folgende Punkte hervorheben:

- Das Vorhandensein der Hydroxygruppen ist die Voraussetzung für das Erreichen von hohen Einlagerungsverhältnissen der Carotinoide von deutlich über 5 mol%.
- Mit einer flexiblen Hydroxy-Endgruppe sticht Lutein **7** nicht nur durch sein exzellentes Einlagerungsvermögen, sondern auch durch seine Aggregatevielfalt hervor.

Die Einlagerungsraten der Hydroxycarotinoide liegen im Bereich von durchschnittlich 60 – 80 % und sind in zwei Fällen (Actinioerythrol **26**, *m*-Hydroxyphenyl-Car **48**) mit steigender Konzentration sogar zunehmend. Dies untermauert ihr exzellentes Integrationsvermögen in die DPPC-Membran.

Ausschließlich H-Aggregate bilden weiterhin alle untersuchten Carotinoide mit aromatischer Endgruppe (**35**, **40**, **48**, **49** Abb. 84). Die endständigen Phenylringe erzwingen dabei über zusätzliche Dispersionswechselwirkungen die Stapelung der Moleküle in der idealen „card-stacked“-Struktur. Fehlt die freie Hydroxygruppe an den aromatischen Ringen (**35**, **40**, **49** Abb. 84), gehen die Einlagerungsraten der Carotinoide in die DPPC-Doppelschicht auf 30 % zurück. Das maximal erreichte Carotinoid/Lipid-Verhältnis

liegt bei 1 – 2 mol%. Die enormen Einbußen rühren daher, dass die überaus hydrophoben und planaren Carotinoidmoleküle bei Entstehung des Lipidfilms stark zur Bildung von mikrokristallinen Aggregaten neigen, die sich nicht in die Membran integrieren können. Die Bildung solcher Strukturen, deren Absorptionsmaxima weit in den hypsochromen Bereich verschoben sind, sind in Aceton/Wasser-Gemischen mit einem Wassergehalt von über 50 % zu beobachten. Darüber hinaus führt die Abwesenheit der freien Hydroxygruppen dazu, dass sich die Carotinoidmoleküle nur ungern in die Membran einlagern, da keine gerichtete Einlagerung und Stabilisierung über Wasserstoffbrücken ermöglicht wird. Dies verdeutlicht das Verhalten des phenolischen Carotinoide *m*-Hydroxyphenyl-Car **48**, das sich homogen im DPPC-Film verteilt und sich höchstens niedermolekular aggregiert leicht in die Lipiddoppelschicht einlagert, während es im wässrigen System spontan zu größeren mikrokristallinen Assoziaten heranwächst.

Die Reversibilität des Aggregationsvorgangs in der DPPC-Membran ist für alle untersuchten H-Aggregatebildner aus Abb. 84 gesichert. Damit existieren für die angeführten Carotinoide temperaturabhängige Gleichgewichte zwischen ihrer monomeren Form und kleinen Primäraggregaten. In Tab. 16 sind die hypsochromen Verschiebungen der Absorptionsmaxima für die einzelnen Carotinoide nach H-Aggregation in der DPPC-Membran ($T = 18\text{ }^{\circ}\text{C}$) mit zunehmender Wellenzahl aufgelistet. Sie beziehen sich auf die minimal eingesetzte Carotinoidkonzentration (0.13 mmol/l), bei der sich bei 50 °C das reine Monomerspektrum des Carotinoide erkennen lässt. Die energetische Lage der Verschiebungen wird in Abb. 85 veranschaulicht. Ein direkter Vergleich der Verschiebungen ist jedoch mit Vorsicht vorzunehmen, da das beobachtete Aggregatespektrum jeweils die Summe der Absorptionsspektren aller Aggregatespezies ist, die in der Membran mit unterschiedlichem Anteil gebildet werden können. Die Xanthophylle **9** und **26** mit Acyloinendgruppen liefern dabei die am bathochromsten absorbierenden H-Aggregate. Die Auswertung der CD-Spektren von (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin **9a** gibt den Hinweis auf die Anwesenheit von hauptsächlich Dimeren in der Membran, was sich gut mit der kleinsten hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Aggregation deckt. Astaxanthin **9** stellt unter den Hydroxygruppen tragenden Carotinoiden insofern eine Ausnahme dar, da es bei höheren Konzentrationen zur Bildung von größeren Aggregaten neigt, die sich schlecht in die Membran integrieren und zudem J-Strukturen sind. Bei Übergang zu Actinioerythrol **26** bewirkt die erhöhte Planarität des Moleküls einerseits durch die größere Annäherung der Moleküle im Aggregat einen Beitrag zur

hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, andererseits eine dennoch langwelligere Lage desselben. Die H-Aggregate von Zeaxanthin **6** und Lutein **7** in der DPPC-Membran zeichnen sich durch ähnliche und schmal strukturierte Absorptionsbanden um 400 nm aus. Die fehlende Konjugation einer endständigen Doppelbindung bei **7** hat nur untergeordnete Bedeutung für die Kopplung der Excitonen.

Carotinoid	$\Delta\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$
Astaxanthin 9	2070
Actinioerythrol 26	2600
Lutein 7	3000
Zeaxanthin 6	3210
<i>m</i> -Hydroxyphenyl-Car 48	3440
<i>p</i> -Benzoyloxyphenyl-Car 40	4340
<i>m</i> -Acetoxyphenyl-Car 49	4920
<i>p</i> -Methoxyphenyl-Car 35	4920

Tab. 16: Verschiebungen der Absorptionsmaxima einzelner Carotinoide ($EV \approx 1-2 \text{ mol}\%$) in der Membran unilamellarer DPPC-Liposomen bei H-Aggregation

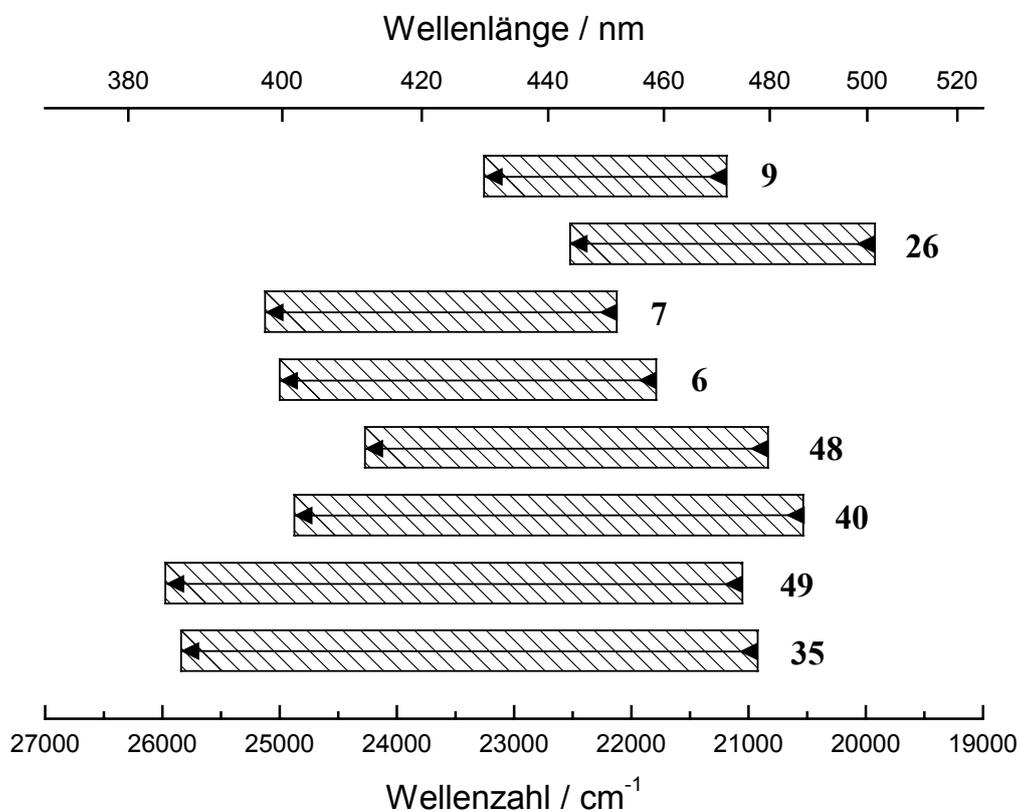


Abb. 85: Graphische Darstellung der Lage der hypsochromen Verschiebungen aus Tab. 16

Für **6** und **7** lassen sich also Primäraggregate mit vergleichbarem Assoziationsgrad im geordneten Zustand einer Lipidmembran formulieren. Die Interpretation der CD-Spektren von Lutein **7** in den unilamellaren Liposomen lassen auf temperaturabhängige Gleichgewichte zwischen ihren Primäraggregaten bei tiefen Temperaturen bis hin zu den Monomeren im fluiden Membranzustand bei hohen Temperaturen schließen (Abb. 86 A). Die Dissoziation der Aggregate wird von einer Umstrukturierung begleitet. Dabei geht die von den einzelnen Chromophoren gebildete helicale Anordnung bei Auflösung von einer linksgängigen Schraube in eine rechtsgängige über. Die Existenz unterschiedlicher, stabiler Aggregategeometrien bei **7** lässt sich über die freie Drehbarkeit um die Einfachbindung C6'-C7' erklären. Durch Rotation um C6'-C7' sind verschiedene Orientierungen einer Hydroxygruppe möglich, die durch Wasserstoffbrückenbindung zum benachbarten Carotinoidmolekül Einfluss auf die Helizität des H-Aggregats nehmen kann. Weiterhin kann die Flexibilität der einen Endgruppe von **7** als Erklärung für die im Schnitt höchsten Einlagerungsraten ($CV > 80\%$) in die unilamellaren Liposomen herhalten, da zusätzliche Wechselwirkungen der Hydroxygruppen mit nur einer polaren Zone der Doppelschicht möglich werden. Die Luteinmoleküle können sich so auch parallel zur Membranoberfläche orientieren. Im Wässrigen beschreibt die über 10fache Intensität der CD-Effekte ($\Delta\epsilon$) von **7** verbunden mit Hypsochromie das Wachstum zu supramolekularen, helicalen Columnarstrukturen mit linkszirkularer Konfiguration. Diese Strukturen lassen sich durch weitere Aggregation der in einer starren Lipidmembran isoliert auftretenden Primäraggregate beschreiben (Abb. 86 B).

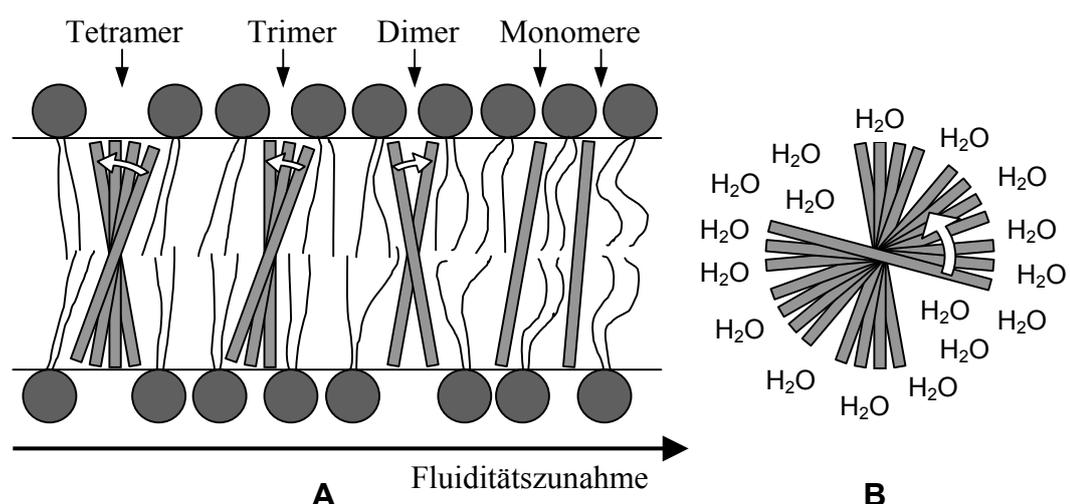


Abb. 86: **A** Schematische Darstellung von Lutein **7** und seinen möglichen Primäraggregaten (Tetra-, Tri- und Dimer) innerhalb einer Lipiddoppelschicht
B modellhafter Ausschnitt aus der supramolekularen Aggregatestruktur von Lutein **7** in wässrigem Medium

Die aromatischen Carotinoide zeigen bei H-Aggregation in der DPPC-Doppelschicht die kurzweiligsten Verschiebungen des Absorptionsmaximums (Tab. 16). Unter der Voraussetzung, dass ähnliche Größenverteilungen der Aggregate in der Membran bestehen, deutet dies auf dicht gepackte Aggregate mit „card-stacked“-Struktur hin (vgl. Gl. 1: kleiner Abstand $r_{i,j} \Rightarrow$ großer *Davydov*-Split). Die verstärkte Annäherung der Moleküle lässt sich in erster Linie auf ihre hohe Planarität zurückführen, durch die die van-der-Waals-Attraktion zunimmt. Insbesondere bei den Carotinoiden **35**, **40** und **49** ohne freie Hydroxygruppen wirken ausschließlich Dispersionskräfte, unterstützt durch die sandwichartige Stapelung der Benzolringe. Wie ein Vergleich der Carotinoide **35** und **49** zeigt (Abb. 85), ist zudem die (*E*)- oder (*Z*)-Konfiguration der Doppelbindung an C-7 bzw. C-7' für das dicht gestapelte Aggregat eher unbedeutend, was die gleichartige Lage und Verschiebung der einzelnen Absorptionsmaxima beweist.

2.6.2. J-Aggregatebildner in der Lipidmembran

Wird unter den nicht aromatischen Xanthophyllen die Hydroxyfunktion durch Derivatisierung blockiert oder fehlt sie ganz, wird ausschließlich J-Aggregation in der DPPC-Membran beobachtet. Prinzipiell gelingt es nicht, höhere Carotinoidmengen in die Liposomen einzulagern. Carotinoid/Lipid-Verhältnisse von 5 mol% sind nur schwer zu erreichen. Es kommt dann eher zur Ausbildung von großen mikrokristallinen Carotinoidassoziaten, die sich nicht mehr in die Membran integrieren können. Die gebildeten J-Aggregate verhalten sich jedoch nicht alle gleich, wenn die Phasenübergangstemperatur T_m des Lipids überschritten wird. Die J-Aggregate von Astaxanthindiacetat **19** und Actinioerythroldiacetat **27** reagieren als einzige auf die Änderung des Ordnungszustandes der Fettsäureketten in der DPPC-Membran und dissoziieren in Monomere, die sich nach Abkühlung unter T_m wieder zu J-Aggregaten formieren. Der Aggregationsprozess aller anderen Carotinoide aus Abb. 87 in der Liposomensuspension ist dagegen irreversibel. Selbst im Zustand hoher Membranfluidität bleiben die Aggregatespektren erhalten. Für **19** und **27** beweist die Reversibilität des Aggregationsvorgangs, dass die gebildeten Primäraggregate im Inneren der DPPC-Doppelschicht lokalisiert sind. Die Einzelmoleküle sind in den Aggregaten verstärkt gegeneinander verschoben, da keine zusätzlich stabilisierenden Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen) über die Endgruppen möglich sind.

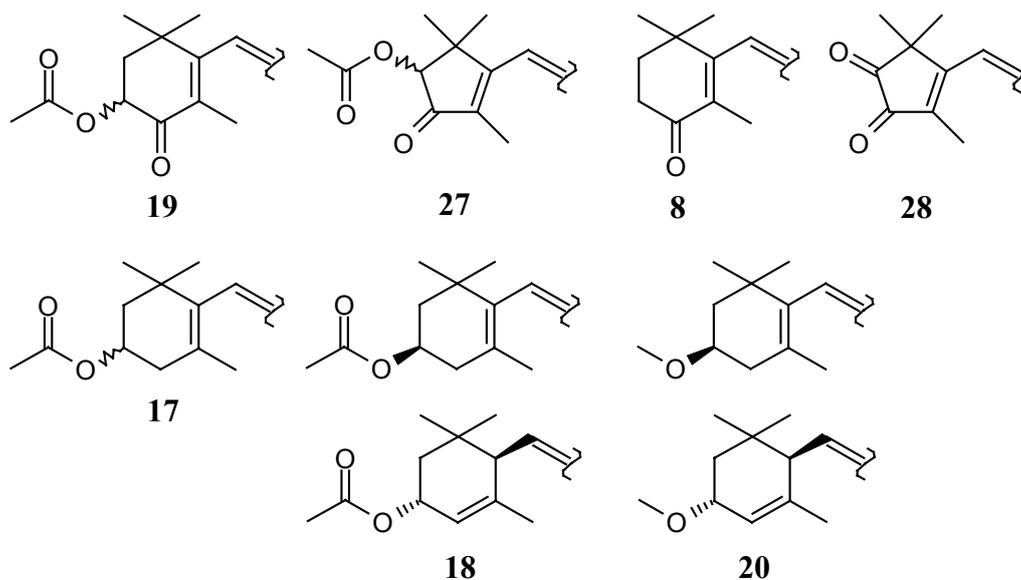


Abb. 87: Endgruppen der Carotinoide mit Neigung zur J-Aggregation in der Membran

Es kommt allein die van-der-Waals-Anziehung der Moleküle zum Tragen. Demgegenüber entstehen im Wässrigen hochmolekulare Aggregate, die vor allem beim planarer gebauten Carotinoid **27** dicht gepackte, gelborange H-Aggregate mit möglichst kleiner Oberfläche darstellen. Die DPPC-Membran dagegen schließt extinktionsstarke, violette J-Strukturen von **27** ein.

Die Ketocarotinoide **8** und **28** liegen in der DPPC-Doppelschicht nicht monomer vor, sondern bilden irreversibel J-Aggregate mit breiter Absorptionsbande, was auf ihr Unvermögen, eine einheitliche Aggregatestruktur zu stabilisieren, hinweist. Speziell bei **28** kristallisiert das schwerlösliche Carotinoid bei Bildung des Carotinoid/Lipidfilms zügig aus und nur die wenigen kleinen Kristallite finden sich in den präparierten Liposomen wieder. Ähnliches Verhalten wird auch bei β -Carotin **3** beobachtet, das in MLV im flüssig-kristallinen Membranzustand unter Ausbildung breiter Absorptionsbanden aggregiert bleibt^[141,143]. Eine Einführung von ausschließlich Ketogruppen in die Carotinoidendgruppen bewirkt grundsätzlich keine Änderung des Aggregationsmusters, das jeweils durch die schnelle Agglomeration der Einzelmoleküle bestimmt wird.

Die J-Aggregate von **17**, **18** und **20** im Liposomensystem sind ebenfalls stabile Strukturen und können nicht in Monomere zerfallen. Auffällig ist jedoch die Ähnlichkeit ihrer gemessenen Absorptionsspektren, die klar strukturiert sind. Der bathochromsten Absorption über 500 nm folgen zur kurzwelligeren Seite hin zwei weitere Absorptionsmaxima mit abschließender Schulter um 420 nm. Die zugehörigen CD-

Spektren beim acetylierten bzw. methylierten Lutein **18** bzw. **20** sind ebenfalls nahezu identisch und lassen auf eine rechtsgängige helicale Chiralität zwischen den koppelnden Chromophoren im Aggregat schließen. Für **18** sind Aggregatestrukturen ähnlich denen eines nematischen Flüssigkristalls mit fadenförmiger Morphologie beschrieben, die einen Durchmesser von 80–180 nm haben^[60]. Das intensive positive CD-Couplet wird dabei durch eine Rechtsdrehung der nematischen Schichten mit ihren darin ausgerichteten chiralen Carotinoidmolekülen, die zwischenmolekulare Wechselwirkungen zwischen den Schichten verursachen, hervorgerufen (Abb. 88). Die Struktur der Absorptionsbande im sichtbaren Bereich weist darauf hin, dass die Moleküle nicht mehr in engem Kontakt stehen, sondern wie in einer nematischen Schicht einen lockeren Verbund bilden. Daraus ergibt sich, dass der Resonanz-Energietransfer langsamer und vibronisch gekoppelt ist^[60]. Diese Strukturen werden bei Präparation des Carotinoid/Lipidfilms spontan und irreversibel gebildet, von denen sich diejenigen nach der Extrusion in der Liposomen-suspension wiederfinden, die durch die Filtermembran passen. Die Ausschaltung der Hydroxygruppen wie in den Fällen **17**, **18** und **20** verwirklicht führt nicht nur zu einem grundlegend anderem Aggregationsverhalten, sondern die Carotinoide sind in einer Lipidmembran auch nicht mehr direkt monomer verfügbar, sobald sie in ihrem stark gefestigten Verbund aggregiert sind.

