

Kurzlebige Phenoxyradikale aus Polyphenolen des Grünen Tees und hochreaktiven Sauerstoffspezies: Detektion mittels zeitauflösender EPR-Spektroskopie**

Dmytro Neshchadin, Stephen N. Batchelor, Itzhak Bilkis und Georg Gescheidt*

Abstract: Polyphenole sind wirkungsvolle Antioxidantien. Ihre Reaktivität ist bereits intensiv untersucht worden. Die wesentliche Reaktion ist die Wasserstoffübertragung vom Polyphenol auf eine hochreaktive Sauerstoffspezies. Bisher wurde eine klare Charakterisierung derjenigen Spezies, welche direkt nach einer solchen Reaktion gebildet werden, nicht erreicht. Hier berichten wir über die H-Abstraktion von hochreaktiven sauerstoffzentrierten Spezies mit Katechin und im grünen Tee vorhandenen Polyphenolen. Mittels zeitauflösender EPR-Spektroskopie erhält man molekulare Informationen in Echtzeit. Indem wir damit oxidativen Stress durch hochreaktive Sauerstoffspezies nachstellen, zeigen wir, dass alle phenolischen OH-Gruppen im Wesentlichen über identische Reaktivitäten verfügen. Dies weist auf die Bedeutung statistischer (entropischer) Faktoren für antioxidative Vorgänge hin.

Oxidativer Stress und die Funktion von Antioxidantien sind Gegenstand aktueller Forschung auf zahlreichen Gebieten, seien dies molekulare Wissenschaften oder Medizin. Im Alltagszusammenhang erwies sich Tee als eine gute Quelle von Antioxidantien.^[1] Es gibt viele experimentelle Methoden, um das Potenzial von Antioxidantien zu quantifizieren. Die wesentliche Folgerung solcher Untersuchungen ist, dass die Aktivität der Polyphenole auf einer H-Atom-Übertragung (HAT) beruht. Die reaktive sauerstoffzentrierte Spezies wird

dadurch eliminiert, und es entsteht ein reaktionsträges Phenoxyradikal.^[2,3]

Drei ausgewählte prominent im grünen Tee vorhandene Polyphenole (Katechin (CA), Gallokatechin (GC) und Epigallokatechingallat (EGCG)) sind in Abbildung 1 wiederge-

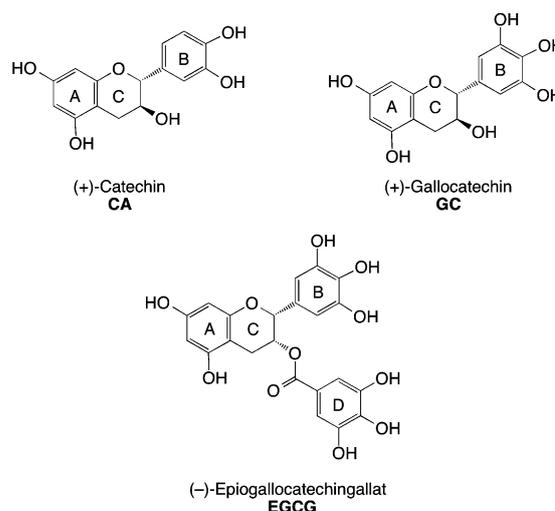


Abbildung 1. Ausgewählte Polyphenole aus grünem Tee.

geben. In den meisten Derivaten befinden sich an Ring A zwei phenolische OH-Gruppen in einer *meta*-Anordnung (Resorcinol). Ring B hat entweder zwei *ortho*-OH-Gruppen (Katechol) oder drei benachbarte OH-Substituenten. Ring C trägt eine nichtphenolische OH-Gruppe.