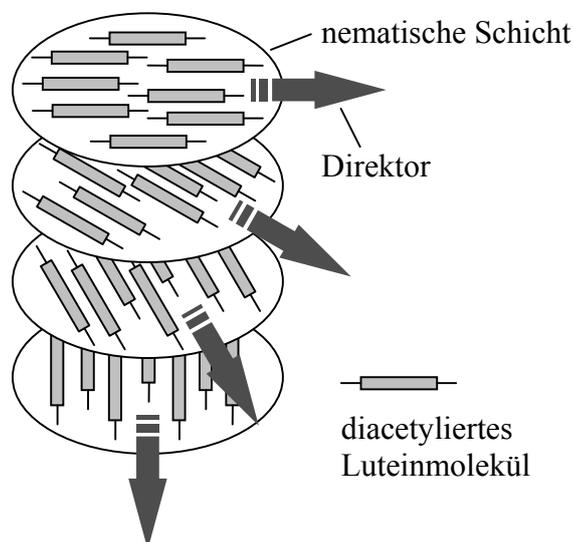


Abb. 88: Modell für das Aggregationsmuster von Luteindiaceat **18** als Arrangement von chiral verdrillten nematischen Schichten

2.6.3. Funktionelle Bedeutung der Hydroxycarotinoide *in vivo*

Wie festgestellt wurde, kommt der Anwesenheit von freien Hydroxygruppen an den Carotinoidendgruppen für die Integration der Carotinoide in eine Lipidmembran eine besondere Bedeutung zu. Die Hydroxygruppen fördern die Einlagerung der Carotinoide in die Lipiddoppelschicht, ihr Fehlen dagegen korreliert mit einer deutlichen Abnahme des Einlagerungsvermögens. Durch die Hydroxygruppen wird die Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht (Abb. 89). Als Akzeptoren der Wasserstoffbrücken fungieren die Estercarbonylgruppen der Phosphatidylcholinmoleküle. Schon beim Cholesterol wurde unterstützt durch NMR-Experimente die Wechselwirkung der Hydroxygruppe sowohl mit der Trimethylammoniumregion als auch mit der Phosphatgruppe des Lecithinmoleküls in der äußeren Zone der Doppelschicht ausgeschlossen^[157]. Entsprechendes gilt für die Hydroxycarotinoide. Die Lokalisation der Hydroxygruppen in der Grenzfläche zwischen der polaren und unpolaren Zone der Membran ist energetisch begünstigt, da so der Kontakt des hydrophoben Carotinoidgerüsts mit der polaren wässrigen Phase reduziert wird. Die Regulation der Permeabilität biologischer Membranen über Wasserstoffbrücken in dieser Zwischenregion wird diskutiert^[158]. In reinen Lipidvesikeln binden Wassermoleküle, gegebenenfalls im Austausch mit Kationen oder anderen H-Brücken-Donatoren aus der wässrigen Phase, an die Carbonylgruppen. Diese derart gebundenen Teilchen können leicht in die Doppelschicht gelangen und sie durchdringen. Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxygruppen der in der Membran verankerten Carotinoid- oder auch Cholesterinmoleküle

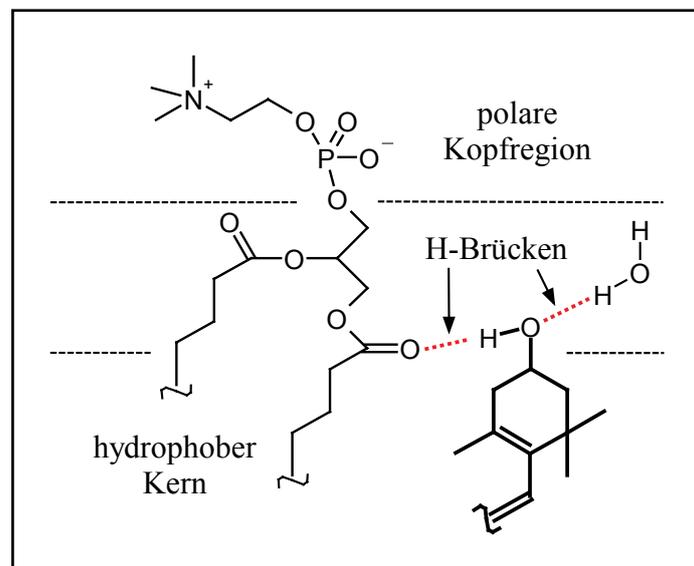


Abb. 89: Vermutete Bindungsverhältnisse eines eingelagerten Hydroxycarotinoidmoleküls (**fett**) in der Grenzzone zwischen polarer und unpolare Region einer PC-Membran

dehydratisieren und blockieren die Carbonylgruppen (Abb. 89). Die nicht freiwillig ablaufende Dehydratisierung ($\Delta G > 0$) wird dadurch ermöglicht, dass die neu gebundenen Hydroxygruppen weitere Bindungsstellen für Wassermoleküle, jedoch nun weiter entfernt vom hydrophoben Membraninneren, darstellen^[158]. Dihydroxycarotinoide mit einer der Membrandicke entsprechenden Länge durchspannen so die Doppelschicht und festigen die Membranstruktur. Wie in dieser Arbeit bewiesen, sind sie weiterhin durch reversible Selbstorganisation zur Ausbildung von H-Primäraggregaten befähigt. (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin **6a** und Lutein **7** als Vertreter dieser Carotinoide sind im menschlichen Körper in der Netzhaut des Auges, genauer im Bereich der Macula angereichert. Dort bedeutet eine hohe Dichte der gelben Pigmente einen effizienten photochemischen Schutz vor energiereicher Strahlung. Die Mobilisierung der einzelnen Moleküle ermöglicht dabei wohl eine spezifische Verteilung in der Macula mit Entfaltung einer optimalen protektiven Wirkung. Im Gegensatz dazu führt die Ablagerung des Ketocarotinoids Canthaxanthin **8** in der Netzhaut zur irreversiblen Bildung störender Kristalle. Wie auch bei den in der DPPC-Membran gefundenen J-artigen Aggregaten von **8** wird keine Dissoziation in Monomere ermöglicht. Die Moleküle bleiben aggregiert, in der Retina eventuell mit Beteiligung von Membranproteinen, und können sich nicht unabhängig voneinander umordnen, da keine Vermittlung über Wechselwirkung mit den Membranbausteinen erfolgt. Ein stetes Wachstum der Aggregate bei Aufnahme von weiterem Canthaxanthin ist die Folge.

Für die Farbe vieler gelb-oranger Blumen sind Carotinoide verantwortlich, die in bestimmten Zellorganellen, den Chromoplasten, akkumuliert sind. Diese Carotinoide sind Xanthophylle, deren Hydroxygruppen mit Fettsäuren verestert sind. Die Blockierung der Hydroxygruppen erweist sich hier als Notwendigkeit, stabile supramolekulare Carotinoideaggregate ausbilden zu können, wie im vorigen Kapitel u. a. für die Luteinderivate **18** und **20** im Phospholipid/Wasser-System beschrieben. Es ist möglich, dass solche in tubulären Chromoplasten beobachteten chiralen Carotinoide-Substrukturen die Funktion haben, bestimmte Insektenarten, die polarisiertes Licht wahrnehmen können, für die Befruchtung anzulocken^[61]. In den Chloroplasten hingegen sind die Xanthophylle in der Regel nicht verestert. Dort fungieren sie als Lichtsammler und Singulett-Sauerstoffquencher bei der Photosynthese und erfordern eine spezielle Ausrichtung im Chlorophyll-Proteinkomplex. Der bedeutende Einfluss von freien Hydroxygruppen für die Organisation der Carotinoide in zellulären Systemen und für ihre damit verbundene Funktion wird hier deutlich.

3. Zusammenfassung

Carotinoide übernehmen viele Funktionen in lebenden Zellen. In Biomembranen sind sie einerseits als physiologisch aktive Pigmente funktionell an Membranproteine gebunden, andererseits befindet sich ein Pool der Carotinoide direkt in der Lipidphase der Membran. Dort können sie nicht nur voneinander isoliert, sondern auch unter Änderung ihrer optischen Eigenschaften aggregiert vorliegen. Die spektroskopische Identifizierung solcher niedermolekularen Carotinoidaggregate, die sich in einer Lipidmembran durch Selbstorganisation bilden, war Schwerpunkt dieser Arbeit. Eine Beschränkung auf polare Carotinoide mit einer der Membrandicke entsprechenden Länge war aufgrund der gewählten Präparationsmethode nötig, da nur dann ein für die Untersuchungen ausreichender Einbau der Carotinoide in die Lipidmembran erreicht werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 15 Carotinoide auf ihr Einlagerungs- und Aggregationsverhalten in Membranen untersucht. Die Auswahl der Carotinoide umfasste natürlich vorkommende symmetrische Xanthophylle mit Cyclopentenyl- und Cyclohexenylendgruppen und aromatische Carotinoide. Drei von den aromatischen Carotinoiden sind in der Literatur noch nicht beschrieben und wurden erstmals dargestellt. Als Substituenten der Endgruppen wurden Carbonyl- sowie freie und geschützte Hydroxyfunktionen variiert.

Als Modellsystem für die UV/VIS- und CD-spektroskopischen Untersuchungen dienten unilamellare DPPC-Liposomen, die mittels Extrusionstechnik präpariert wurden. Ihre unilamellare Struktur konnte stichprobenartig durch Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Für die verschiedenen Carotinoide wurden die durchschnittlichen Einlagerungsraten mit ansteigender Carotinoidkonzentration und die tatsächlichen Carotinoid/Lipid-Verhältnisse in den Präparationen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass hohe Beladungen der Liposomen mit Carotinoiden (bis über 10 mol%) an das Vorhandensein von freien Hydroxygruppen an den Carotinoidendgruppen gekoppelt ist. Die Dihydroxycarotinoide durchspannen aller Wahrscheinlichkeit nach unter Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen die Lipidmembran und bauen sich daher äußerst gut ein.

Die Ergebnisse der temperaturabhängigen UV/VIS-Spektroskopie lassen folgende Aussagen zur Carotinoïdagggregation in der Lipidmembran zu:

- Im Gelzustand der Membran liegen alle untersuchten Carotinoïde hinsichtlich einer Carotinoïdbelastung von ≥ 1 mol% überwiegend aggregiert vor.
- Sowohl die Xanthophylle mit freien Hydroxygruppen als auch die aromatischen Carotinoïde bilden ausschließlich H-Aggregate. Letztere sind aufgrund erhöhter Planarität dichter im Verbund gepackt. Die Stabilisierung dieser „card-stacked“-Strukturen kann über Wechselwirkungen der Endgruppen untereinander erfolgen (H-Brücken bzw. Dispersionskräfte der Benzolringe). Bei Wechsel der Membran in den flüssig-kristallinen Zustand dissoziieren die H-Aggregate in Monomere. Der Aggregationsprozess in der Membran ist stets reversibel.
- Nicht aromatische Carotinoïde ohne freie Hydroxygruppen, d. h. Systeme, die entweder keine Hydroxygruppen besitzen oder in denen die Hydroxygruppen durch Methylierung oder Acylierung geschützt wurden, organisieren sich zu J-Aggregaten. Nur für die Carotinoïde **19** und **27** mit acetylierten Acyloinfunktionen ist die J-Aggregation noch reversibel. In den anderen Fällen bleiben die Moleküle auch in der hoch fluiden Phase der Lipiddoppelschicht irreversibel aggregiert.

Anhand CD-spektroskopischer Messungen wurden die membrangebundenen Assoziate von (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin **9a** und Lutein **7** eindeutig als niedermolekulare Primäraggregate identifiziert. Lutein **7** beschreibt dabei temperaturabhängige Gleichgewichte zwischen Aggregaten wechselnder Helizität und den Monomeren.

Generell konnten für alle reversibel in der Membran gebildeten Aggregate die spektroskopischen Unterschiede zu den in der wässrigen Phase gebildeten supramolekularen Aggregatestrukturen herausgestellt werden. Für die sowohl im Wässrigen als auch in den Liposomen irreversibel gebildeten J-Strukturen der Xanthophylle **17**, **18** und **20** mit geschützten Hydroxygruppen werden stabile nematische Aggregatzustände angenommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neue Erkenntnisse zur Primäragggregation von Carotinoïden in biologischen Membranen gewonnen wurden. Die Existenz solcher Primäraggregate wurde spektroskopisch belegt und unter strukturellen Aspekten beleuchtet. Diese Ergebnisse führen zu Informationen über die Carotinoïdorganisation *in vivo* und geben damit Hinweise auf ihre funktionelle Bedeutung.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeines

Folgende Geräte und Materialien wurden bei der Präparation und Analyse der Liposomen, Durchführung der Versuche und zur Isolierung und Charakterisierung der Produkte verwendet:

Extrusion:	Liposo Fast, Avestin Europe GmbH, Mannheim Polycarbonatmembranfilter, \varnothing (Pore) = 400 nm Nylonnetz (mesh 40) mit Dichtungsringen, 2 Spritzen, 0.5 ml, Hamilton, #1750 TLL ohne Kolbenstopp
HPLC-Analytik:	Pumpe: Hewlett Packard Chemstation 1050 Detektor: Hewlett Packard 1040M Series II HPLC-DAD-Detector-System Probenaufgabe: 10 μ l Probenschleife Säule: YMC SIL-ASP, 150x6 mm, S-5 μ M, 60 Å Laufmittel: Hexan/Isopropanol = 99:1, Flussrate: 2 ml/min
Elektronenmikroskopie:	Philips EM 400, Berlin <i>und</i> Zeiss EM9 2S, Göttingen Kupferdrahtnetzchen (mesh 400, Plano, Wetzlar), mit Formvar beschichtet Negativfärbung: 1%ige Phosphorwolframsäure (pH-Wert = 6.5)
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex Transistor, Berlin
Enzymatischer Farbttest:	Phospholipids B, Wako Chemicals GmbH, Neuss
Schmelzpunkte (unkorregiert):	Thermovar, Fa. Reichert, Wien

Dünnschichtchromatographie:	DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 mit UV-Indikator F ₂₅₄ , Fa. Merck
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60 (Merck), Korngröße 0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM Säulenmaße: Ø = 5 cm, Länge: 30 cm
¹ H-NMR-Spektroskopie:	300 MHz Varian VXR 300
¹³ C- ¹ H-NMR-Spektroskopie:	75 MHz Varian VXR 300
³¹ P- ¹ H-NMR-Spektroskopie:	200 MHz Bruker AM 200
IR-Spektroskopie:	Bruker Vector 22
UV/VIS-Spektroskopie:	Perkin Elmer UV/VIS/NIR Spektrometer, Lambda 19 Thermostat: Julabo Paratherm U2 electronic, Seelbach
CD-Spektroskopie:	Jasco J-600 Spectropolarimeter
Massenspektrometrie:	Varian MAT 311 A, Ionisierungsenergie: 70 eV
Elementaranalysen:	Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die nachstehenden Chemikalien wurden von folgenden Firmen und Personen bezogen bzw. zur Verfügung gestellt:

L-DMPC / L-, DL-DPPC:	Sigma Chemie
Lutein ((3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)- β , ϵ -Carotin-3,3'-diol) 7 :	BASF AG, Ludwigshafen
Canthaxanthin (β , β -Carotin-4,4'-dion) 8 :	BASF AG, Ludwigshafen
Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion) 9 :	BASF AG, Ludwigshafen
(3 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-Astaxanthin 9a :	bereitgestellt von C. Köpsel ^[105]
Zeaxanthin-Phosphoniumsalz 15 :	BASF AG, Ludwigshafen
C ₁₀ -Dialdehyd 16 :	BASF AG, Ludwigshafen
C ₂₀ -Dialdehyd 34 :	BASF AG, Ludwigshafen

4.2. Präparation und Charakterisierung der Liposomen

4.2.1. Versuchsbeschreibungen

Alle hier verwendeten Lösemittel hatten mindestens p. a. Qualität. THF wurde zur Entfernung des Stabilisators zusätzlich destilliert. Die Carotinoidarbeitslösungen wurden höchstens bis zu 48 h bei 4 °C dunkel gelagert. Für die Herstellung der Pufferlösung wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

4.2.1.1. Präparation der unbeladenen Vesikel

In einem 100 ml Einhalskolben werden 10.0 mg (0.0136 mmol) DPPC in 2 – 3 ml Chloroform gelöst. Anschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer zügig entfernt, so dass sich ein dünner Lipidfilm an der Kolbeninnenwand bildet. Man lässt noch 5 min bei 15 mbar evaporieren, gibt dann 2 ml einer 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Pufferlösung (pH-Wert = 6.5, mit KOH eingestellt) hinzu und erwärmt sie unter ständigem Schwenken im Wasserbad über die Phasenübergangstemperatur (hier $T_m = 41\text{ °C}$) des Lipids, bis sich der trübe Lipidfilm vollständig von der Kolbenwand gelöst hat. Die entstandene Suspension wird nun im verschlossenen Kolben 30 min mit Ultraschall behandelt, wobei die Temperatur des Ultraschallbads von 20 °C auf 35 °C ansteigt. Es bilden sich hauptsächlich multilamellare Vesikel unterschiedlicher Größe. Um unilamellare Liposomen einheitlicher Größe zu erhalten, wird die Lipidsuspension extrudiert (Kap. 4.2.1.3.).

4.2.1.2. Präparation der mit Carotinoiden beladenen Vesikel

In einem 100 ml Einhalskolben werden 10.0 mg (0.0136 mmol) DPPC in 2-3 ml Chloroform gelöst. Zu dieser Lösung wird nun ein bestimmtes Volumen der entsprechenden Carotinoidarbeitslösung zugesetzt, damit das Carotinoid in der angestrebten Endkonzentration in der Suspension vorliegt (am Beispiel des Astaxanthins: Zugabe von 100 µl einer 2.6 mM Lösung in THF → Astaxanthin-End-

konzentration in der Suspension $c = 0.13 \text{ mM}$). Für die Carotinoidlösungen wurden jeweils folgende Lösemittel verwendet:

Carotinoid	Lösemittel
Zeaxanthin 6 , Lutein 7 , Canthaxanthin 8 , Astaxanthin 9 , Zeaxanthindiacetat 17 , Luteindiacetat 18 , Luteindimethylether 20	THF
Astaxanthindiacetat 19 , Actinioerythrol 26 , Actinioerythrodiiacetat 27 , Violerythrin 28 , <i>p</i> -Methoxyphenyl-Car 35 , <i>p</i> -Benzoyloxyphenyl-Car 40 , <i>m</i> -Acetoxyphenyl-Car 49	Dichlormethan
<i>m</i> -Hydroxyphenyl-Car 48	Aceton

Tab. 17: verwendete Lösemittel für die verschiedenen Carotinoide

Die weitere Vorgehensweise entspricht der bei der Präparation ohne Carotinoide. Je nach Art und Konzentration des Carotinoids lässt sich der nach Evaporation des Lösemittels farbige Lipidfilm nur schwer vollständig von der Kolbenwand lösen, so dass durch Rühren mit einem Rührfisch nachgeholfen werden muß (gibt schon einen Hinweis auf vorzeitige Aggregation des Carotinoids).

4.2.1.3. Extrusion

Die beiden Teflonzylinder mit Dichtungsring und Nylonnetz werden mit dazwischenliegendem Membranfilter (Porendurchmesser 400 nm) im Stahlgehäuse zusammengeschaubt, eine Spritze aufgesetzt und 300 – 400 µl Vesikelsuspension mit der anderen Spritze aufgezogen. Man hat darauf zu achten, dass keine Luft und kein Schaum in die Spritze gelangt. Nach Aufsetzen der zweiten Spritze an die Extrusionsapparatur extrudiert man das aufgezogene Spritzenvolumen 15 mal, wobei man unilamellare Vesikel mit einer typischen Größe von 400 nm Durchmesser erhält. Vor der Extrusion jeder Probe wird der Membranfilter erneuert. Falls ein Filter während des Extrusionsvorgangs reißt (spürbar durch plötzlichen Widerstandsverlust beim Drücken), wird die bereits extrudierte Suspension verworfen. Die Suspensionen werden anschließend in Eppendorfgefäßen höchstens 72 h bei 4 °C dunkel gelagert, bis sie vermessen und analysiert werden.

4.2.1.4. Farbtest zur Bestimmung der Lipidkonzentration

Die zu vermessenden Proben enthalten DPPC in einer Einwaage-Konzentration von 6.81 mmol/l, bei der der Farbtest noch im linearen Bereich ist. Zur Messung werden 20 µl der Lipidsuspension bzw. der Cholinchlorid-Standardlösung in eine Küvette pipettiert (Schichtdicke 1 cm) und 2.3 ml der Farbreagenzlösung (vgl. Kap. 2.2.5.2.) hinzugegeben. Die Inkubationszeit beträgt bei RT ca. 30 min. Der gebildete Farbstoff ist daraufhin 2 h stabil. In eine weitere Küvette wird lediglich die Farbreagenzlösung pipettiert, die als Referenz gilt. Bei einer Absorptionswellenlänge von $\lambda_{\max} = 505$ nm werden nun die Absorbanzen der Standardlösung (A_{St}) und der jeweiligen Proben (A_P) gegen die Referenz bestimmt, mit denen dann die einzelnen DPPC-Konzentrationen (c_P) der Proben berechnet werden (siehe Gl. 8). Die Konzentration des Standards (c_{St}) beträgt 3.87 mmol/l.

$$\text{DPPC - Konzentration } c_P [\text{mmol/l}] = A_P \cdot \frac{c_{St} [\text{mmol/l}]}{A_{St}} = 3.87 \cdot \frac{A_P}{A_{St}} \quad \text{Gl. 8}$$

Enthält die zu untersuchende Probe Astaxanthin, so verfälscht die zusätzliche Absorbanz des Carotinoids bei 505 nm das Ergebnis und es muss korrigiert werden. Dafür wird ein UV/VIS Spektrum einer Probe ohne Carotinoid im Bereich von 250 – 700 nm aufgenommen und an das Spektrum von der Probe mit Carotinoid im Bereich von 650 – 750 nm angepasst (in diesem Wellenlängenintervall absorbiert das Carotinoid nicht). Als Differenzspektrum erhält man dann das Spektrum des Carotinoids allein, aus dem dann der Beitrag des Astaxanthins zur Absorbanz der Probe bei 505 nm berechnet werden kann.

4.2.1.5. Bestimmung der Carotinoidkonzentration in den Liposomen

Die Bestimmung der Astaxanthinkonzentration erfolgte mittels der HPLC (UV/VIS-spektroskopisch mit einem DAD) nach Erstellen einer Eichgeraden, während die restlichen Carotinoide quantitativ mithilfe der UV/VIS-Spektroskopie über ihre Extinktionskoeffizienten bestimmt wurden.

4.2.1.5.1. HPLC (mit DAD)-Methode

Zunächst wird für Astaxanthin eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe später die Konzentrationen der Proben berechnet werden können. Dafür wird eine Verdünnungsreihe in Dichlormethan mit fünf Konzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ bis $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l angesetzt. Von jeder Verdünnung werden 300 μ l in ein Reagenzglas mit Schliff pipettiert und jeweils mit 150 μ l des internen Anthracen-Standards ($c_{St} = 1.92$ mmol/l in Hexan/Dichlormethan = 4:1) und 700 μ l Hexan/Dichlormethan = 4:1 versetzt. Anschließend werden 10 μ l (Probenschleife) in die HPLC-Apparatur injiziert und die Signale bei 357 nm (Anthracen) und 470 nm (Astaxanthin) detektiert und integriert. Eine Gerade ergibt sich nach Vermessen aller fünf Lösungen durch Auftragung von Peakflächenverhältnis ($F_{Asta}/F_{Standard}$) gegen Konzentration und anschließender linearer Regression (Ursprungsgerade).

Für die Vermessung der präparierten Vesikelsuspensionen werden jeweils 300 μ l in ein Reagenzglas mit Schliff abpipettiert. Man gibt 150 μ l des internen Standards und 1 ml Hexan/Dichlormethan = 4:1 als Extraktionsmittel hinzu und schüttelt das verschlossene Reagenzglas 7 – 10 min im Vortex, bis sich das Carotinoid vollständig in der organischen Phase befindet. Von dieser werden nun 10 μ l in die HPLC-Apparatur injiziert und aus dem erhaltenen Chromatogramm wie oben das Peakflächenverhältnis bestimmt, aus dem dann mithilfe der Eichgerade die Astaxanthinkonzentration berechnet werden kann.

4.2.1.5.2. UV/VIS-Methode

Von der präparierten Vesikelsuspension werden 60 μ l (V_{Sus}) abpipettiert und mit 3 ml Ethanol versetzt. Die Liposomen werden so zerstört und das Carotinoid geht in Lösung. Bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Carotinoids wird die Absorbanz (A_{Car}) gegen Ethanol als Referenz gemessen, aus der sich unter Ausnutzung des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetzes (siehe Gl. 9) und Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Carotinoidkonzentration (c_{Car}) in der Probe bestimmen lässt (siehe Gl. 10). Die benötigten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Carotinoide in Ethanol werden vorher experimentell bestimmt (Tab. 2, Seite 49). Die Schichtdicke der Küvette ist immer 1 cm.

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 9}$$

I_0 = Intensität des eintretenden Lichtstrahls

I = Intensität des austretenden Lichtstrahls

ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

c = Konzentration in [mol/l]

d = Schichtdicke in [cm]

$$c_{Car} [\text{mol/l}] = \frac{A_{Car}}{\varepsilon_{Car} \cdot d} \cdot \frac{V_{Ethanol} + V_{Sus}}{V_{Sus}} = \frac{A_{Car}}{\varepsilon_{Car}} \cdot \frac{3060}{60} \quad \text{Gl. 10}$$

Von jeder Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Im Fall des Luteindiacetats **18** werden nur 30 μl der Vesikelsuspension abpipettiert, da die Löslichkeit dieses Carotinoids in Ethanol sehr gering ist. Der Verdünnungsfaktor wird entsprechend korrigiert.

4.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Damen und Herren, die einen wichtigen Beitrag zur Anfertigung dieser Dissertation leisteten, meinen Dank aussprechen.

Frau M. Beuer und Herrn P. Behm danke ich für die Durchführung zahlreicher, zuweilen auch langwieriger NMR-Messungen. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau I. Menzel für die Aufnahme der IR- und einzelner UV/VIS-Spektren und für das häufige Überlassen der UV/VIS-Messanlage für eigene Messungen. Außerdem danke ich Dr. P. Tommes und Herrn R. Bürgel für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn E. Schönstein danke ich für die zügige Bereitstellung von Glas- und Laborgeräten, insbesondere von zahlreichen Softtüchern, und für das Überlassen der wohl noch einzigen in diesem Institut vorhandenen Argonbombe.

Herrn Dr. Johannes Schmitz danke ich für die Einführung in die Präparationstechnik für die unilamellaren Liposomen. Frau Andrea Borchardt aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Stahl verdanke ich die Probenvorbereitung bei der Elektronenmikroskopie, Herrn Dr. R. Riehl aus dem Institut für Zoomorphologie die Aufnahme und Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Herrn Dr. J. Paust und Herrn Dr. H. Ernst, BASF AG Ludwigshafen, danke ich für die Bereitstellung der Carotinoide **7**, **8** und **9** und der Synthesebausteine **15**, **16** und **34**.

Weiterer Dank geht an Herrn Dr. B. Mayer für seine Diskussionsbereitschaft hinsichtlich Analyse der CD-Spektren und an Herrn Privatdozent Dr. Klaus Schaper für sein stets offenes Ohr bezüglich all meinen Fragen und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Pavlos Kolsouzidis danke ich für die wertvollen Ratschläge bei den Carotinoidsynthesen und auch für zahlreiche, nicht selbstverständliche Chauffeurdienste besonders in den Zeiten der Praktika für Mediziner(innen) und für Biologinnen und Biologen.

Weiterer Dank gilt meiner ehemaligen Laborkollegin und „Haarfärbespezialistin“ Frau Dr. Wibke Groß und meinen beiden Laborkollegen, dem stets hilfsbereiten Dipl.-Chem. Peter Doro und Herrn Dr. Cord Meyer, die alle immer für eine lustige und motivierende Arbeitsatmosphäre sorgten. Besonders danke ich Herrn Dr. Cord Meyer für seine nützliche und helfende Hand in der Laborpraxis, für regen Gedankenaustausch in allen fachlichen und privaten Dingen und für gemeinsame cineastische Erlebnisse.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen der OCI für das lockere, angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken, speziell bei Dipl.-Chem. Roger Scherrers für seine „Hintergrundaktivitäten“ am Computer während der Spätschichten, bei Dipl.-Chem. Stefan Herweg für ertragbringende Gewinnspieltätigkeiten, bei Dipl.-Chem. Peter Noack, der des öfteren mit der Belegung des Festplattenspeicherplatzes meinerseits zu kämpfen hatte, bei Herrn Dr. Thomas „Minesweeper“ Hoffmann und bei Dipl.-Chem. Sebastian Kock für anregende fachliche Diskussionen bei der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen Lebensunterhalt während der Promotionszeit sicherten.

Letztendlich danke ich allen, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Arbeit auf irgendeine Art und Weise beigetragen haben.

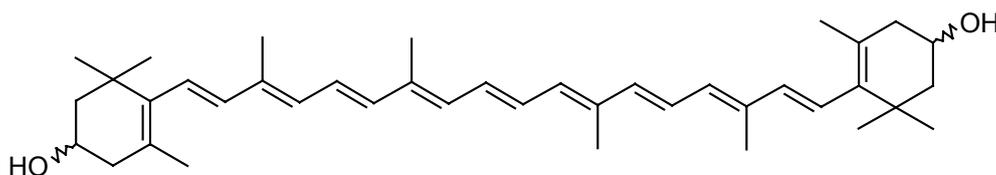
4.4. Synthese

4.4.1. Versuchsbeschreibungen

In den folgenden Arbeitsvorschriften dient die Bezifferung der Moleküle allein der leichteren Zuordnung der ^1H -NMR- und ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Signale zu den entsprechenden Protonen bzw. Kohlenstoffatomen.

Versuch 1: **(3*RS*,3'*RS*)- β , β -Carotin-3,3'-diol** *oder*
(all-*E*)-1,18-Bis-[(4*RS*)-4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl]-
3,7,12,16-tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen
(Zeaxanthin) 6

$$M(\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2) = 568.88 \text{ g/mol}$$



4.80 g (8.55 mmol) Zeaxanthin-Phosphoniumsalz **13** und 0.40 g (2.4 mmol) C_{10} -Dialdehyd **14** (vorgelöst in wenig Dichlormethan) werden unter Argon in 250 ml mit Magnesium getrocknetem Methanol gelöst. Innerhalb 30 min wird eine Lösung von 0.52 g (9.6 mmol) Natriummethanolat in 50 ml absolutem Methanol zugetropft und 24 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die trübe Reaktionsmischung auf 250 ml gesättigte Ammoniumchloridlösung gegossen und dreimal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Man nimmt

den Rückstand in 300 ml Dichlormethan auf, versetzt ihn mit 200 ml Methanol und engt die Lösung am Rotationsverdampfer auf etwa 150 ml ein, wobei das Carotinoid **6** ausfällt. Dieses wird abgesaugt, mit wenig Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.64 g (1.1 mmol) **6**

46 %

Lit.^[110] : 62 %

Smp.: 201 °C (Methanol)

Lit.^[110] : 211 °C

R_f -Wert: 0.62 (Diethylether)

UV/VIS (CHCl₃): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 439 (sh), 462 (123000), 490 (105000)

Lit.^[159] : 462 (130700)

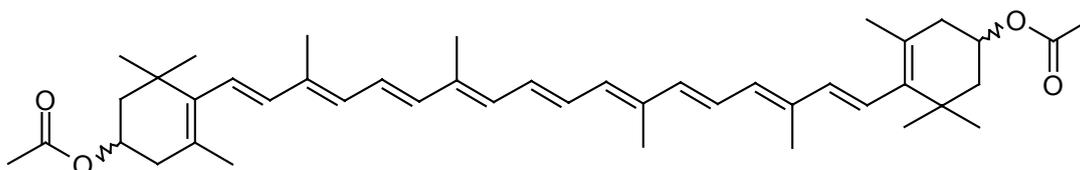
Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[110,111] überein.

Versuch 2: (3*RS*,3'*RS*)-3,3'-Diacetoxy- β , β -carotin oder
(all-*E*)-1,18-Bis-[(4*RS*)-4-acetoxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl]-
3,7,12,16-tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen

(Zeaxanthindiacetat)

17

$M(C_{44}H_{60}O_6) = 652.95$ g/mol



0.130 g (0.229 mmol) Zeaxanthin **6** werden unter Argon in 18 ml trockenem Pyridin gelöst. Innerhalb 45 min werden nun 10.0 ml (10.8 g, 106 mmol) Essigsäureanhydrid portionsweise mit einem Tropftrichter zugegeben und noch 2 h gerührt. Zur Aufarbeitung wird unter starkem Rühren und Kühlung mit einem Eis/Kochsalz-Bad vorsichtig ca. 120 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugetropft, bis keine Gasentwicklung (Kohlendioxid) mehr zu erkennen ist. Man schüttelt zweimal mit 100 ml Petrolether (Sdp: 40 – 60 °C) aus, wäscht die organische Phase zweimal mit

80 ml destilliertem Wasser und trocknet sie über Magnesiumsulfat. Nach Abfiltrieren des Trockenmittels und Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt an Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether 20:1 als Laufmittel chromatographiert. Die Produktfraktion wird in etwas Methanol aufgenommen, der dunkelrote Feststoff abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.080 g (0.12 mmol) **17**

52 %

Lit.^[105] : 31 %

Smp.: 151-152 °C (Methanol)

Lit.^[160] : 154-155 °C

R_f -Wert: 0.86 (Dichlormethan/Diethylether 20:1)

UV/VIS (Ethanol): λ_{\max} [nm] (ϵ [$l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]) = 430 (sh), 452 (131000), 480 (116000)

Lit.^[161] : 422.5 (sh, 70000), 451 (110000), 478 (96000)

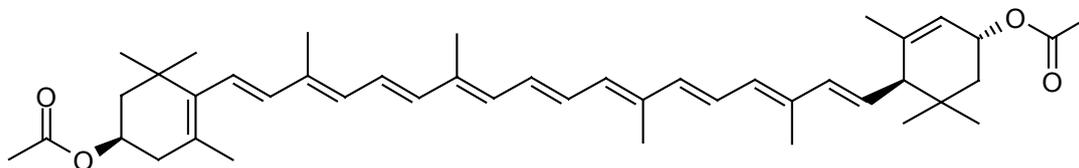
Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[161] überein.

Versuch 3: (3*R*,3'*R*,6'*R*)-3,3'-Diacetoxy- β,ϵ -carotin oder
(all-*E*)-1-[(4*R*)-4-Acetoxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl]-18-
[(1*R*,4*R*)-4-acetoxy-2,6,6-trimethyl-2-cyclohexenyl]-3,7,12,16-
tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen

(Luteindiacetat)

18

$M(C_{44}H_{60}O_6) = 652.95 \text{ g/mol}$



0.115 g (0.202 mmol) Lutein **7** werden unter Argon in 25 ml trockenem Pyridin gelöst. Innerhalb 45 min werden nun 10.0 ml (10.8 g, 106 mmol) Essigsäureanhydrid portionsweise über einen Tropftrichter zugegeben und noch 1¼ h gerührt. Zur Aufarbeitung wird unter starkem Rühren und Kühlung mit einem Eis/Kochsalz-Bad vorsichtig ca. 120 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugetropft, bis keine

Gasentwicklung (Kohlendioxid) mehr zu erkennen ist. Man schüttelt zweimal mit 100 ml Petrolether (Sdp: 40 – 60 °C) aus, wäscht die organische Phase zweimal mit 50 ml destilliertem Wasser, einmal mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung und trocknet sie über Magnesiumsulfat. Nach Abfiltration des Trockenmittels und Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt an Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether 20:1 als Laufmittel chromatographiert.

Ausbeute: 0.070 g (0.11 mmol) **18**

53 %

Smp.: 162-164 °C (Methanol)

Lit.^[161]: 158-160 °C

R_f -Wert: 0.82 (Dichlormethan/Diethylether 20:1)

UV/VIS (CHCl₃): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 432 (sh, 87000), 456 (126000),

485 (113000) Lit.^[161] (Ethanol): 446.5 (125000)

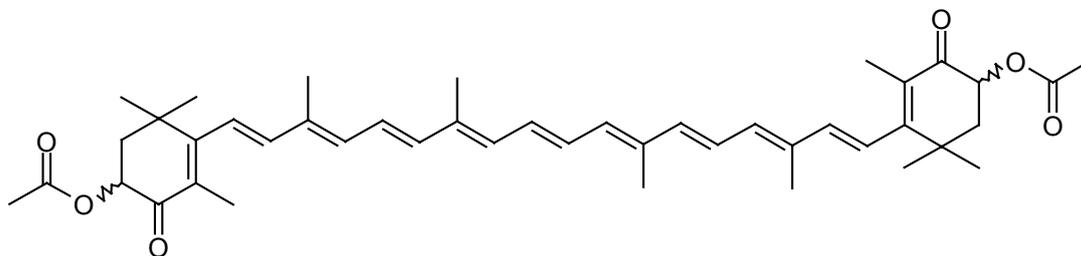
Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[161] überein.

Versuch 4: (3*RS*,3'*RS*)-3,3'-Diacetoxy- β,β -carotin-4,4'-dion oder
(all-*E*)-1,18-Bis-[(4*RS*)-4-acetoxy-2,6,6-trimethyl-3-oxo-1-cyclohexenyl]-3,7,12,16-tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen

(Astaxanthindiacetat)

19

$M(C_{44}H_{56}O_6) = 680.93$ g/mol



2.00 g (3.35 mmol) Astaxanthin **9** werden unter Argon in 20 ml trockenem Pyridin gelöst und nach Zugabe von 10.0 ml (10.8 g, 106 mmol) Essigsäureanhydrid 20 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung gießt man den Reaktionsansatz auf 300 g Eis und

schüttelt zweimal mit 150 ml Dichlormethan aus. Die organische Phase wird einmal mit halbgesättigter Ammoniumchloridlösung, dann mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wird mit je 150 ml Dichlormethan und Methanol versetzt und am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingengt, wobei das Carotinoid **19** auskristallisiert, welches abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 2.00 g (2.94 mmol) **19**

88 %

Lit.^[162] : 85.5 %

Smp.: 199-202 °C (Methanol)

Lit.^[162] : 207-209 °C

R_f -Wert: 0.88 (Dichlormethan/Diethylether 5:1)

UV/VIS (CHCl₃): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 489 (132000) Lit.^[162] : 490 (122100)

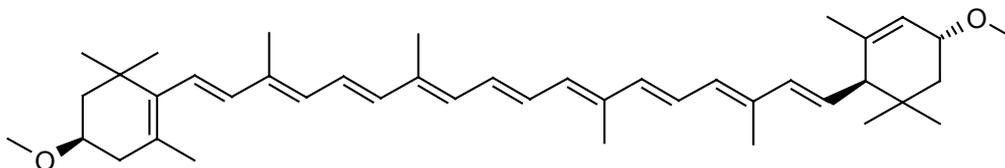
Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[162,163] überein.

Versuch 5: (3*R*,3'*R*,6'*R*)-3,3'-Dimethoxy- β,ϵ -carotin oder
(all-*E*)-1-[(4*R*)-4-Methoxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl]-18-
[(1*R*,4*R*)-4-methoxy-2,6,6-trimethyl-2-cyclohexenyl]-3,7,12,16-
tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen

(Luteindimethylether)

20

$M(C_{42}H_{60}O_2) = 596.93$ g/mol



In einem 50 ml Zweihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter werden unter Argon 0.15 g (3.8 mmol) Kalium in 10 ml absolutem *tert*-Butanol gelöst und nach Zugabe von 0.080 g (0.14 mmol) Lutein **7** (vorgelöst in wenig absolutem *tert*-Butanol) in 10 ml absolutem Benzol 1 h bei 40 °C gerührt. Innerhalb 5 min werden nun 1.45 g (0.636 ml, 10.2 mmol) Methyljodid in 5 ml absolutem Benzol zugetropft und 24 h bei

RT weitergerührt. Man gibt noch 0.10 g (2.6 mmol) Kalium gelöst in 5 ml absolutem *tert*-Butanol und daraufhin 0.70 g (0.31 ml, 4.9 mmol) Methyljodid hinzu und rührt weitere 24 h. Zur Aufarbeitung wird der Reaktionsansatz mit 200 ml Diethylether verdünnt und mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether 8:1 als Laufmittel chromatographiert, wobei das dimethylierte Produkt **20** als erstes eluiert wird. Die folgenden Fraktionen sind monomethyliertes Lutein (R_f -Wert = 0.6 – 0.7) und nicht umgesetztes Lutein **7**.

Ausbeute: 0.022 mg (0.037 mmol) **20**

26 %

Lit.^[113]: 46 %

Smp.: 150-151 °C (Methanol)

Lit.^[113]: 162-163 °C

R_f -Wert: 0.87 (Dichlormethan/Diethylether 8:1)

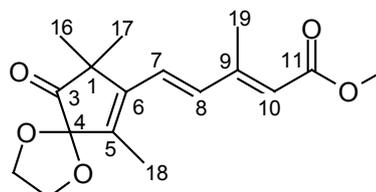
UV/VIS (CHCl₃): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 434 (sh, 81000), 456 (118000),
486 (105000) Lit.^[113] (Dioxan): 433 (130000)

Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[113] überein.

Versuch 6: 3-Methyl-5-(6,8,8-trimethyl-9-oxo-1,4-dioxaspiro[4.4]non-6-en-7-yl)-(2*E*,4*E*)-pentadiensäuremethylester **23**

$M(C_{17}H_{22}O_5) = 306.36$ g/mol

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter und Rückflusskühler löst man 25.0 g (0.119 mol) 6,8,8-Trimethyl-9-oxo-1,4-dioxaspiro[4.4]non-6-en-7-carbaldehyd **21** (Darstellung siehe Lit.^[119]) in 200 ml absolutem THF



und gibt 29.7 g (0.119 mol) (*EZ*)-4-(Diethoxyphosphoryl)-3-methyl-2-butensäuremethylester **22a/b** (Darstellung siehe Lit.^[119]) hinzu. In einem Zeitraum von 3 h wird nun eine Lösung von 6.8 g (0.13 mol) Natriummethanolat in 60 ml absolutem Methanol

zutropft und 20 h bei RT weitergerührt. Da noch Edukt vorhanden ist (DC-Kontrolle, Laufmittel: Diethylether/Hexan 2:1, R_f -Wert (**21**) = 0.63), gibt man zusätzlich 1.0 g (0.019 mol) Natriummethanolat in 10 ml absolutem Methanol hinzu und rührt weitere 4 h. Zur Aufarbeitung wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer abgezogen und durch 100 ml Chloroform ersetzt. Man gibt noch 100 ml destilliertes Wasser hinzu, rührt kurz um, trennt die organische Phase ab und extrahiert die wässrige dreimal mit je 100 ml Chloroform. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 100 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach vollständiger Entfernung des Lösemittel am Rotationsverdampfer versetzt man den dunkelbraunen Rückstand mit wenig Diethylether und lässt über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auskristallisieren. Der ausgefallene Ketoester **23** wird abgesaugt und mit kaltem Diethylether gewaschen. Die braune Etherlösung wird nach dem Einengen an Kieselgel mit Diethylether/Hexan 2:1 als Laufmittel chromatographiert.