Klassische EPR-Spektroskopie wurde genutzt, um Einblicke in die Wirkungsweise von Antioxidantien auf molekularer Ebene zu erlangen.^[4-7] Zudem wurden Metaboliten identifiziert, die aus Reaktionen zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Polyphenolen stammen.^[8,9] Bezugnehmend auf solche Untersuchungen werden die Katechol- oder Gallatbestandteile als hauptsächliche Träger der antioxidativen Eigenschaften betrachtet, da sie die thermodynamisch stabilsten Phenoxyradikale (und Radikalanionen) bilden.^[7,10-13]

Andererseits weisen Untersuchungen mittels Pulsradio-lyse auf der ns-Zeitskala auf A-Ring-basierte Radikale hin.^[14-16] Diese Ergebnisse beruhen auf UV/Vis-Absorptionsspektren, und daher ist es nicht möglich, direkt auf eine bestimmte Molekülstruktur rückzuschließen.^[5] Man muss also auf eine Methode zurückgreifen, die eine klare strukturelle Zuordnung auf der entsprechenden Zeitskala ermöglicht.

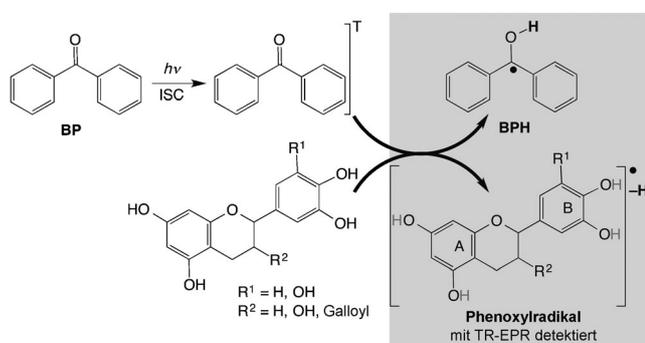
[*] Dr. D. Neshchadin, Prof. Dr. G. Gescheidt
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Technische Universität Graz, NAWI Graz
Stremayrgasse 9, 8010 Graz (Österreich)
E-Mail: g.gescheidt-demner@tugraz.at
Dr. S. N. Batchelor
Unilever Research Port Sunlight
Quarry Road East, Bebington, Wirral CH63 3JW (Großbritannien)
Prof. Dr. I. Bilkis
Institute of Biochemistry, Food Science & Nutrition
Faculty of Agriculture, Food & Environment
The Hebrew University of Jerusalem
POB 12, 76100, Rehovot (Israel)

[**] G.G. und D.N. danken NAWI Graz für Unterstützung. Bei den Gutachtern möchten wir uns für zahlreiche sehr hilfreiche Vorschläge bedanken.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details, Daten, welche für die Simulationen der EPR-Spektren verwendet wurden, eine Liste von Radikalen, die auch möglicherweise erzeugt worden sind, TR-EPR-Spektren, die mit AQS als H-Abstraktor erhalten wurden, cw-EPR-Spektrum, erhalten nach der Photolyse BP/Katechin, sowie CIDNP-Spektren, die nach Photolyse von Lösungen von Katechol und Resorcinol in Gegenwart von BP erhalten wurden, sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407995> zu finden.

Unsere ersten Ergebnisse erhielten wir mittels zeitauflösender ^1H -CIDNP-Spektroskopie (500-ns- bis 1-ms-Zeitskala). Diese NMR-basierte Methode lieferte Hinweise, dass eine H-Abstraktion nicht spezifisch stattfindet.^[17] Die CIDNP-Technik ist aber auch nur in der Lage, kurzlebige Radikale indirekt nachzuweisen. In dieser Arbeit stützen wir uns auf die zeitauflösende EPR-Spektroskopie (TR-EPR). Dies ermöglicht es, die Strukturen kurzlebiger Radikale auf der für diffusionskontrollierte Reaktionen wesentlichen ns-Zeitskala zu identifizieren, die für die reaktivsten ROS charakteristisch ist.