Ausbeute: 19.1 g (0.0623 mol) **23**

52 %

Lit.^[119]: 68 %

Smp.: 107-109 $^{\circ}\text{C}$ (Diethylether)

Lit.^[118]: 109-110 $^{\circ}\text{C}$ (Hexan)

R_f -Wert: 0.74 (Diethylether/Hexan 2:1)

Lit.^[119]: 0.72

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz / CDCl_3 / TMS):

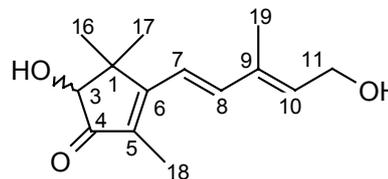
δ [ppm] = 1.29 (s, 6 H, 16,17- CH_3), 1.88 (s, 3 H, 18- CH_3), 2.36 (d, 3 H, $^4J = 1.2$ Hz, 19- CH_3), 3.74 (s, 3 H, $-\text{OCH}_3$), 4.12-4.36 (m, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 5.88 (s, 1 H, 10-CH), 6.57 (d, 1 H, $^3J = 16.4$ Hz, 8-CH), 6.69 (d, 1 H, $^3J = 16.4$ Hz, 7-CH)

Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[119] überein.

Versuch 7: **(5*RS*)-5-Hydroxy-3-[5-hydroxy-3-methyl-(1*E*,3*E*)-pentadienyl]-2,4,4-trimethyl-2-cyclopenten-1-on****24**

$$M(C_{14}H_{20}O_3) = 236.31 \text{ g/mol}$$

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter werden 2.93 g (77.2 mmol) LAH in 200 ml absolutem Diethylether suspendiert. In einem Zeitraum von



1½ h wird nun eine Lösung von 9.45 g (30.8 mmol) des Ketoesters **23** in 100 ml absolutem Diethylether tropfenweise zugesetzt und noch 2 h bei RT weitergerührt. Zur Aufarbeitung hydrolysiert man den Reaktionsansatz tropfenweise mit destilliertem Wasser, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu erkennen ist und gibt dann noch soviel Wasser hinzu, dass sich zwei Phasen bilden. Die wässrige Phase wird nun mit 1 M Schwefelsäure auf pH = 5 – 6 eingestellt und nach Abtrennen der organischen Phase dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vollständig vom Lösemittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird in wenig Diethylether aufgenommen und an Kieselgel mit Diethylether als Eluens chromatographiert. Man erhält ein hellgelbes Öl.

Ausbeute: 4.30 g (18.2 mol) **24**

59 %

Lit.^[119]: 65 % R_f -Wert: 0.43 (Diethylether)Lit.^[119]: 0.48¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

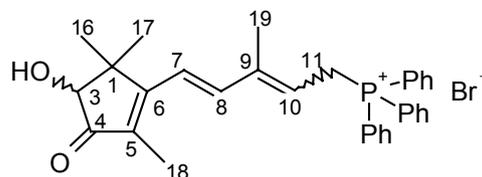
δ [ppm] = 1.18 (s, 3 H, 16 od. 17-CH₃), 1.38 (s, 3 H, 16 od. 17-CH₃), 1.88 (s, 3 H, 18-CH₃), 1.90 (s, 3 H, 19-CH₃), 2.93 (s, 1 H, -OH), 3.93 (s, 1 H, 3-CH), 4.39 (d, 2 H, ³J = 6.7 Hz, 11-CH₂), 5.93 (t, 1 H, ³J = 6.7 Hz, 10-CH), 6.36 (d, 1 H, ³J = 16.4 Hz, 7-CH), 6.84 (d, 1 H, ³J = 16.4 Hz, 8-CH)

Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[118] überein.

Versuch 8: **{5-[(4*RS*)-4-Hydroxy-2,5,5-trimethyl-3-oxo-1-cyclopentenyl]-3-methyl-(2*EZ*,4*E*)-pentadienyl}-triphenylphosphoniumbromid** **25a/b**

$$M(C_{32}H_{34}BrO_2P) = 561.50 \text{ g/mol}$$

4.30 g (18.2 mmol) des Diols **24** werden in 150 ml Dichlormethan gelöst und mit einem Eis/Kochsalz-Bad unter 0 °C abgekühlt. Im Verlauf von 10 min tropft man nun 1.50 ml (2.59 g, 19.9 mmol) einer 62%igen Bromwasserstoffsäure hinzu und rührt 2 h bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle, Laufmittel: Diethylether, R_f -Wert (Diol **24**) = 0.43, R_f -Wert (Allylbromid) = 0.85). Zur Aufarbeitung gießt man das Reaktionsgemisch auf 200 ml destilliertes Wasser und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit je 80 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung neutral gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die braune Lösung wird mit 4.80 g (18.3 mmol) Triphenylphosphan versetzt und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer auf 50 ml eingengt und unter starkem Rühren in 1000 ml Diethylether eingetroppt, wobei das gewünschte Phosphoniumsalz **25a/b** spontan als voluminöser gelber Niederschlag ausfällt. Dieser wird über eine Fritte schnell abgesaugt und zuerst am Rotationsverdampfer, dann im Ölpumpenvakuum von noch eingeschlossenem Diethylether befreit.



Ausbeute: 5.10 g (9.08 mmol) **25a/b** ($E:Z \approx 6:1$, gemäß $^1\text{H-NMR}$)

50 %

Lit.^[119] : 67 %

Smp.: 118-120 °C

Lit.^[119] : 119-122 °C

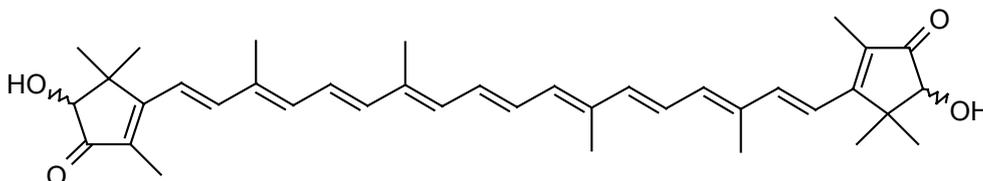
$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (200 MHz / CDCl_3 / 85%ige H_3PO_4):

δ [ppm] = 22.02 ((*Z*)-Isomer **25b**), 22.41 ((*E*)-Isomer **25a**)

Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[119] überein.

Versuch 9: (3*RS*,3'*RS*)-3,3'-Dihydroxy-2,2'-dinor- β,β -carotin-4,4'-dion oder
(all-*E*)-1,18-Bis-[(4*RS*)-4-hydroxy-2,5,5-trimethyl-3-oxo-1-cyclopentenyl]-3,7,12,16-tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen
(Actinioerythrol) 26

$$M(C_{38}H_{48}O_4) = 568.80 \text{ g/mol}$$



In einem 500 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter werden unter Argon 0.40 g (2.4 mmol) C₁₀-Dialdehyd **16** in 200 ml absolutem und sauerstofffreiem Methanol gelöst. Man gibt nun 5.05 g (8.99 mmol) des Phosphoniumsalzes **25a/b** hinzu und kühlt die Lösung mit einem Eis/Kochsalz-Bad auf 0 °C ab. Bei schwachem Argongegenstrom wird nun eine Lösung von 0.47 g (8.7 mmol) Natriummethanolat in 40 ml absolutem Methanol in einem Zeitraum von 2½ h zugetropft und noch weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend entfernt man das Kältebad und lässt das Reaktionsgemisch über Nacht in Argonatmosphäre stehen. Am nächsten Tag lässt man noch 1 h bei RT rühren, gießt die tiefrote Reaktionsmischung auf 200 ml gesättigte Ammoniumchloridlösung und extrahiert sie dreimal mit je 150 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit wenig destilliertem Wasser gewaschen und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wird in 400 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 250 ml absolutem Methanol versetzt und das Dichlormethan am Rotationsverdampfer zuerst bei Normaldruck, dann durch Anlegen eines schwachen Vakuums (bis 300 mbar) wieder entfernt, wobei das Carotinoid **26** auszukristallisieren beginnt. Man gibt noch 50 ml absolutes Methanol hinzu, filtriert den entstandenen Niederschlag ab und trocknet ihn im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 0.62 g (1.1 mmol) **26**

46 %

Lit.^[119]: 75 %

Smp.: 198-204 °C (Methanol)

Lit.^[164]: 200-202 °C

R_F-Wert: 0.33 (Diethylether/Dichlormethan 1:1)

Lit.^[119]: 0.37

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz / CDCl_3 / TMS):

δ [ppm] = 1.17 (s, 6 H, 16 od. 17- CH_3), 1.43 (s, 6 H, 16 od. 17- CH_3), 1.92 (s, 6 H, 18- CH_3), 2.01 (s, 6 H, 20- CH_3), 2.03 (s, 6 H, 19- CH_3), 2.21 (s, 6 H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$), 5.16 (s, 2 H, 3-H), 6.35 (d, 2 H, $^3J = 10.1$ Hz, 14-H), 6.38 (d, 2 H, $^3J = 16.2$ Hz, 7-H), 6.45 (d, 2 H, $^3J = 11.4$ Hz, 10-H), 6.51 (d, 2 H, $^3J = 14.7$ Hz, 12-H), 6.69 (dd, 2 H, $^3J = 11.4, 14.7$ Hz, 11-H), 6.72 (m, 2 H, 15-H), 6.97 (d, 2 H, $^3J = 16.2$ Hz, 8-H)

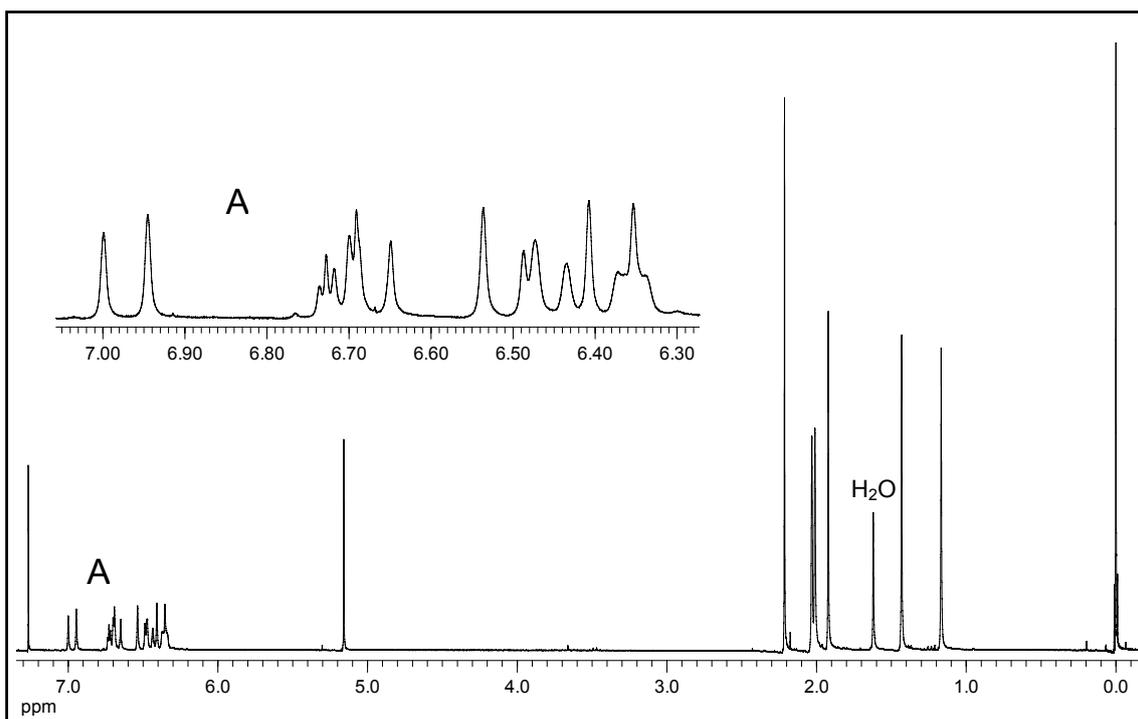


Abb. 90: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz / CDCl_3 / TMS) von **27**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3032, ($=\text{C}-\text{H}$), 2967, 2919, 2869 ($-\text{C}-\text{H}$), 1750 ($\text{C}=\text{O}$ Ester), 1699 ($\text{C}=\text{O}$ Keton), 1586, 1542 ($\text{C}=\text{C}$), 1372 (symm. $\text{C}-\text{H}$ -Deform.), 1228 ($=\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 966 ($=\text{C}-\text{H}$ -Deform., out of plane, Polyenkette)

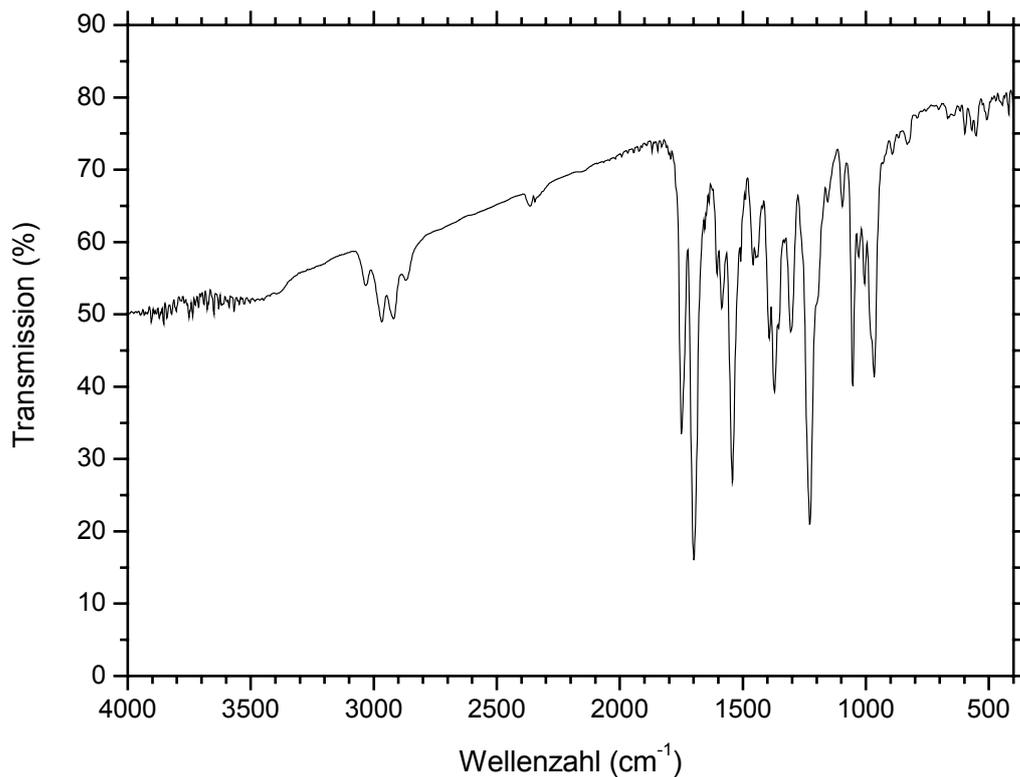


Abb. 91: IR-Spektrum (KBr) von **27**

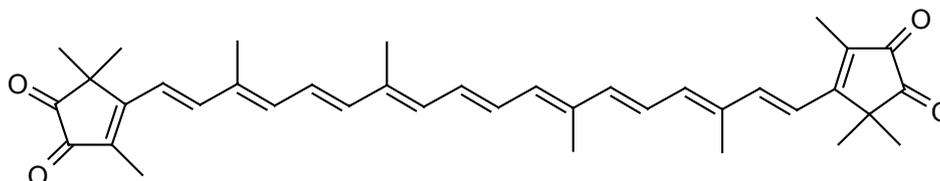
UV/VIS (CHCl₃): λ_{max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 492 (sh), 521 (153000), 549 (sh)

Lit.^[165] : 518, 550 (sh)

Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[118] überein.

Versuch 11: 2,2'-Dinor- β,β -carotin-3,4,3',4'-tetraon oder
 (all-*E*)-3,7,12,16-Tetramethyl-1,18-bis-(2,5,5-trimethyl-3,4-dioxo-
 1-cyclopentenyl)-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen
 (Violerythrin) 28

$$M(C_{38}H_{44}O_4) = 564.76 \text{ g/mol}$$



0.152 g (0.267 mmol) Actinioerythrol **26** werden in 180 ml Dichlormethan gelöst und nach Zugabe von 3.20 g (36.8 mmol) Mangandioxid (gefällt, aktiv, von *Merck*) 4½ h bei RT gerührt. Dann wird das Oxidationsmittel abfiltriert, mit 150 ml Dichlormethan ausgewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis auf ca. 100 ml eingengt. Nach Zugabe von 150 ml Methanol wird das restliche Dichlormethan bei 300 mbar abgezogen, wobei das Carotinoid **28** ausfällt, welches abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 0.082 mg (0.15 mmol) **28**

56 %

Lit.^[118]: 71 %

Smp.: 245-247 °C (Methanol)

Lit.^[118]: 248 °C

R_f -Wert: 0.92 (Diethylether/Aceton 10:1)

Lit.^[118]: 0.90

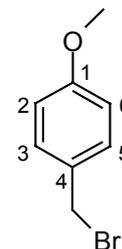
UV/VIS (CHCl₃): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 584 (88000) Lit.^[118]: 584 (95000)

Die weiteren spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Lit.^[166] überein.

Versuch 12: **4-(Brommethyl)-anisol 32**

$$M(C_8H_9BrO) = 201.06 \text{ g/mol}$$

In einem 500 ml Kolben mit Intensivkühler werden 33.1 g (0.271 mol) 4-Methylanisol **31** in 300 ml über Molekularsieb 4 Å getrocknetem Tetrachlormethan gelöst und nach Zugabe von 48.2 g (0.271 mol) *N*-Bromsuccinimid und 200 mg AIBN zum Rückfluss erhitzt. Man lässt 5 h kochen und kühlt dann auf RT ab. Das auf der Oberfläche schwimmende Succinimid wird über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit wenig Diethylether gewaschen. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.



Ausbeute: 45.2 g (0.225 mol) **32**

83 %

Lit.^[167] : 79 %

Sdp.: 61-63 °C / $\leq 10^{-3}$ mbar

Lit.^[168] : 77-80 °C / 1.1 mbar

Lit.^[167] : 95-97 °C / 0.9 mbar

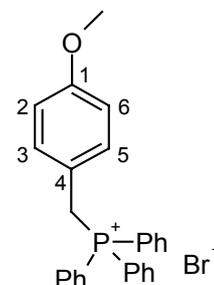
¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 3.79 (s, 3 H, -OCH₃), 4.49 (s, 2 H, -CH₂Br), 6.85 (m, 2 H, B-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{BA} = 8.8 Hz, 2,6-Aryl-H), 7.31 (m, 2 H, A-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{AB} = 8.8 Hz, 3,5-Aryl-H)

Versuch 13: **(4-Methoxybenzyl)-triphenylphosphoniumbromid 33**

$$M(C_{26}H_{24}BrOP) = 463.35 \text{ g/mol}$$

44.1 g (0.219 mol) des Bromids **32** und 59.0 g (0.225 mol) Triphenylphosphan werden in 350 ml Toluol 6 h zum Rückfluss erhitzt, wobei das Phosphoniumsalz **33** langsam als feiner weißer Feststoff ausfällt. Nach Abkühlen auf RT wird das Produkt abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und zuerst am Rotationsverdampfer, dann im Ölpumpenvakuum vom restlichen Lösemittel befreit.



Ausbeute: 92.5 g (0.200 mol) **33**

91 %

Lit.^[169]: 85.3 %

Smp.: 233-236 °C

Lit.^[169]: 235-237 °C (Ethanol)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 3.72 (s, 3 H, -OCH₃), 5.17 (d, 2 H, ²J_{HP} = 13.7 Hz, -CH₂P⁺-), 6.64 (m, 2 H, B-Teil eines [AB]₂X-Systems, ³J_{BA} = 8.8 Hz, 2,6-Aryl-H), 6.99 (m, 2 H, A-Teil eines [AB]₂X-Systems, ³J_{AB} = 8.8 Hz, ⁴J_{AX} = 2.6 Hz, 3,5-Aryl-H), 7.61-7.82 (m, 15 H, -P⁺-Aryl-H)

³¹P-¹H-NMR (200 MHz / CDCl₃ / 85%ige H₃PO₄):

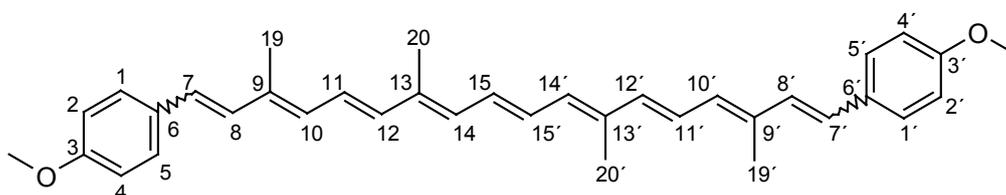
δ [ppm] = 23.44

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3042 (=C-H), 2991, 2864, 2786 (-C-H), 1607, 1585, 1509 (C=C), 1438 (P-Phenyl), 1248 (=C-O-C), 845, 745, 691 (=C-H-Deform., out of plane, 2 bzw. 5 benachbarte H)

Versuch 14: 3,3'-Dimethoxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin oder
1,18-Bis-(4-methoxyphenyl)-3,7,12,16-tetramethyl-
(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17EZ)-octadecanonaen **35**

M(C₃₆H₄₀O₂) = 504.71 g/mol



In einem 500 ml Dreihalskolben mit Septum, Rückflußkühler und Tropftrichter mit Druckausgleich werden unter Stickstoff 8.00 g (17.3 mmol) Phosphoniumsalz **33** in 250 ml THF (p. a.) suspendiert und mit einem Aceton/Trockeneisbad auf -78 °C abgekühlt. Man spritzt nun innerhalb 20 min 12.6 ml (20.2 mmol) einer 1.6 M Butyllithium-Lösung in Hexan zu und rührt den gelb-orangen Ansatz noch 1 h.

Anschließend wird eine Lösung von 0.68 g (2.3 mmol) C₂₀-Dialdehyd **34** in 60 ml THF (p. a.) innerhalb 20 min zugetropft. Die Reaktionsmischung lässt man langsam über Nacht auf RT aufwärmen und rührt dann noch weitere 24 h. Nach Zugabe von 100 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung wird die Mischung am Rotationsverdampfer eingengt, zweimal mit 150 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Man entfernt das Lösemittel am Rotationsverdampfer und chromatographiert den Rückstand an Kieselgel mit Chloroform als Laufmittel. Das Produkt wird in Dichlormethan gelöst und fällt nach Lösemittelaustausch mit Methanol als oranges Pulver an.

Ausbeute: 0.75 g (1.5 mmol) **35** (7*Z*,7'*Z*: 7*E*,7'*Z* ≈ 1:1 bis 1:2, gemäß ¹H-NMR)
65 %

Smp.: 251-253 °C

R_F-Wert: 0.84 (Chloroform)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 1.77 (s, 3 H, 19'-CH₃), 1.96 (s, 3 H, 20'-CH₃), 1.98 (s, 3 H, 19-CH₃), 2.03 (s, 3 H, 20-CH₃), 3.81 (s, 3 H, OCH₃'), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 6.16 (d, 1 H, ³J = 12.3 Hz, 8'-CH), 6.22-6.37 (m, 5 H, 10,10',12',14,14'-CH), 6.37 (d, 1 H, ³J = 12.3 Hz, 7'-CH), 6.39 (d, 1 H, ³J = 14.9 Hz, 12-CH), 6.50-6.69 (m, 3 H, 11',15,15'-CH), 6.54 (d, 1 H, ³J = 16.0 Hz, 7-CH), 6.67 (dd, 1 H, ³J = 11.5 Hz, 14.9 Hz, 11-CH), 6.78 (d, 1 H, ³J = 16.0 Hz, 8-CH), 6.82 (m, 2 H, B-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{BA} = 8.7 Hz, 2',4'-Aryl-H), 6.86 (m, 2 H, B-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{BA} = 8.7 Hz, 2,4-Aryl-H), 7.20 (m, 2 H, A-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{AB} = 8.7 Hz, 1',5'-Aryl-H), 7.37 (m, 2 H, A-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{AB} = 8.7 Hz, 1,5-Aryl-H)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

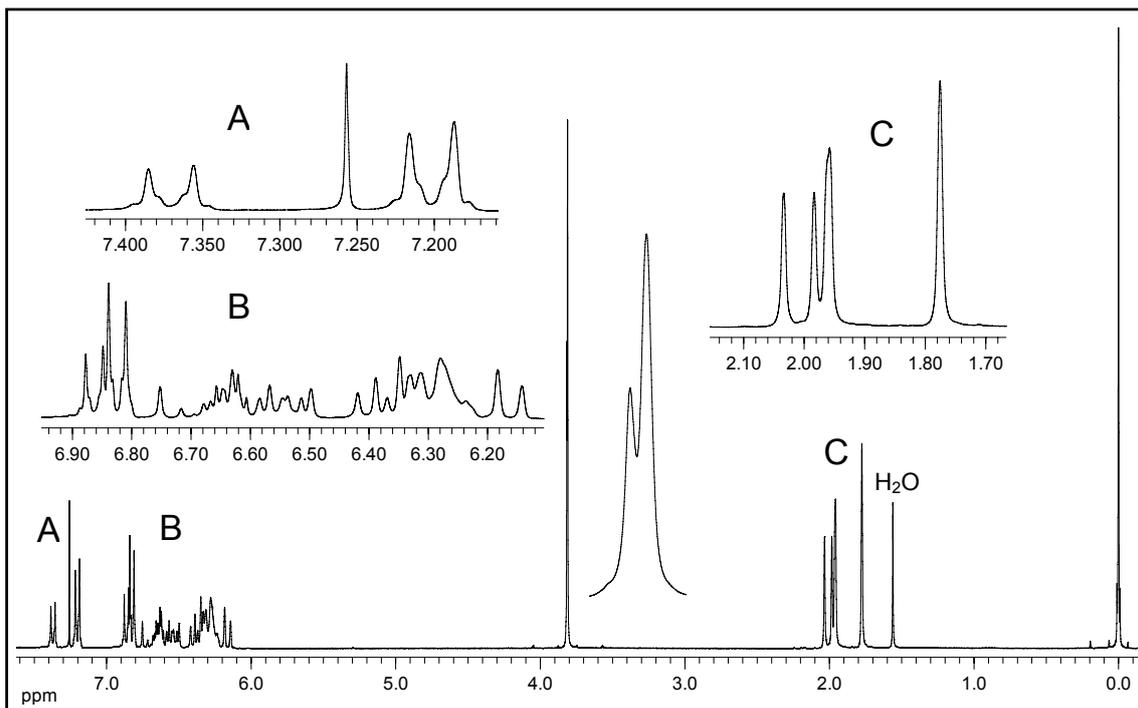


Abb. 92: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz / CDCl_3 / TMS) von **35**

^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz / CDCl_3 / TMS):

δ [ppm] = 12.80 (20'-C), 12.82 (20-C), 12.90 (19-C), 16.73 (19'-C), 55.22 (OCH_3'), 55.30 (OCH_3), 113.26 (2',4'-C), 114.14 (2,4-C), 124.76 (11'-C), 125.10 (11-C), 127.00 (7-C), 127.51 (1,5-C), 128.37 (7'-C), 130.13 (15'-C), 130.19 (15-C), 130.29 (1',5'-C), 130.66 (6-C), 130.93 (6'-C), 131.70 (8-C), 132.25 (10-C), 132.72 (14'-C), 132.79 (10'-C), 132.84 (14-C), 133.42 (8'-C), 135.34 (9'-C), 135.75 (9-C), 136.48 (13'-C), 136.59 (13-C), 137.65 (12'-C), 137.71 (12-C), 158.49 (3'-C), 159.01 (3-C)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3022 (=C-H), 2994, 2916, 2835 (-C-H), 1603, 1572, 1506 (C=C), 1441 (C-H-Deform.), 1253 (=C-O-C), 962 (=C-H-Deform., out of plane, Polyenkette)

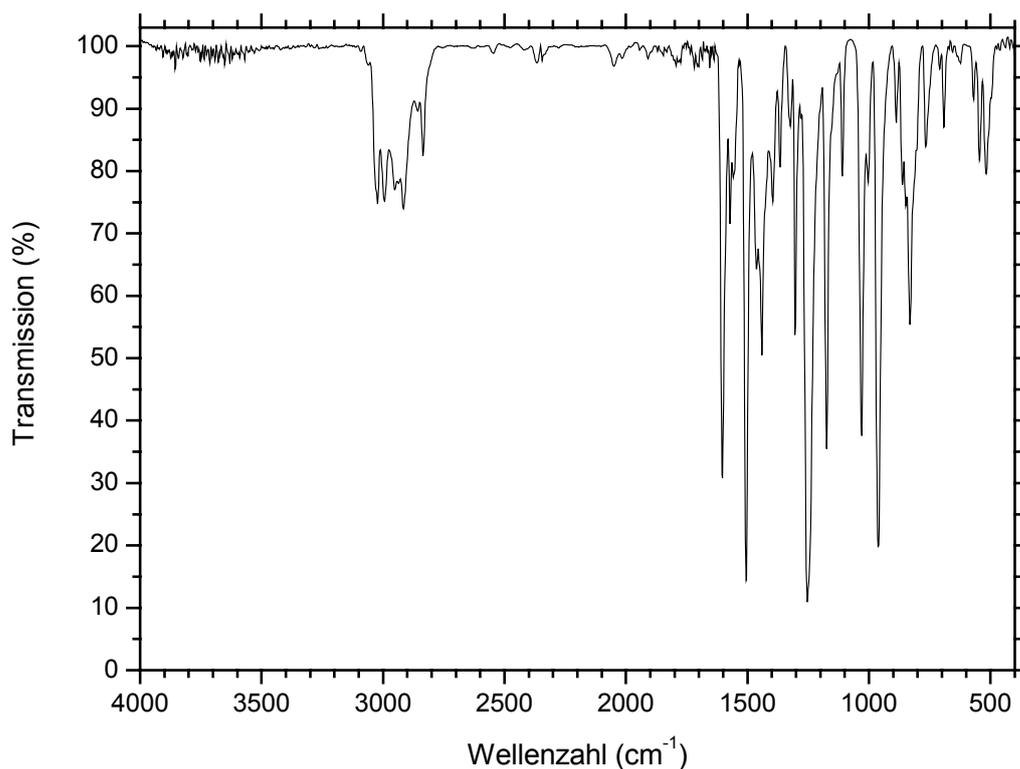


Abb. 93: IR-Spektrum (KBr) von **35**

UV/VIS (CHCl₃): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹cm⁻¹]) = 474 (125000) **Isomerengemisch**
 = 461 (106000), 487 (147000), 521 (123000)

(all-*E*)-Isomer, gemäß ¹H-NMR nach Isomerisierung (in Heptan)

MS (EI, 70 eV, T = 300 °C):

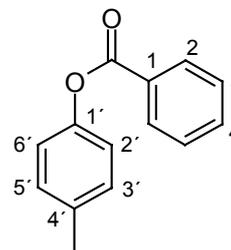
m/z (%) = 505 (9) [M⁺+1], 504 (24) [M⁺], 412 (2) [M⁺-92], 399 (7), 398 (25) [M⁺-106], 278 (5), 254 (8) 253 (7), 252 (14), 227 (11), 199 (14), 187 (13), 161 (25), 159 (10), 147 (11), 145 (11), 121 (100), 115 (10), 91 (18), 77 (8), 55 (6)

Elementaranalyse: C₃₆H₄₀O₂ (M = 504.71) ber.: C: 85.67 % H: 7.99 %
 gef.: C: 85.78 % H: 8.20 %

Versuch 15: Benzoessäure-*p*-tolylester **37**

$$M(C_{14}H_{12}O_2) = 212.25 \text{ g/mol}$$

34.3 g (0.317 mol) *p*-Kresol **36** werden in einem 500 ml Zweihalskolben in 150 ml trockenem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 45.0 g (0.320 mol) Benzoylchlorid versetzt. Die zähe Masse wird 1 h auf 70 °C erwärmt und nach dem Abkühlen 20 h stehen gelassen. Zur Aufarbeitung gießt man



das Reaktionsgemisch in 150 ml Eiswasser und säuert mit ca. 150 ml konz. Salzsäure an (pH-Wert = 2 – 3). Die wässrige Lösung wird dreimal mit 200 ml Diethylether ausgeschüttelt, die vereinigten Etherphasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der feste weiße Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 61.5 g (0.290 mol) **37**

91 %

Lit.^[170]: 62 %

Smp.: 69 °C (Ethanol)

Lit.^[170]: 69 °C (Ethanol)

Lit.^[171]: 72 °C (Methanol)

R_f -Wert: 0.82 (Diethylether/Hexan 1:2)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 2.36 (s, 3 H, -CH₃), 7.09 (m, 2 H, B-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{BA} = 8.5 Hz, 2',6'-Aryl-H), 7.21 (m, 2 H, A-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{AB} = 8.5 Hz, 3',5'-Aryl-H), 7.49 (m, 2 H, M-Teil eines [AM]₂B-Systems, 3,5-Aryl-H), 7.61 (m, 1 H, B-Teil eines [AM]₂B-Systems, 4-Aryl-H), 8.20 (m, 2 H, A-Teil eines [AM]₂B-Systems, 2,6-Aryl-H)

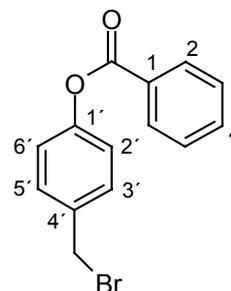
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3033 (=C-H), 2922 (-C-H), 1728 (C=O), 1598, 1509 (C=C), 1452 (C-H-Deform.), 1271, 1198 (=C-O-C), 708 (=C-H-Deform., out of plane, 5 benachbarte H)

Versuch 16: Benzoessäure-4-(brommethyl)-phenylester 38

$$M(C_{14}H_{11}BrO_2) = 291.14 \text{ g/mol}$$

58.0 g (0.273 mol) des Esters **37** werden in 500 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst und nach Zugabe von 49.0 g (0.275 mol) *N*-Bromsuccinimid und 100 mg AIBN auf 100 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Nach Anspringen der Reaktion (erkennbar durch heftiges Sieden) lässt man noch 2 h Rückfluss kochen und kühlt dann auf RT ab. Das auf der



Oberfläche schwimmende Succinimid wird über einen Büchnertrichter abgesaugt und gründlich mit 400 ml Diethylether gewaschen. Nach Entfernen der Lösemittel am Rotationsverdampfer wird der zurückbleibende, leicht gelbliche Feststoff zunächst in Ethanol, der Rest dann in Petrolether (Sdp.: 60 – 80 °C) umkristallisiert. Man erhält weiße Kristalle.

Ausbeute: 57.9 g (0.199 mol) **38**

73 %

Lit.^[172] : 76 %

Smp.: 110-112 °C (Petrolether)

Lit.^[172] : 108-111 °C (Petrolether)

R_f -Wert: 0.72 (Diethylether/Hexan 1:2)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 4.50 (s, 2 H, -CH₂Br), 7.19 (m, 2 H, B-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{BA} = 8.5 Hz, 2',6'-Aryl-H), 7.44 (m, 2 H, A-Teil eines [AB]₂-Systems, ³J_{AB} = 8.5 Hz, 3',5'-Aryl-H), 7.50 (m, 2 H, M-Teil eines [AM]₂B-Systems, 3,5-Aryl-H), 7.63 (m, 1 H, B-Teil eines [AM]₂B-Systems, 4-Aryl-H), 8.19 (m, 2 H, A-Teil eines [AM]₂B-Systems, 2,6-Aryl-H)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3066, 3033 (=C-H), 1728 (C=O), 1599, 1508 (C=C), 1452 (C-H-Deform.), 1271, 1197 (=C-O-C), 708 (=C-H-Deform., out of plane, 5 benachbarte H)

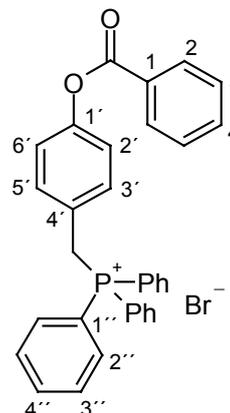
MS (EI, 70 eV, T = 50 °C):

m/z (%) = 292 (2) [M⁺(⁸¹Br)], 290 (2) [M⁺(⁷⁹Br)], 211 (21) [M⁺-Br], 105 (100) [C₆H₅CO⁺], 77 (31) [C₆H₅⁺], 58 (10), 51 (11) [C₄H₃⁺], 43 (29)

Versuch 17: (4-Benzoyloxybenzyl)-triphenylphosphoniumbromid 39

$$M(C_{32}H_{26}BrPO_2) = 553.44 \text{ g/mol}$$

37.0 g (0.127 mol) des Bromids **38** und 35.0 g (0.133 mol) Triphenylphosphan werden in 700 ml Toluol gelöst und 9 h unter Rückfluss erhitzt, wobei das Phosphoniumsalz **39** als feiner weißer Feststoff ausfällt. Die Ausbeute kann durch längeres Erhitzen geringfügig erhöht werden. Nach Erkalten der Reaktionsmischung wird das Produkt abgesaugt, mit etwas Diethylether gewaschen und zuerst am Rotationsverdampfer, dann im Ölpumpenvakuum vom restlichen Lösemittel befreit.



Ausbeute: 51.5 g (0.0931 mol) **39**

73 %

Smp.: 298-301 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / TMS):

δ [ppm] = 5.31 (d, 2 H, $^2J_{\text{HP}} = 15.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{P}^+$), 7.10 (m, 2 H, B-Teil eines $[\text{AB}]_2\text{X}$ -Systems, $^3J_{\text{BA}} = 8.7$ Hz, $^4J_{\text{BX}} = 2.5$ Hz, 3',5'-Aryl-H), 7.20 (m, 2 H, A-Teil eines $[\text{AB}]_2\text{X}$ -Systems, $^3J_{\text{AB}} = 8.7$ Hz, 2',6'-Aryl-H), 7.62 (m, 2 H, M-Teil eines $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 3,5-Aryl-H), 7.69-7.97 (m, 1 H, B-Teil eines $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 4-Aryl-H, 15 H, $-\text{P}^+$ -Aryl-H), 8.11 (m, 2 H, A-Teil eines $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 2,6-Aryl-H)

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / TMS):

δ [ppm] = 27.55 (d, $^1J_{\text{CP}} = 46.9$ Hz, CH_2), 117.60 (d, $^1J_{\text{CP}} = 85.6$ Hz, 1''-C), 122.37 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.2$ Hz, 2',6'-C), 125.63 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.6$ Hz, 4'-C), 128.57 (1-C), 128.91 (3,5-C), 129.67 (2,6-C), 130.06 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.4$ Hz, 2'',6''-C), 131.96 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.5$ Hz, 3',5'-C), 133.97 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.9$ Hz, 3'',5''-C), 134.05 (4-C), 135.08 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.9$ Hz, 4''-C), 150.43 (d, $^5J_{\text{CP}} = 4.3$ Hz, 1'-C), 164.32 (d, $^7J_{\text{CP}} = 1.5$ Hz, C=O)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3053, 3005 (=C-H), 2988, 2857, 2769 (-C-H), 1736 (C=O), 1600, 1587, 1502 (C=C), 1437 (P-Phenyl), 1263, 1204 (=C-O-C), 750, 687 (=C-H-Deform., out of plane, 5 benachbarte H)

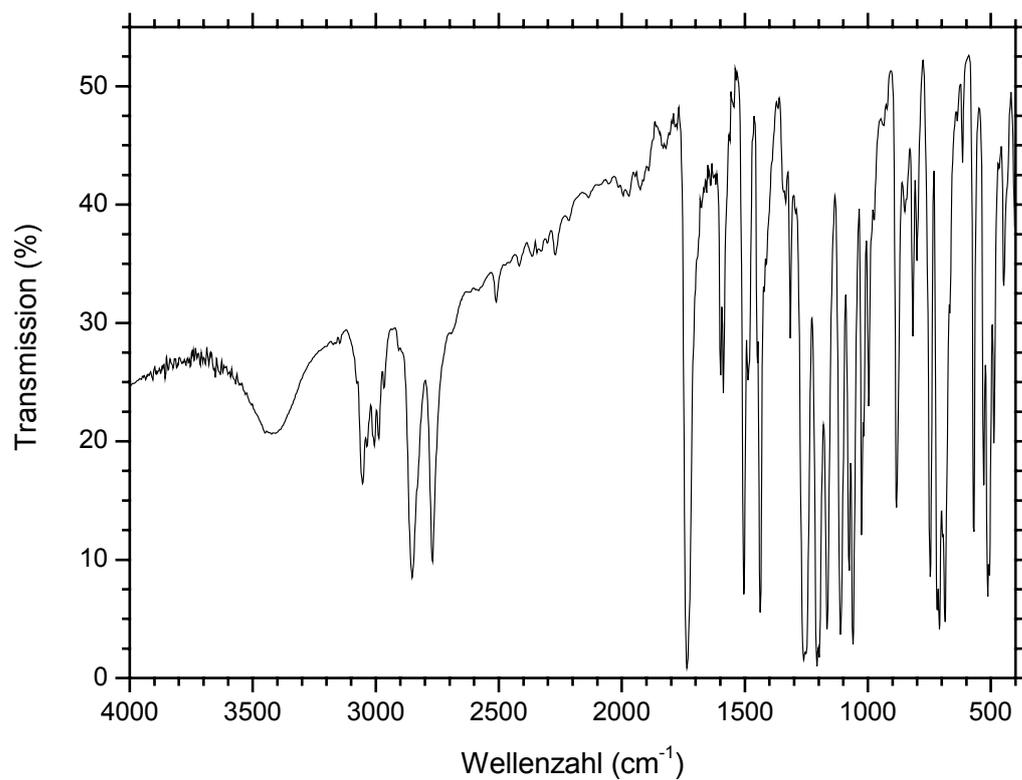


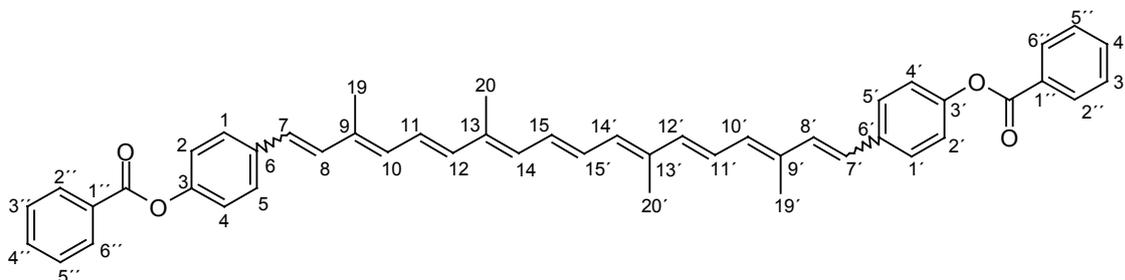
Abb. 94: IR-Spektrum (KBr) von **39**

$^{31}\text{P}\text{-}\{^1\text{H}\}$ -NMR (200 MHz / [D₆]DMSO / 85%ige H₃PO₄):