Benzophenon (**BP**) und das Natriumsalz der 9,10-Anthrachinon-2,6-disulfonsäure (**AQS**) sind ideale Reaktionspartner, um antioxidative Prozesse zu untersuchen. In ihren Triplettzuständen entspricht ihre HAT-Reaktivität derer besonders aktiver ROS.^[18–22] Mittels Lichtanregung (Laserblitz bei 355 nm, 6–8 ns) wird der Triplettzustand von **BP/AQS** erreicht; dieser reagiert mit dem Polyphenol, was zu den entsprechenden primären Radikalen im jeweiligen Grundzustand führt (Schema 1). Diese Radikale werden mit TR-



Schema 1. BP als Reagens zur Erzeugung kurzlebiger Phenoxyradikale.

EPR-Spektroskopie nachgewiesen, wobei das entsprechende Signal die Struktur der kurzlebigen Radikale widerspiegelt.^[23] Die exakte Struktur der Radikale wird aus den EPR-Parametern (Hyperfeinkopplungskonstanten, hfcs) mithilfe von DFT-Rechnungen abgeleitet.

Abbildung 2 zeigt das TR-EPR-Spektrum, welches nach Laserblitzphotolyse einer Lösung von **BP** und **CA** in Wasser/Acetonitril (5:1) bei pH 5.6 aufgenommen wurde. Man beobachtet mehrere wohldefinierte Resonanzen in verstärkter Emission und Absorption. Dies wird durch Magnetfeldeffekte hervorgerufen, welche die Empfindlichkeit dieser Methode bedeutend steigern.^[24] Hier wollen wir uns auf das Hyperfeinaufspaltungsmuster des EPR-Signals konzentrieren.

Die EPR-Spektren werden dominiert von einer Komponente mit vergleichsweise großen hfcs von 2.67, 1.15, 0.67 und 0.44 mT, jeweils für ein Proton (siehe Simulation; rote Linie in Abbildung 2). Üblicherweise beobachtet man bei der Oxidation (mit O_2) alkalischer Lösungen von Polyphenolen Spektren mit einer Breite von 0.7 mT,^[4,7,25–27] hier beträgt diese allerdings 4.93 mT. Damit ist eine Zuordnung zu einem B-Ring- oder Galloylradikal nicht möglich.

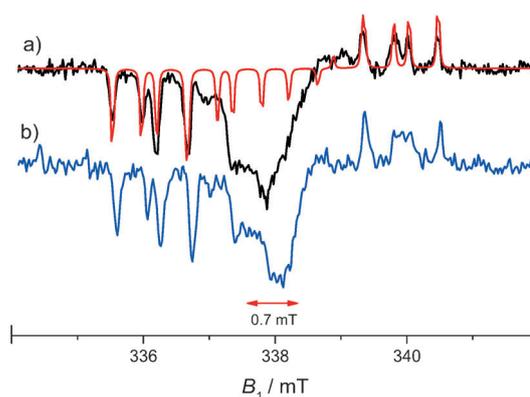


Abbildung 2. TR-EPR-Spektren von a) **CA/BP** (schwarz) und die entsprechende Simulation des EPR-Spektrums von **RB** (rot) b) **CA/[D₁₀]-BP** (RT, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 5:1). Der rote Doppelpfeil zeigt eine Spektrenbreite von 0.7 mT. Die entsprechenden Spektren mit **AQS** sind in den Hintergrundinformationen wiedergegeben.

Unter Berücksichtigung dieser um das ca. 7-fache größeren Spektrenbreite kommen A-Ring-basierte Radikale für die Zuordnung in Betracht. Zwei Radikale, **RA1** und **RA2**, in denen jeweils eines der beiden phenolischen Resorcinol-H-Atome abstrahiert ist, sind hier zu diskutieren. Die berechneten hfcs dieser beiden Radikale sind in Abbildung 3 zusammengefasst. (DFT-Rechnungen führen im allgemeinen zu einer sehr guten Vorhersage experimenteller hfcs.^[28–31])

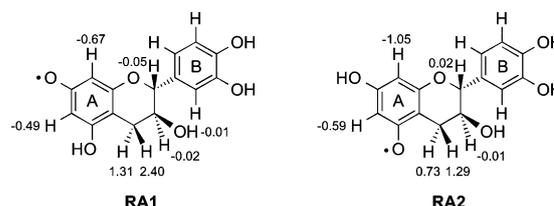


Abbildung 3. Die Radikale **RA1** und **RA2** und berechnete hfcs (B3LYP/TZVP, Angaben in mT).