δ [ppm] = 24.49

Versuch 18: **3,3'-Dibenzoyloxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin** *oder*
1,18-Bis-(4-benzoyloxyphenyl)-3,7,12,16-tetramethyl-
(1EZ,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17EZ)-octadecanonaen **40**

$$M(C_{48}H_{44}O_4) = 684.87 \text{ g/mol}$$



Eine Mischung von 4.43 g (8.00 mmol) Phosphoniumsalz **39** und 120 ml absolutem THF werden nach Zugabe von 7.3 ml (12 mmol) einer 1.6 M Butyllithium-Lösung in Hexan (kurzzeitige Kühlung mit Eisbad) unter Stickstoff 20 min lang gerührt. Man gibt 30 ml trockenes Dichlormethan zu und tropft innerhalb 10 min eine Lösung von 0.78 g (2.6 mmol) C₂₀-Dialdehyd **34** in 30 ml trockenem Dichlormethan zu. Der Ansatz wird 30 min bei RT gerührt und anschließend mit 150 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt. Man gibt 100 ml Chloroform zu, rührt kurz um, trennt die organische Phase ab und schüttelt die wässrige noch einmal mit 100 ml Chloroform aus. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wenig destilliertem Wasser neutral gewaschen und am Rotationsverdampfer von den Lösemitteln befreit. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Chloroform als Laufmittel chromatographiert, die Produktfraktion in etwas Dichlormethan gelöst, mit dem gleichen Volumenanteil Methanol versetzt und das Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt, wobei **40** auskristallisiert. Man erhält **40** nach Abfiltrieren und Trocknen im Ölpumpenvakuum als orange-rotes Pulver.

Ausbeute: 0.65 g (0.95 mmol) **40** (7Z,7'Z : 7E,7'Z \approx 1:1 bis 1:2, gemäß ¹H-NMR)
 36 %

Smp.: 238-240 °C

R_F-Wert: 0.76 (Chloroform)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 1.79 (s, 3 H, 19'-CH₃), 1.96 (s, 3 H, 20'-CH₃), 1.99 (s, 3 H, 19-CH₃), 2.05 (s, 3 H, 20-CH₃), 6.23-6.36 (m, 5 H, 10,10',12',14,14'-CH), 6.25 (d, 1 H, ³J = 12.5

Hz, 8'-CH), 6.42 (d, 1 H, $^3J = 12.5$ Hz, 7'-CH), 6.43 (d, 1 H, $^3J = 14.4$ Hz, 12-CH), 6.50-6.72 (m, 4 H, 11,11',15,15'-CH), 6.59 (d, 1 H, $^3J = 16.0$ Hz, 7-CH), 6.88 (d, 1 H, $^3J = 16.0$ Hz, 8-CH), 7.15 (m, 2 H, B-Teil eines $[AB]_2$ -Systems, $^3J_{BA} = 8.7$ Hz, 2',4'-Aryl-H), 7.18 (m, 2 H, B-Teil eines $[AB]_2$ -Systems, $^3J_{BA} = 8.7$ Hz, 2,4-Aryl-H), 7.32 (m, 2 H, A-Teil eines $[AB]_2$ -Systems, $^3J_{AB} = 8.7$ Hz, 1',5'-Aryl-H), 7.48 (m, 2 H, A-Teil eines $[AB]_2$ -Systems, $^3J_{AB} = 8.7$ Hz, 1,5-Aryl-H), 7.51 (m, 4 H, M-Teil eines $[AM]_2B$ -Systems, 3'',5''-Aryl-H), 7.64 (m, 2 H, B-Teil eines $[AM]_2B$ -Systems, 4''-Aryl-H), 8.21 (m, 4 H, A-Teil eines $[AM]_2B$ -Systems, 2'',6''-Aryl-H)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

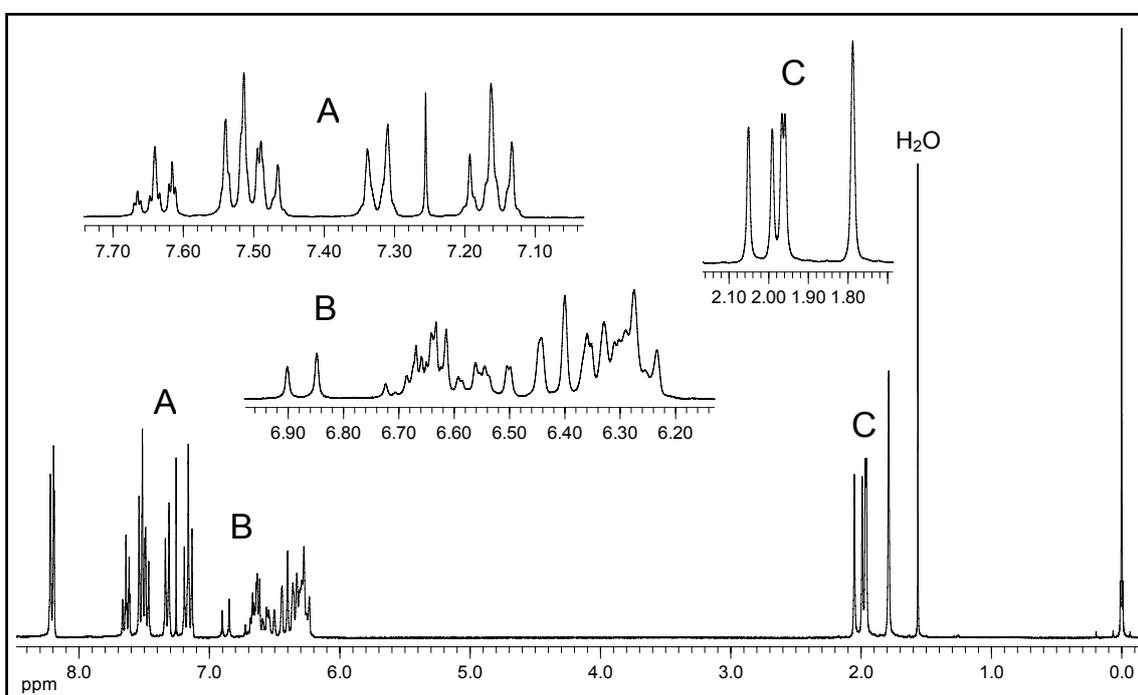


Abb. 95: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz / CDCl_3 / TMS) von **40**

^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz / CDCl_3 / TMS):

δ [ppm] = 12.81 (20'-C), 12.82 (20-C), 12.91 (19-C), 16.81 (19'-C), 121.10 (2',4'-C), 121.88 (2,4-C), 124.66 (11'-C), 124.96 (11-C), 126.43 (7-C), 127.24 (1,5-C), 127.73 (7'-C), 128.59 (3'',5''-C), 129.62 (1''-C), 130.11 (1',5'-C), 130.18 (2'',6''-C), 130.27 (15'-C), 130.35 (15-C), 133.06 (14'-C), 133.16 (14-C), 133.40 (10-C), 133.43 (10'-C), 133.59 (4''-C), 133.92 (8-C), 134.88 (8'-C), 134.96 (9'-C), 135.40 (9-C), 135.74 (6-C), 136.23 (6'-C), 136.51 (13-C), 136.58 (13'-C), 138.17 (12'-C), 138.41 (12-C), 149.67 (3'-C), 150.01 (3-C), 165.15 (C=O)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3032 (=C-H), 2994, 2917 (-C-H), 1737 (C=O), 1599, 1503 (C=C), 1451 (C-H-Deform.), 1263, 1199 (=C-O-C), 965 (=C-H-Deform., out of plane, Polyenkette), 706 (=C-H-Deform., out of plane, 5 benachbarte H)

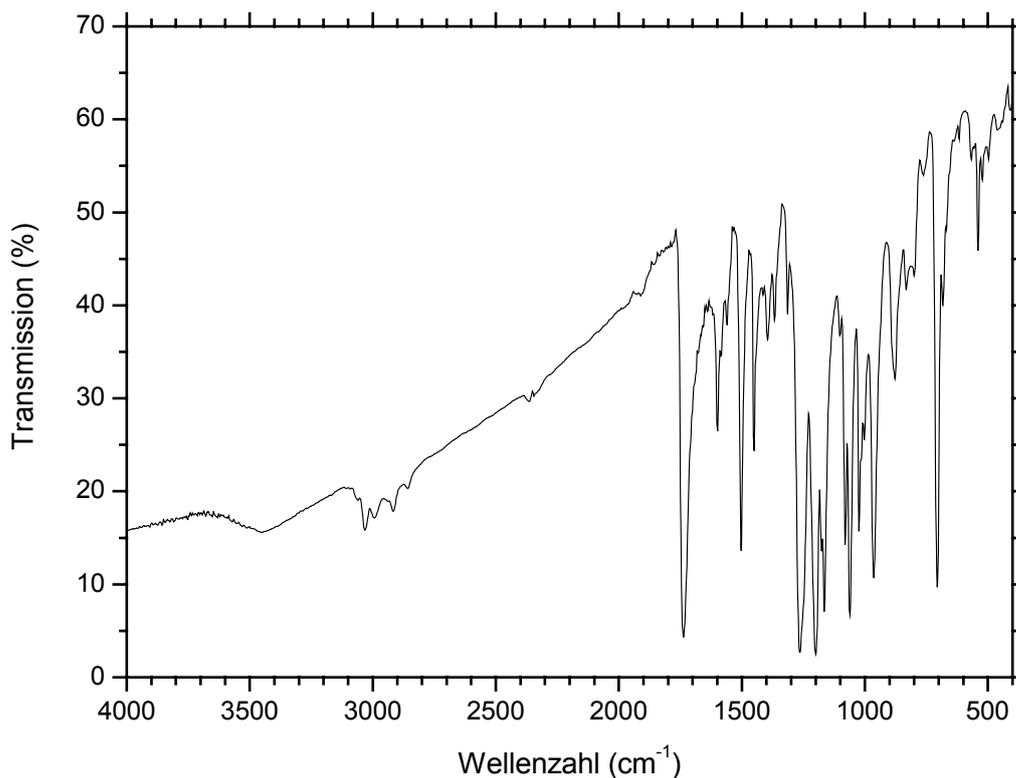


Abb. 96: IR-Spektrum (KBr) von **40**

UV/VIS (CHCl_3): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]) = 472 (118000), 497 (sh, 93000)

Isomerengemisch

= 458 (93000), 485 (133000), 519 (116000)

(all-*E*)-Isomer, gemäß $^1\text{H-NMR}$ nach Isomerisierung (in Heptan)

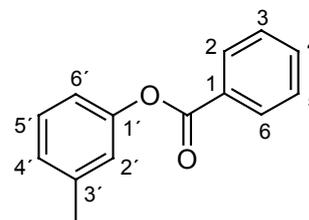
MS (EI, 70 eV, $T = 200\text{ }^\circ\text{C}$):

m/z (%) = 685 (1) [M^++1], 684 (2) [M^+], 578 (7) [M^+-106], 486 (3) [$\text{M}^+-\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_5$], 472 (5), 106 (8), 105 (100), 77 (14), 43 (3)

Versuch 19: Benzoessäure-*m*-tolylester 45

$$M(C_{14}H_{12}O_2) = 212.25 \text{ g/mol}$$

54.1 g (0.500 mol) *m*-Kresol **44** werden in einem 500 ml Dreihalskolben in 150 ml trockenem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 70.3 g (0.500 mol) Benzoylchlorid versetzt. Die zähe Masse wird 1 h auf 70 °C erwärmt und nach dem Abkühlen 20 h stehen gelassen. Zur Aufarbeitung gießt man das Reaktionsgemisch in 150 ml Eiswasser und säuert mit ca. 150 ml konz. Salzsäure an (pH-Wert = 2 – 3). Die wässrige Lösung wird dreimal mit 200 ml Diethylether ausgeschüttelt, die vereinigten Etherphasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der zunächst noch ölige Rückstand wird in wenig Ethanol umkristallisiert.



Ausbeute: 100.2 g (0.4721 mol) **45**

94 %

Lit.^[171]: 78 %

Smp.: 53 °C (Ethanol)

Lit.^[171]: 57 °C (Methanol)

R_f -Wert: 0.80 (Diethylether/Hexan 1:2)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 2.37 (s, 3 H, -CH₃), 6.98-7.09 (m, 3 H, 2',4',6'-Aryl-H), 7.29 (m, 1 H, 5'-Aryl-H), 7.48 (m, 2 H, M-Teil eines [AM]₂B-Systems, 3,5-Aryl-H), 7.61 (m, 1 H, B-Teil eines [AM]₂B-Systems, 4-Aryl-H), 8.19 (m, 2 H, A-Teil eines [AM]₂B-Systems, 2,6-Aryl-H)

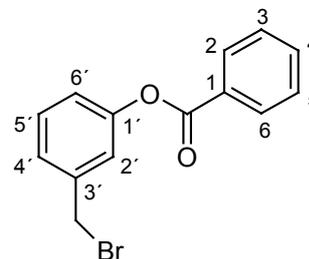
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3044, (=C-H), 2920 (-C-H), 1735 (C=O), 1597, 1584, 1485 (C=C), 1450 (C-H-Deform.), 1269, 1236 (=C-O-C), 782, 710 (=C-H-Deform., out of plane, 3 bzw. 5 benachbarte H)

Versuch 20: Benzoessäure-3-(brommethyl)-phenylester 46

$$M(C_{14}H_{11}BrO_2) = 291.14 \text{ g/mol}$$

95.0 g (0.448 mol) des Esters **45** werden in 600 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst und nach Zugabe von 79.7 g (0.448 mol) *N*-Bromsuccinimid und 100 mg AIBN auf 100 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Nach Anspringen der Reaktion (erkennbar durch heftiges Sieden) lässt man noch 2½ h Rückfluss kochen und



kühlt dann auf RT ab. Das auf der Oberfläche schwimmende Succinimid wird über einen Büchnertrichter abgesaugt und gründlich mit 200 ml Diethylether gewaschen. Nach Entfernen der Lösemittel am Rotationsverdampfer wird das viskose Öl zum Erstarren bei 5 °C gelagert. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man feine weiße Nadeln.

Ausbeute: 85.1 g (0.292 mol) **46**

65 %

Lit.^[173] : 60 %

Smp.: 114-116 °C (Ethanol)

R_f -Wert: 0.71 (Diethylether/Hexan 1:2)

¹H-NMR (300 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 4.49 (s, 2 H, -CH₂Br), 7.16 (m, 1 H, 6'-Aryl-H), 7.29 (m, 2 H, 2',4'-Aryl-H), 7.39 (m, 1 H, 5'-Aryl-H), 7.51 (m, 2 H, M-Teil eines [AM]₂B-Systems, 3,5-Aryl-H), 7.64 (m, 1 H, B-Teil eines [AM]₂B-Systems, 4-Aryl-H), 8.20 (m, 2 H, A-Teil eines [AM]₂B-Systems, 2,6-Aryl-H)

¹³C-¹H-NMR (75 MHz / CDCl₃ / TMS):

δ [ppm] = 32.53 (CH₂Br), 121.81 (6'-C), 122.38 (2'-C), 126.48 (4'-C), 128.62 (3,5-C), 129.34 (1-C), 129.84 (5'-C), 130.19 (2,6-C), 133.72 (4-C), 139.37 (3'-C), 151.06 (1'-C), 164.99 (C=O)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3053, 3033 (=C-H), 1728 (C=O), 1589, 1483 (C=C), 1454 (C-H-Deform.), 1270, 1240 (=C-O-C), 787, 708 (=C-H-Deform., out of plane, 3 bzw. 5 benachbarte H)

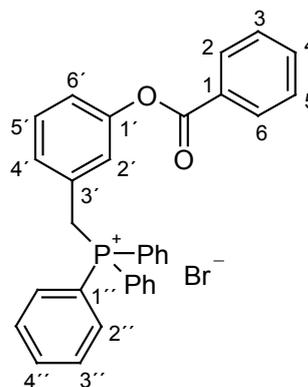
MS (EI, 70 eV, T = 60 °C):

m/z (%) = 292 (3) [$\text{M}^+(\text{}^{81}\text{Br})$], 290 (3) [$\text{M}^+(\text{}^{79}\text{Br})$], 211 (4) [M^+-Br], 105 (100) [$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}^+$], 77 (30) [C_6H_5^+], 51 (9) [C_4H_3^+]

Versuch 21: (3-Benzoyloxybenzyl)-triphenylphosphoniumbromid 47

$M(\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{BrPO}_2) = 553.44 \text{ g/mol}$

81.7 g (0.281 mol) des Bromids **46** werden unter leichtem Erwärmen in 800 ml Toluol gelöst. Nach Zugabe von 76.1 g (0.290 mol) Triphenylphosphan erhitzt man die Lösung 26 h unter Rückfluss, wobei das Phosphoniumsalz **47** als feiner weißer Feststoff ausfällt. Nach Erkalten der Reaktionsmischung wird das Produkt abgesaugt, mit etwas Diethylether gewaschen und zuerst



am Rotationsverdampfer, dann im Ölpumpenvakuum vom restlichen Lösemittel befreit.