Die berechneten Daten für **RA1** zeigen die größten hfcs für die beiden Methylenprotonen (β -Positionen) angrenzend am A-Ring (1.31, 2.40 mT), danach folgen die aromatischen Protonen am Ring A (0.49, 0.67 mT), während die restlichen ^1H -hfcs nicht ins Gewicht fallen (Abbildung 3). Eine ähnliche Spinverteilung besteht für **RA2**, wo die β -Protonen deutlich kleinere hfcs aufweisen (0.73, 1.29 mT). Damit hat **RA1** ein deutlich breiteres EPR-Spektrum als **RA2** (4.9 vgl. 3.7 mT). In der Tat sind die berechneten Daten für **RA1** in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen hfcs (*ber./exp.*): 2.40/2.67, 1.31/1.15, 0.67/0.67 und 0.49/0.44 mT. Damit weist das TR-EPR-Spektrum klar das Vorhandensein des A-Ring-zentrierten Phenoxyradikals **RA1** nach.

Der mittlere, kaum aufgelöste Bereich des EPR-Signals besteht aus mehreren Komponenten. Ein Beitrag stammt von Radikal **BPH** (siehe Schema 1), das gleichzeitig mit den Phenoxyradikalen gebildet wird und auf der kurzen Zeitskala unseres Experiments nachweisbar ist. Das Ketylradikal **BPH** hat ein schmales EPR-Spektrum (^1H -hfcs von ca. 0.3

(1H, OH), 0.12 (4H, *m*), 0.36 (2H, *p*), und 0.32 mT (4H, *o*); Breite ca. 2.8 mT).^[32,33] Dies wird durch den Einsatz von deuteriertem [D₁₀]-BP illustriert. Das Aussehen des mittleren Bereiches ändert sich wegen der deutlich kleineren Kopplungskonstanten von ²H verglichen mit den ¹H-hfcs (Faktor 0.12, Breite ca. 0.34 mT).

Trotz der Änderung bei Verwendung von [D₁₀]-BP bleibt ein breites EPR-Signal im zentralen Bereich. Dies kann mehreren Beiträgen zuordnen: zum einen dem Radikal RA1 (innere Linien, rotes Spektrum in Abbildung 2 und 4), dem oft beschriebenen B-Ring-Radikal RB und weiteren Radikalen mit schmalen EPR-Spektren (siehe die Hintergrundinformationen).^[4,7,25–27] Die Rekonstruktion des gesamten EPR-Signals ist in Abbildung 4 gezeigt.

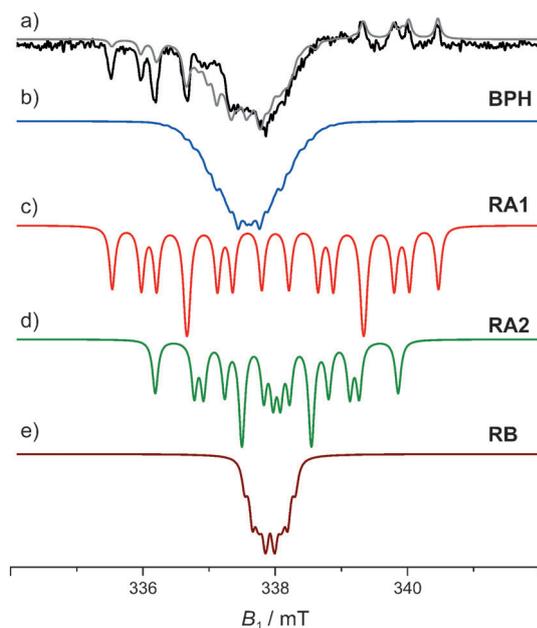


Abbildung 4. Komponenten des experimentellen TR-EPR-Spektrums von CA/BP bei pH 5.6. a) Experimentelles TR-EPR-Spektrum (schwarz) und entsprechende Simulation (alle Komponenten, grau), b) Simulation von BPH (blau),^[33] c) Simulation von RA1 (rot), d) Simulation von RA2 (grün), e) Simulation von RB (braun). Die Simulationen basieren auf berechneten Daten, die in guter Übereinstimmung mit den experimentellen sind (siehe die Hintergrundinformationen). Zur besseren Erkennbarkeit sind die einzelnen Komponenten ohne Polarisierungseffekte dargestellt; für die Gesamtsimulation (a) sind Polarisierungseffekte berücksichtigt.

Ein Test für die Zuordnung ist die pH-Abhängigkeit der Reaktion zwischen CA und BP; die zugehörigen TR-EPR-Spektren sind in Abbildung 5 dargestellt. In der Tat ist das EPR-Spektrum bei pH 8.1 klar unterschiedlich von demjenigen bei pH 5.6, während bei pH 6.8 eine Überlagerung der beiden Spektren zu sehen ist.

Bei pH 5.6 ist der A-Ring protoniert, bei pH 8.1 ist er einfach deprotoniert (und bei pH 6.8 besteht ein Gleichgewicht zwischen diesen Stufen).^[34–37] Damit führt eine H-Abstraktion bei pH 8.1 zu dem Radikal RA⁻. Die berechneten hfcs für RA⁻ sind in Einklang mit den experimentellen

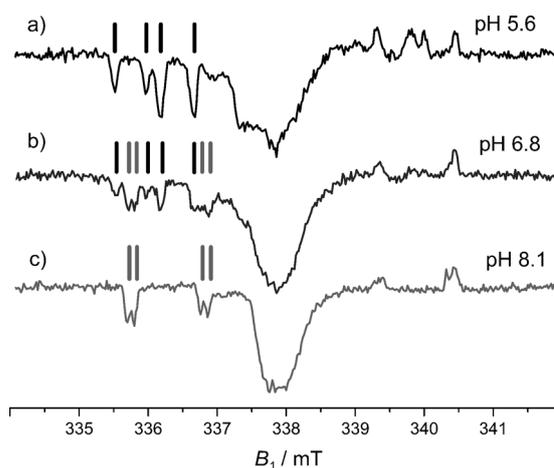


Abbildung 5. EPR-Spektren von CA/BP bei verschiedenen pH-Werten: a) pH 5.6, b) pH 6.8, c) pH 8.1.

Daten. Die größten werden analog zu RA1 für die β-Positionen im Bezug zum A-Ring vorausgesagt (*ber./exp.*: 2.41/2.53 und 1.36/1.05 mT), weiterhin für eines der aromatischen Protonen im A-Ring (1.10/1.05 mT, Abbildung 6). Diese Beobachtung stützt die Zuordnung einer H-Abstraktion am A-Ring.

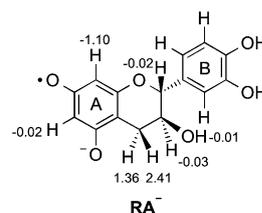


Abbildung 6. Das Radikal RA⁻ und berechnete hfcs (B3LYP/TZVP, Angabe in mT).