Ausbeute: 139.1 g (0.2513 mol) **47**

89 %

Smp.: 277-281 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz / [D_6]DMSO / TMS):

δ [ppm] = 5.32 (d, 2 H, $^2J_{\text{HP}} = 15.8 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{P}^+$), 6.89 (m, 1 H, 2'-Aryl-H), 6.98 (m, 1 H, 4'-Aryl-H), 7.28 (m, 1 H, 6'-Aryl-H), 7.37 (m, 1 H, 5'-Aryl-H), 7.62 (m, 2 H, M-Teil eines $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 3,5-Aryl-H), 7.69-7.96 (m, 1 H, B-Teil eines $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 4-Aryl-H, 15 H, $-\text{P}^+$ -Aryl-H), 8.07 (m, 2 H, A-Teil eines $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 2,6-Aryl-H)

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / TMS):

δ [ppm] = 27.96 (d, $^1J_{\text{CP}} = 46.8$ Hz, CH_2), 117.54 (d, $^1J_{\text{CP}} = 85.7$ Hz, $1''\text{-C}$), 121.96 (d, $^5J_{\text{CP}} = 3.7$ Hz, $6'\text{-C}$), 124.42 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, $2'\text{-C}$), 128.36 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, $4'\text{-C}$), 128.40 (1-C), 128.99 (3,5-C), 129.61 (2,6-C), 129.62 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.5$ Hz, $3'\text{-C}$), 129.95 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.9$ Hz, $5'\text{-C}$), 130.06 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.5$ Hz, $2'',6''\text{-C}$), 133.98 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.9$ Hz, $3'',5''\text{-C}$), 134.15 (4-C), 135.05 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.9$ Hz, $4''\text{-C}$), 150.42 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.7$ Hz, $1'\text{-C}$), 164.24 (d, $^6J_{\text{CP}} = 0.4$ Hz, C=O)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3043, 3009 ($=\text{C-H}$), 2988, 2857, 2780 ($-\text{C-H}$), 1752 (C=O), 1602, 1587, 1478 (C=C), 1434 (P-Phenyl), 1225 ($=\text{C-O-C}$), 791, 749, 693 ($=\text{C-H-Deform.}$, out of plane, 3 bzw. 5 benachbarte H)

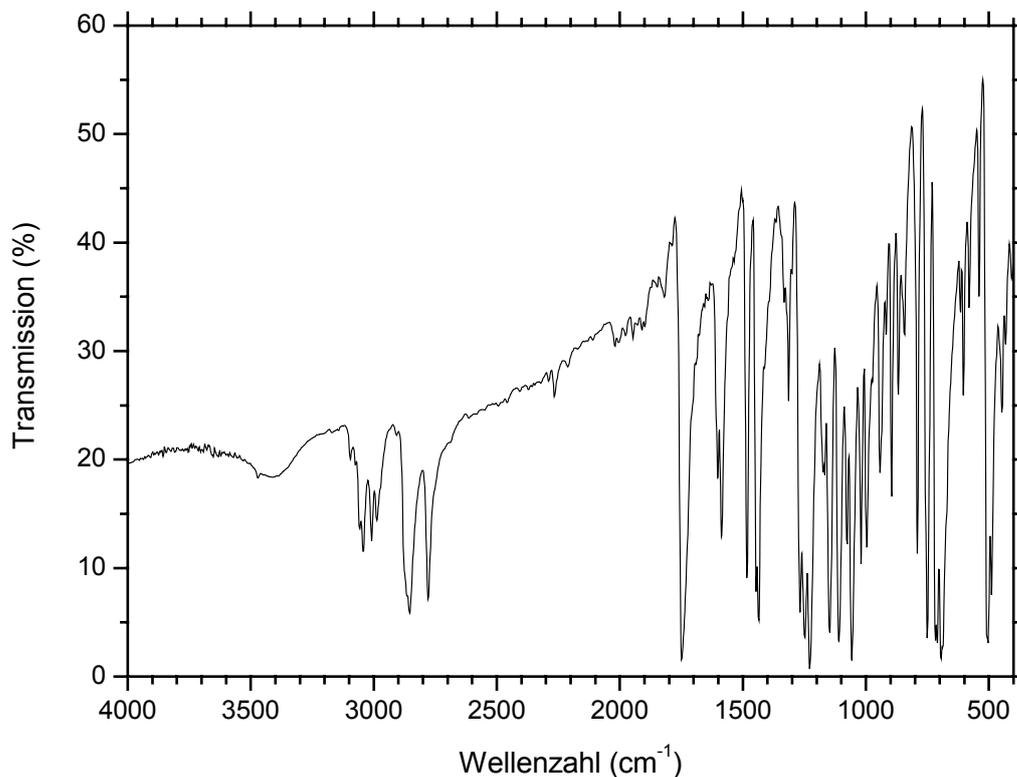


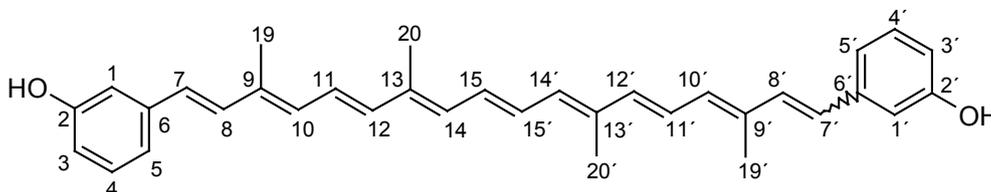
Abb. 97: IR-Spektrum (KBr) von **47**

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (200 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / 85%ige H_3PO_4):

δ [ppm] = 24.42

Versuch 22: **2,2'-Dihydroxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin** *oder*
1,18-Bis-(3-hydroxyphenyl)-3,7,12,16-tetramethyl-
(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17EZ)-octadecanonaen **48**

$$M(C_{34}H_{36}O_2) = 476.66 \text{ g/mol}$$



In einem 500 ml Dreihalskolben mit Septum, Rückflußkühler und Tropftrichter mit Druckausgleich werden unter Argon 4.50 g (8.13 mmol) Phosphoniumsalz **47** in 200 ml THF (p. a.) suspendiert. Nach Abkühlen auf -78°C mit einem Aceton/Trockeneisbad werden unter Rühren innerhalb 30 min 6.1 ml (9.8 mmol) einer 1.6 M Butyllithium-Lösung in Hexan mit einer Spritze zugegeben und es wird 1 h weitergerührt. Anschließend tropft man innerhalb 30 min eine Lösung von 0.30 g (1.0 mmol) C_{20} -Dialdehyd **34** in 60 ml THF (p. a.) zu, lässt die Reaktionsmischung langsam über Nacht auf RT aufwärmen (Kältebad wird bis dahin beibehalten) und rührt noch weitere 72 h. Zur Aufarbeitung gibt man 150 ml destilliertes Wasser hinzu und entfernt das THF nach zweistündigem Rühren am Rotationsverdampfer. Die wässrige Phase wird zweimal mit 100 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit gesättigter Ammoniumchloridlösung, dann mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und nach Trocknen über Magnesiumsulfat am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der dunkelrote, ölige Rückstand wird an Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether 9:1 als Laufmittel chromatographiert. Die Produktfraktion wird in etwas Diethylether zum Rückfluss erhitzt, der orange Feststoff nach dem Abkühlen abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.15 g (0.31 mmol) **48** (all-*E* : 7*E*,7'*Z* \approx 1:1 bis 1:2, gemäß $^1\text{H-NMR}$)
 31 %

Smp.: 237-241 $^\circ\text{C}$ (Diethylether)

R_f -Wert: 0.57 (Dichlormethan/Diethylether 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / TMS):

δ [ppm] = 1.72 (s, 3 H, 19'-CH₃), 1.94 (s, 3 H, 20'-CH₃), 1.97 (s, 3 H, 19-CH₃), 2.01 (s, 3 H, 20-CH₃), 6.22 (d, 1 H, $^3J = 12.5$ Hz, 8'-CH), 6.29-6.49 (m, 3 H, 10',12',14'-CH), 6.36 (d, 1 H, $^3J = 12.5$ Hz, 7'-CH), 6.39 (d, 1 H, $^3J = 9.6$ Hz, 14-CH), 6.43 (d, 1 H, $^3J = 10.6$ Hz, 10-CH), 6.47 (d, 1 H, $^3J = 14.4$ Hz, 12-CH), 6.56 (d, 1 H, $^3J = 16.1$ Hz, 7-CH), 6.56-6.68 (m, 4 H, 1',3',5'-Aryl-H, 11'-CH), 6.64 (m, 1 H, 3-Aryl-H), 6.68-6.78 (m, 3 H, 11,15,15'-CH), 6.88 (m, 1 H, 1-CH), 6.93 (d, 1 H, $^3J = 16.1$ Hz, 8-CH), 6.94 (m, 1 H, 5-CH), 7.11 (m, 1 H, 4'-CH), 7.13 (m, 1 H, 4-CH), 9.41 (s, 2 H, -OH,-OH')

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

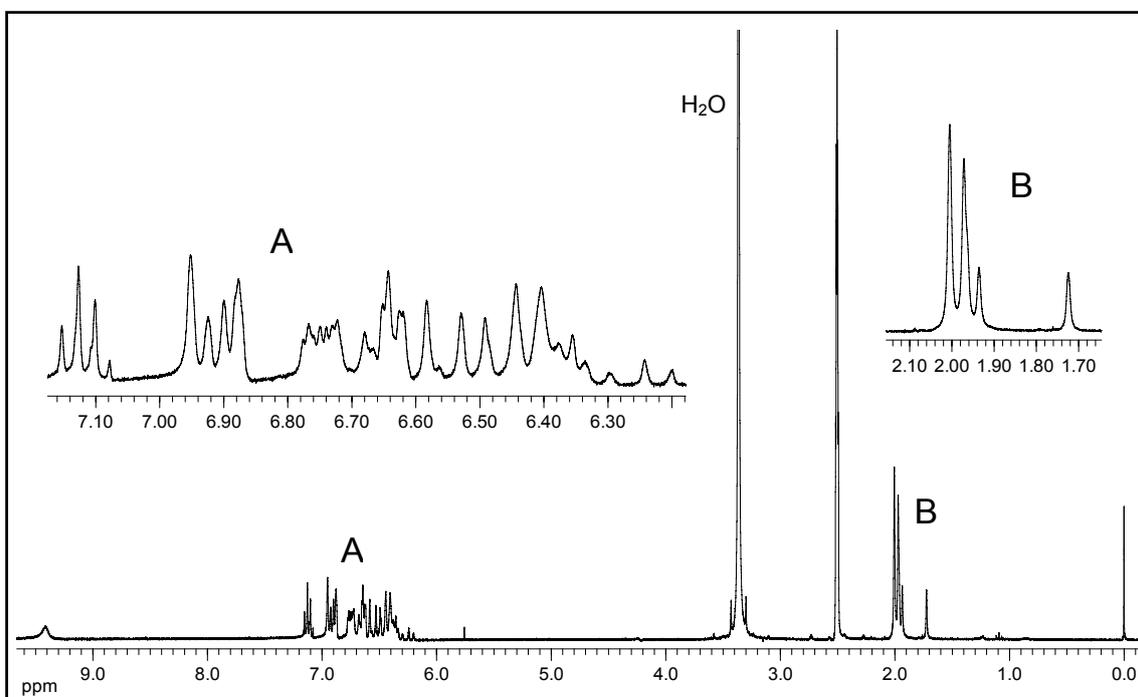


Abb. 98: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / TMS) von **48**

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz / $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ / TMS):

δ [ppm] = 12.50 (20,20'-C), 12.59 (19-C), 16.27 (19'-C), 112.62 (1-C), 113.87 (3'-C), 114.42 (3-C), 115.40 (5'-C), 117.35 (5-C), 119.56 (1'-C), 124.73 (11'-C), 125.19 (11-C), 127.52 (7-C), 128.67 (7'-C), 128.76 (4'-C), 129.48 (4-C), 130.51 (15,15'-C), 132.98, 133.03, 133.03 (8,10,14-C), 133.11, 133.13 (10',14'-C), 134.04 (8'-C), 134.74 (9'-C), 135.37 (9-C), 136.18 (13'-C), 136.35 (13-C), 137.79 (12'-C), 137.94 (12-C), 138.61 (6-C), 139.12 (6'-C), 156.74 (2'-C), 157.47 (2-C)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3406 (O-H), 3031 (=C-H), 2995, 2916 (-C-H), 1580, 1491 (C=C), 1445 (C-H-Deform.), 1157 (C-O), 962 (=C-H-Deform., out of plane, Polyenkette), 777 (=C-H-Deform., out of plane, 3 benachbarte H)

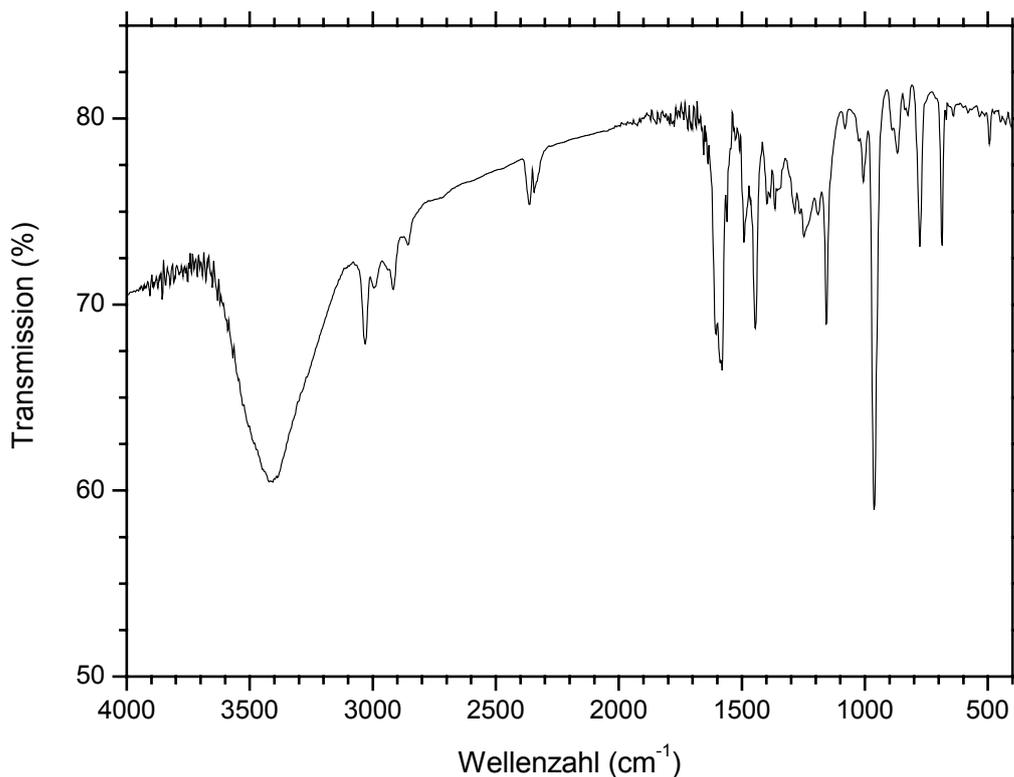


Abb. 99: IR-Spektrum (KBr) von **48**

UV/VIS (Ethanol): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 449 (sh, 99000), 471 (134000),
502 (109000)

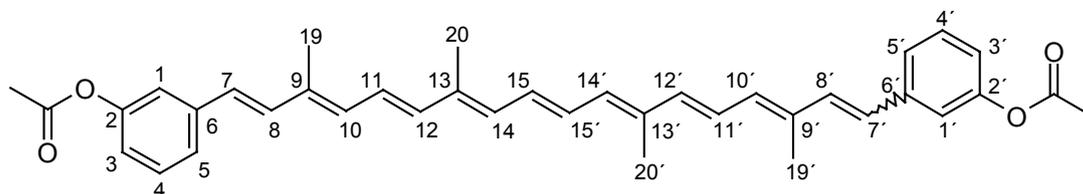
MS (EI, 70 eV, T = 280 °C):

m/z (%) = 477 (1) [$\text{M}^+ + 1$], 476 (3) [M^+], 370 (2) [$\text{M}^+ - 106$], 237 (2), 209 (3), 145 (4),
147 (4), 107 (13), 106 (69), 105 (28), 92 (10), 91 (100), 77 (17), 44 (9)

Elementaranalyse:	$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_2$ (M = 476.66)	ber.:	C: 85.67 %	H: 7.61 %
		gef.:	C: 83.01 %	H: 7.29 %

Versuch 23: **2,2'-Diacetoxy-16,17,18,16',17',18'-hexanor- ϕ,ϕ -carotin** *oder*
1,18-Bis-(3-acetoxyphenyl)-3,7,12,16-tetramethyl-
(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17EZ)-octadecanonaen **49**

$$M(C_{38}H_{40}O_4) = 560.73 \text{ g/mol}$$



0.080 g (0.17 mmol) des Carotinoids **48** werden unter Argon in 40 ml trockenem Dichlormethan und 1.7 ml (1.7 g, 21 mmol) Pyridin gelöst. Anschließend tropft man innerhalb 15 min 1.5 ml (1.6 g, 20 mmol) Essigsäurechlorid in 20 ml trockenem Dichlormethan zu und rührt noch 1½ h bei RT. Zur Aufarbeitung gießt man die Reaktionsmischung auf 100 ml destilliertes Wasser, trennt die organische Phase ab, wäscht sie zuerst mit gesättigter Ammoniumchloridlösung, dann mit destilliertem Wasser neutral und trocknet sie über Magnesiumsulfat. Nach Abziehen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 0.060 g (0.11 mmol) **49** (all-*E* : 7*E*,7'*Z* \approx 1:1 bis 1:2, gemäß $^1\text{H-NMR}$)
65 %

Smp.: 197-199 °C

R_f -Wert: 0.68 (Dichlormethan)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz / CDCl_3 / TMS):

δ [ppm] = 1.75 (s, 3 H, 19'-CH₃), 1.96 (s, 3 H, 20'-CH₃), 1.99 (s, 3 H, 19-CH₃), 2.03 (s, 3 H, 20-CH₃), 2.29 (s, 3 H, O=C-CH₃'), 2.31 (s, 3 H, O=C-CH₃), 6.25-6.36 (m, 2 H, 10',14'-CH). 6.26 (d, 1 H, $^3J = 12.2$ Hz, 8'-CH), 6.31 (d, 1 H, $^3J = 9.5$ Hz, 14-CH), 6.34 (d, 1 H, $^3J = 11.4$ Hz, 10-CH), 6.34 (d, 1 H, $^3J = 14.6$ Hz, 12'-CH), 6.39 (d, 1 H, $^3J = 14.6$ Hz, 7'-CH), 6.43 (d, 1 H, $^3J = 14.8$ Hz, 12-CH), 6.54 (dd, 1 H, $^3J = 11.3$ Hz, 14.6 Hz, 11'-CH), 6.54 (d, 1 H, $^3J = 16.1$ Hz, 7-CH), 6.61-6.72 (m, 3 H, 11,15,15'-CH), 6.88 (d, 1 H, $^3J = 16.1$ Hz, 8-CH), 6.91-6.97 (m, 2 H, 3',5'-Aryl-H),

6.92 (m, 1 H, 3-Aryl-H), 7.11 (m, 1 H, 1'-Aryl-H), 7.15 (m, 1 H, 1-Aryl-H), 7.28 (m, 1 H, 5-Aryl-H), 7.30 (m, 1 H, 4'-Aryl-H), 7.32 (m, 1 H, 4-Aryl-H)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

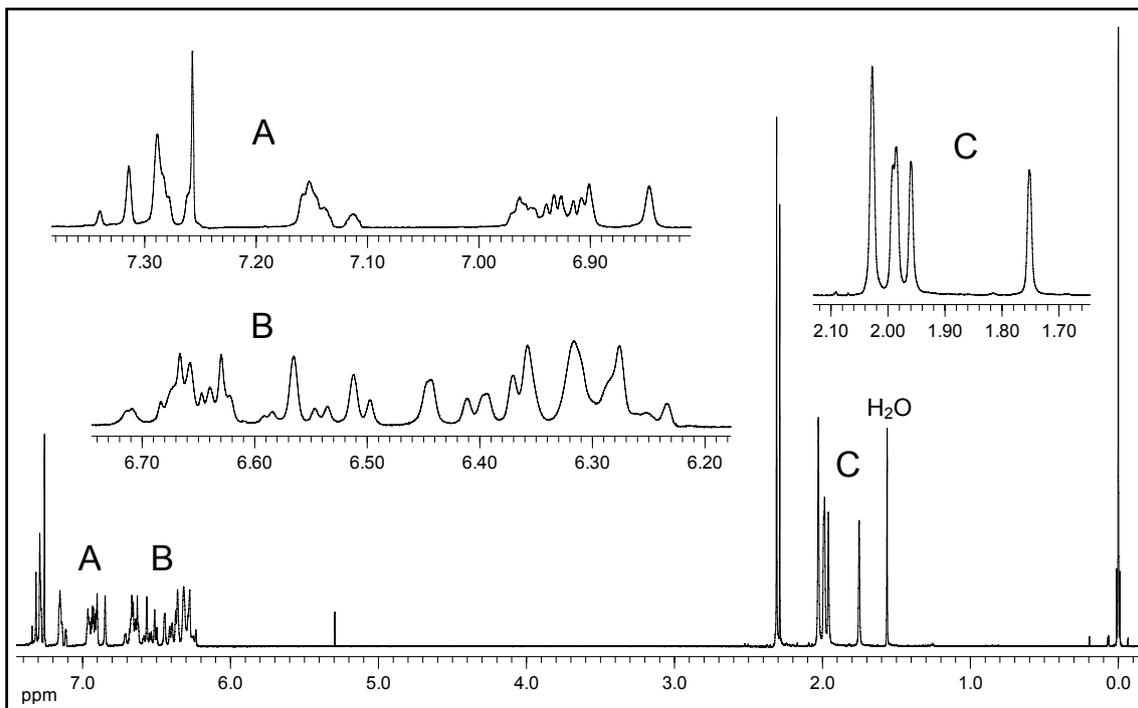


Abb. 100: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz / CDCl_3 / TMS) von **49**

^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz / CDCl_3 / TMS):

δ [ppm] = 12.82 (20,20'-C), 12.88 (19-C), 16.67 (19'-C), 21.16 (Acetyl- CH_3'), 21.17 (Acetyl- CH_3), 119.02 (1-C), 119.84 (3'-C), 120.11 (3-C), 122.24 (5'-C), 123.96 (5-C), 124.72 (11'-C), 124.92 (11-C), 126.39 (7-C), 126.50 (1'-C), 127.51 (7'-C), 128.75 (4'-C), 129.53 (4-C), 130.31 (15'-C), 130.40 (15-C), 133.11 (14'-C), 133.28 (14-C), 133.81 (10-C), 133.88 (10'-C), 134.65 (8-C), 134.90 (9'-C), 135.25 (9-C), 135.46 (8'-C), 136.57 (13'-C), 136.64 (13-C), 138.30 (12'-C), 138.63 (12-C), 139.59 (6-C), 140.11 (6'-C), 150.32 (2'-C), 151.08 (2-C), 169.48 (C=O)

Nicht gestrichene Stellungsziffern beziehen sich auf die (7*E*)-konfigurierte, gestrichene Stellungsziffern auf die (7'*Z*)-konfigurierte Molekülhälfte.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3028 (=C-H), 2995, 2916 (-C-H), 1764 (C=O), 1604, 1577, 1485 (C=C), 1433, 1367 (C-H-Deform.), 1207 (=C-O-C), 963 (=C-H-Deform., out of plane, Poly-enkette)

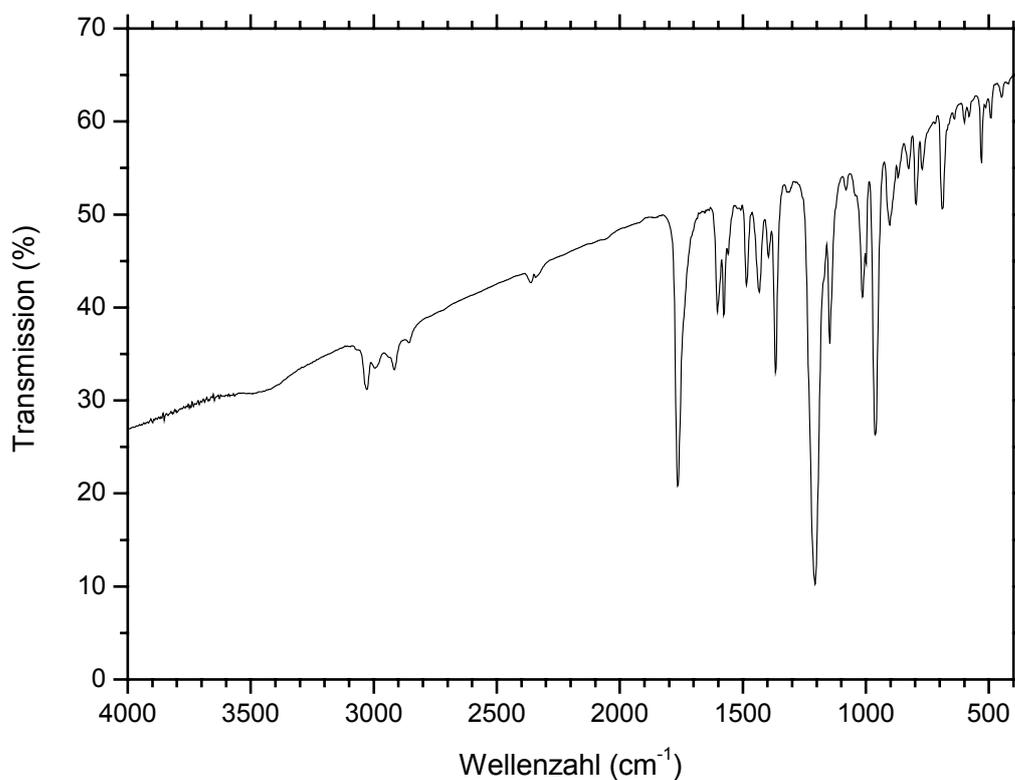


Abb. 101: IR-Spektrum (KBr) von **49**

UV/VIS (CHCl_3): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]) = 449 (sh, 116000), 480 (151000), 510 (120000)

MS (EI, 70 eV, T = 200 °C):

m/z (%) = 561 (3) [$\text{M}^+ + 1$], 560 (9) [M^+], 455 (3), 454 (9) [$\text{M}^+ - 106$], 237 (6), 209 (4), 147 (5), 145 (5), 107 (13), 106 (55), 105 (25), 91 (100), 77 (15), 65 (12), 51 (11), 43 (12), 39 (16)

Elementaranalyse:	$\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{O}_4$ (M = 560.73)	ber.:	C: 81.39 %	H: 7.19 %
		gef.:	C: 80.29 %	H: 6.93 %

5. Literaturverzeichnis

- [1] O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, **1971**.
- [2] K. Meyer, *Chem. Unserer Zeit* **2002**, *36*, 178-192.
- [3] H. Kläui, O. Isler, *Chem. Unserer Zeit* **1981**, *15*, 1-9.
- [4] P. Karlson, D. Doeneke, J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1994**.
- [5] G. Britton, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1551-1558.
- [6] A. A. C. v. Wijk, A. Spaans, N. Uzunbajakava, C. Otto, H. J. M. d. Groot, J. Lugtenburg, F. Buda, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1438-1445.
- [7] M. Cianci, P. J. Rizkallah, A. Olczak, J. Raftery, N. E. Chayen, P. F. Zagalsky, J. R. Helliwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9795-9800.
- [8] D. Siefermans-Harms, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 325-355.
- [9] R. J. Cogdell, H. A. Frank, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *895*, 63-79.
- [10] W. Kühlbrandt, D. N. Wang, Y. Fujiyoshi, *Nature* **1994**, *367*, 614-621.
- [11] A. A. Moskalenko, N. V. Karapetyan, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1996**, *51*, 763-771.
- [12] C. S. Foote, R. W. Denny, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6233-6235.
- [13] H. G. O. Becker, H. Böttcher, F. Dietz, D. Rehorek, G. Roewer, K. Schiller, H.-J. Timpe, *Einführung in die Photochemie*, 3. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1991**.
- [14] C. S. Foote, Y. C. Chang, R. W. Denny, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5216-5218.
- [15] H. Claes, T. O. M. Nakayama, *Z. Naturforsch. B.* **1959**, *14*, 746-747.
- [16] P. d. Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *274*, 532-538.
- [17] H. Sies, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1061-1075; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1058-1071.
- [18] G. W. Burton, K. U. Ingold, *Science* **1984**, *224*, 569-573.
- [19] W. Miki, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 141-146.
- [20] J. Terao, *Lipids* **1989**, *24*, 659-661.
- [21] H.-D. Martin, C. Jäger, C. Ruck, M. Schmidt, *J. Prakt. Chem.* **1999**, *341*, 302-308.

- [22] A. A. Woodall, S. W.-M. Lee, R. J. Weesie, M. J. Jackson, G. Britton, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1336*, 33-42.
- [23] M. Schmidt, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **2001**.
- [24] A. A. Woodall, G. Britton, M. J. Jackson, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1336*, 575-586.
- [25] B. P. Lim, A. Nagao, J. Terao, K. Tanaka, T. Suzuki, K. Takama, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1126*, 178-184.
- [26] D. Rengel, A. Díez-Navajas, A. Serna-Rico, P. Veiga, A. Muga, J. C. G. Milicua, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 179-187.
- [27] A. A. Woodall, G. Britton, M. J. Jackson, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 133S.
- [28] W. Stahl, A. Junghans, B. d. Boer, E. S. Driomina, K. Briviba, H. Sies, *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 305-308.
- [29] J. Gabrielska, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1285*, 167-174.
- [30] M. M. Mathews-Roth, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 147-156.
- [31] S. T. Mayne, *FASEB J.* **1996**, *10*, 690-701.
- [32] R. A. Bone, J. T. Landrum, L. M. Friedes, C. M. Gomez, M. D. Kilburn, E. Menendez, I. Vidal, W. Wang, *Exp. Eye Res.* **1997**, *64*, 211-218.
- [33] J. M. Seddon, U. A. Ajani, R. D. Sperduto, R. Hiller, N. Blair, T. C. Burton, M. D. Farber, E. S. Gragoudas, J. Haller, D. T. Miller, L. A. Yannuzzi, W. Willett, *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, *272*, 1413-1420.
- [34] R. A. Bone, J. T. Landrum, L. H. Guerra, C. A. Ruiz, *J. Nutr.* **2003**, *133*, 992-998.
- [35] P. S. Bernstein, M. D. Yoshida, N. B. Katz, R. W. McClane, W. Gellermann, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1998**, *39*, 2003-2011.
- [36] R. A. Bone, J. T. Landrum, S. T. Mayne, C. M. Gomez, S. E. Tibor, E. E. Twaroska, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 235-240.
- [37] L. I. Lonn, *Arch. Ophthalmol.* **1987**, *105*, 1590-1591.
- [38] B. Daicker, K. Schiedt, J. J. Adnet, P. Bermond, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1987**, *225*, 189-197.
- [39] C. Harnois, J. Samson, M. Malenfant, A. Rousseau, *Arch. Ophthalmol.* **1989**, *107*, 538-540.
- [40] G. Scheibe, *Angew. Chem.* **1936**, *49*, 563.
- [41] G. Scheibe, *Angew. Chem.* **1937**, *50*, 51.
- [42] G. Scheibe, *Angew. Chem.* **1937**, *50*, 212-219.

- [43] E. E. Jelly, *Nature* **1936**, *138*, 1009-1010.
- [44] E. E. Jelly, *Nature* **1937**, *139*, 631-632.
- [45] T. M. Raschke, J. Tsai, M. Levitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5965-5969.
- [46] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2. Auflage, John Wiley & Sons, New York, **1980**.
- [47] A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons*, Plenum Press, New York, London, **1971**.
- [48] M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-70.
- [49] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- [50] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, *Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1995**.
- [51] G. McRae, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 721-722.
- [52] H. J. Nolte, Dissertation, Philipps-Universität (Marburg/Lahn), **1973**.
- [53] R. M. Hochstrasser, M. Kasha, *Photochem. Photobiol.* **1964**, *3*, 317-331.
- [54] M. Buchwald, W. P. Jencks, *Biochemistry* **1968**, *7*, 834-843.
- [55] A. Hager, *Planta* **1970**, *91*, 38-53.
- [56] A. V. Ruban, P. Horton, A. J. Young, *J. Photochem. Photobiol. B.* **1993**, *21*, 229-234.
- [57] M. Havaux, *Trends Plant Sci.* **1998**, *3*, 147-151.
- [58] V. R. Salares, N. M. Young, P. R. Carey, H. J. Bernstein, *J. Raman Spectrosc.* **1977**, *6*, 282-288.
- [59] J. Lematre, B. Maudinas, C. Ernst, *Photochem. Photobiol.* **1980**, *31*, 201-205.
- [60] F. Zsila, Z. Bikadi, Z. Keresztes, J. Deli, M. Simonyi, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9413-9421.
- [61] F. Zsila, J. Deli, M. Simonyi, *Planta* **2001**, *213*, 937-942.
- [62] F. Zsila, Z. Bikadi, J. Deli, M. Simonyi, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2561-2563.
- [63] F. Zsila, Z. Bikadi, J. Deli, M. Simonyi, *Chirality* **2001**, *13*, 446-453.
- [64] F. Zsila, J. Deli, Z. Bikadi, M. Simonyi, *Chirality* **2001**, *13*, 739-744.
- [65] Z. Bikadi, F. Zsila, J. Deli, G. Mady, M. Simonyi, *Enantiomer* **2002**, *7*, 67-76.
- [66] S. Takagi, K. Takeda, K. Kameyama, T. Takagi, *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 2035-2040.
- [67] S. Takagi, K. Takeda, M. Shiroishi, *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 2217-2222.

- [68] S. Takagi, K. Takeda, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 1435-1440.
- [69] S. Takagi, S. Nakano, K. Kameyama, T. Takagi, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1561-1566.
- [70] S. Takagi, T. Yamagami, K. Takeda, T. Takagi, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1567-1572.
- [71] H. R. Christen, *Grundlagen der organischen Chemie*, 4. Auflage, Verlag Sauerländer, Diesterweg-Salle, Aarau, Frankfurt a. M., **1977**.
- [72] R. R. C. New, *Liposomes: a practical approach*, IRL Oxford University Press, New York, **1990**.
- [73] G. Löffler, P. E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2003**.
- [74] L. Stryer, *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, **1991**.
- [75] H. Schreier, *Pharm. Unserer Zeit* **1982**, *11*, 97-102.
- [76] J. N. Weinstein, *Pure Appl. Chem.* **1981**, *53*, 2241-2254.
- [77] H. Schreier, M. Raeder-Schikorr, *Pharm. Unserer Zeit* **1982**, *11*, 103-108.
- [78] M. J. Ostro, *Spektrum der Wissenschaft* **1987**, *3*, 94-103.
- [79] H. Träuble, D. H. Haynes, *Chem. Phys. Lipids* **1971**, *7*, 324-335.
- [80] S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *127*, 3-14.
- [81] B. Nordén, G. Lindblom, I. Jonás, *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 2086-2093.
- [82] B.-A. Johansson, G. Lindblom, A. Wieslander, G. Arvidson, *FEBS Lett.* **1981**, *128*, 97-99.
- [83] M. v. d. Ven, M. Kattenberg, G. v. Ginkel, Y. K. Levine, *Biophys. J.* **1984**, *45*, 1203-1210.
- [84] W. I. Gruszecki, J. Sielewiesiuk, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 405-412.
- [85] W. I. Gruszecki, J. Sielewiesiuk, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1069*, 21-26.
- [86] A. Milon, G. Wolff, G. Ourisson, Y. Nakatani, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 12-24.
- [87] T. Lazrak, A. Milon, G. Wolff, A.-M. Albrecht, M. Miehé, G. Ourisson, Y. Nakatani, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *903*, 132-141.
- [88] V. K. Chaturvedi, C. K. R. Kurup, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *860*, 286-292.
- [89] F. Castelli, S. Caruso, N. Giuffrida, *Thermochim. Acta* **1999**, *327*, 125-131.
- [90] C. Socaciu, R. Jessel, H. A. Diehl, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 79-88.
- [91] C. Socaciu, R. Jessel, S. Haertel, H. A. Diehl, *J. Med. Biochem.* **2000**, *4*, 71-82.

- [92] A. Shibata, Y. Kiba, N. Akati, K. Fukuzawa, H. Terada, *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *113*, 11-22.
- [93] I. Jezowska, A. Wolak, W. I. Gruszecki, K. Strzalka, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1194*, 143-148.
- [94] K. Strzalka, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1194*, 138-142.
- [95] W. K. Subczynski, E. Markowska, J. Sielewiesiuk, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1068*, 68-72.
- [96] W. K. Subczynski, E. Markowska, W. I. Gruszecki, J. Sielewiesiuk, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1105*, 97-108.
- [97] W. K. Subczynski, E. Markowska, J. Sielewiesiuk, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1150*, 173-181.
- [98] A. Wisniewska, W. K. Subczynski, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1368*, 235-246.
- [99] A. Milon, T. Lazrak, A.-M. Albrecht, G. Wolff, G. Weill, G. Ourisson, Y. Nakatani, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *859*, 1-9.
- [100] M. Rohmer, P. Bouvier, G. Ourisson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 847-851.
- [101] A. Yokoyama, G. Sandmann, T. Hoshino, K. Adachi, M. Sakai, Y. Shizuri, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4901-4904.
- [102] A. Yokoyama, Y. Shizuri, T. Hoshino, G. Sandmann, *Arch. Microbiol.* **1996**, *165*, 342-345.
- [103] M. Hara, H. Yuan, Q. Yang, T. Hoshino, A. Yokoyama, J. Miyake, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1461*, 147-154.
- [104] J. Schmitz, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **1998**.
- [105] C. Köpsel, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **1999**.
- [106] G. Wittig, G. Geissler, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *580*, 44-57.
- [107] A. Maercker, *Org. React.* **1965**, *14*, 270-490.
- [108] L. Horner, H. Hoffmann, H. G. Wippel, G. Klahre, *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 2499-2505.
- [109] W. S. Wadsworth, W. D. Emmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1733-1738.
- [110] D. E. Loeber, S. W. Russel, T. P. Toubé, B. C. L. Weedon, J. Diment, *J. Chem. Soc.* **1971**, 404-408.
- [111] G. Englert, K. Noack, E. A. Broger, E. Glinz, M. Vecchi, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 969-982.

- [112] Autorenkollektiv, *Organikum*, 19. Auflage, Barth, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Leipzig, Berlin, Heidelberg, **1993**.
- [113] R. Buchecker, P. Hamm, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 631-656.
- [114] F. Kienzle, R. E. Minder, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 439-452.
- [115] E. Lederer, *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **1933**, *113*, 1391-1392.
- [116] R. Fabre, E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1934**, *16*, 105-118.
- [117] S. Hertzberg, S. Liaaen-Jensen, C. R. Enzell, G. W. Francis, *Acta Chem. Scand.* **1969**, *23*, 3290-3312.
- [118] F. Stenhorst, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **1996**.
- [119] M. Korger, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **1998**.
- [120] M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1957**, *30*, 111-114.
- [121] M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1957**, *30*, 979-983.
- [122] F. Arcamone, B. Camerino, E. Cotta, G. Franceschi, A. Grein, S. Penco, C. Spalla, *Experientia* **1969**, *25*, 241-242.
- [123] W. Kohl, A. Achenbach, H. Reichenbach, *Phytochemistry* **1983**, *22*, 207-210.
- [124] R. Scherrers, Dissertation in Vorbereitung, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf).
- [125] R. D. G. Cooper, J. B. Davis, B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc.* **1963**, 5637-5641.
- [126] G. W. Francis, *Acta Chem. Scand.* **1972**, *7*, 2969-2971.
- [127] N. Okukado, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1974**, *47*, 2345-2346.
- [128] W. Göhring, S. Roth, M. Hanack, *Synth. Met.* **1987**, *17*, 259-262.
- [129] E. S. Hand, K. A. Belmore, L. D. Kispert, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1939-1948.
- [130] K. Ziegler, A. Späth, E. Schaaf, W. Schumann, E. Winkelmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1942**, *551*, 80-119.
- [131] G. Nybraaten, S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 370-372.
- [132] H. J. Bestmann, O. Kratzer, *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 1899-1908.
- [133] K. H. Bell, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2263-2264.
- [134] A. Maercker, W. Theysohn, *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, *746*, 70-83.
- [135] S. Batzri, E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *298*, 1015-1019.
- [136] D. W. Deamer, A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *443*, 629-634.
- [137] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. M. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L.-r. Hu, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297-303.

- [138] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 812, 55-65.
- [139] L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 858, 161-168.
- [140] B. A. Cornell, F. Separovic, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 733, 189-193.
- [141] H. Y. Yamamoto, A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 507, 119-127.
- [142] R. Mendelsohn, R. W. v. Holten, *Biophys. J.* **1979**, 27, 221-236.
- [143] V. D. Kolev, D. N. Kafalieva, *Photobiochem. Photobiophys.* **1986**, 11, 257-267.
- [144] A. Sujak, P. Mazurek, W. I. Gruszecki, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2002**, 68, 39-44.
- [145] A. Sujak, W. Okulski, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1509, 255-263.
- [146] W. I. Gruszecki, in *The Photochemistry of Carotenoids* (Hrsg.: H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton, R. J. Cogdell), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, **1999**, pp. 363-379.
- [147] W. I. Gruszecki, A. Sujak, K. Strzalka, A. Radunz, G. H. Schmid, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1999**, 54, 517-525.
- [148] C. Socaciu, P. Bojarski, L. Aberle, H. A. Diehl, *Biophys. Chem.* **2002**, 99, 1-15.
- [149] S. Kock, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **2004**.
- [150] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1991**.
- [151] G. Snatzke, in *Physikalische Methoden in der Chemie* (Hrsg.: B. Schröder, J. Rudolph), VCH, Weinheim, **1985**, pp. 241-276.
- [152] G. Snatzke, *Pure Appl. Chem.* **1979**, 51, 769-785.
- [153] N. Berova, N. Harada, K. Nakanishi, in *Encyclopedia Of Spectroscopy And Spectrometry* (Hrsg.: J. C. Lindon, G. E. Tranter, J. L. Holmes), Academic Press, London, **2000**, pp. 470-488.
- [154] N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy - Exciton Coupling in Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **1983**, p. 372.
- [155] M. Chéron, J. Bolard, *C. R. Acad. Sci. III.* **1981**, 292, 1125-1128.
- [156] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [157] P. L. Yeagle, W. C. Hutton, C.-H. Huang, R. B. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, 72, 3477-3481.
- [158] H. Brockerhoff, *Lipids* **1974**, 9, 645-650.

- [159] E. Widmer, M. Soukup, R. Zell, E. Broger, H. P. Wagner, M. Imfeld, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 861-867.
- [160] O. Isler, H. Lindlar, M. Montavon, R. Rüegg, G. Saucy, P. Zeller, *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39*, 2041-2053.
- [161] P. Molnar, E. Osz, F. Zsila, M. Simonyi, J. Deli, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2349-2357.
- [162] E. Widmer, R. Zell, E. A. Broger, Y. Cramer, H. P. Wagner, J. Dinkel, M. Schlageter, T. Lukac, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2436-2446.
- [163] G. Englert, F. Kienzle, K. Noack, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1209-1219.
- [164] F. Kienzle, R. E. Minder, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 242-249.
- [165] S. Hertzberg, S. Liaaen-Jensen, C. R. Enzell, G. W. Francis, *Acta Chem. Scand.* **1969**, *23*, 3290-3312.
- [166] M. Schank, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **1994**.
- [167] E. Reimann, *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, *750*, 109-127.
- [168] J. M. McIntosh, R. K. Leavitt, P. Mishra, K. C. Cassidy, J. E. Drake, R. Chadha, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1947-1952.
- [169] G. R. Pettit, M. P. Grealish, M. K. Jung, E. Hamel, R. K. Pettit, J.-C. Chapuis, J. M. Schmidt, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2534-2542.
- [170] D. Hellwinkel, F. Lämmerzahl, G. Hofmann, *Chem. Ber.* **1983**, *116*, 3375-3405.
- [171] A. K. Singh, S. M. Sonar, *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 1113-1122.
- [172] J. H. Barnes, J. Elks, F. F. Stephens, G. J. Waller, *J. Chem. Soc.* **1953**, 764-777.
- [173] C. Gnerre, M. Catto, F. Leonetti, P. Weber, P.-A. Carrupt, C. Altomare, A. Carotti, B. Testa, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4747-4758.

Anhang (verwendete Carotinoide)