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen andere Radikale nach als diejenigen, die bisher mittels Oxidation alkalischer Lösungen von Polyphenolen und klassischer (EPR-)Spektroskopie dargestellt wurden. Daher ist es wesentlich, nachzuprüfen, ob die Photolyse von CA/BP kompatibel ist mit den bekannten Messungen. Folglich haben wir für diese Reaktion auch die Standarddetektion mittels klassischer EPR-Spektroskopie durchgeführt. Die Photolyse einer Lösung von BP/CA bei pH 8.1 führt zur Aufnahme vollkommen unterschiedlicher EPR-Spektren als auf der 50-ns-Zeitskala. Diese mit einer Zeitskala von Minuten aufgenommenen Spektren haben eine Breite von ca. 0.7 mT und stimmen perfekt mit denjenigen überein, die für mit O₂-Oxidation alkalischer Lösungen berichtet worden sind (B-Ring-Radikale; siehe die Hintergrundinformationen für das EPR-Spektrum.^[4,7,25–27,38,39]). So wird eindeutig gezeigt, dass die Zeitskala der Detektion darüber entscheidet, welche Radikale man nachweist.

Ist die oben beschriebene Reaktivität nur gültig für die Modellsubstanz Katechin, oder reagieren reelle Systeme, die reich an Polyphenolen sind, analog? Zu diesem Zweck haben

wir grünen Tee gebraut, genauso, wie man es im Haushalt macht. Solche Lösungen beinhalten neben verschiedensten Polyphenolen auch Komponenten wie Kohlenhydrate, Säuren und Proteine. Wir haben den pH-Wert so eingestellt, dass wir bei den gleichen Bedingungen gemessen haben wie für das Modellsystem. Abbildung 7 zeigt die TR-EPR-Spektren, die

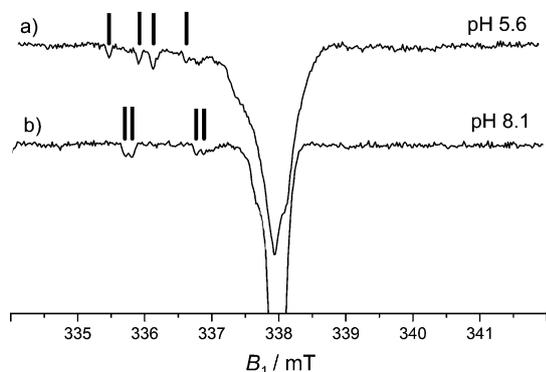


Abbildung 7. TR-EPR-Spektren nach Laserblitzphotolyse von frisch gebrautem grünen Tee/AQS bei a) pH 5.6 und b) pH 8.1.

für grünen Tee nach dem Zusatz von **BP** erhalten wurden. Das wesentliche Merkmal dieser Spektren ist, dass die äußeren Linien genau denen der „Katechinspektren“ entsprechen (Abbildung 5); zudem ist auch die pH-Abhängigkeit identisch. Die bedeutende Intensität dieser Außenlinien ist im Einklang damit, dass die meisten natürlichen Polyphenole über den Resorcinol-A-Ring verfügen. Dies weist die Bildung von A-Ring-Radikalen nach, wenn grüner Tee hochreaktiven ROS ausgesetzt wird.

Die bisher vorgestellten Experimente belegen, dass kinetische Effekte die Bildung primärer Radikale dominieren, wenn hochreaktive sauerstoffzentrierte Spezies Polyphenole angreifen, d. h., es besteht keine Regioselektivität bei der H-Abstraktion. Zweifelsfrei hängt die Bindungsdissoziationsenergie phenolischer Verbindungen von elektronischen Faktoren und der Möglichkeit von H-Brücken ab.^[29,40–44] Besteht allerdings eine Konkurrenzsituation zwischen mehreren phenolischen OH-Gruppen, so überwiegen stochastische Faktoren bei der Bildung primärer kurzlebiger Spezies, während thermodynamische Faktoren erst bei längeren Zeitskalen an Bedeutung gewinnen.

Dies haben wir in einer weiteren Serie von Versuchen nachgeprüft. Wir haben 1:1-Mischungen von Resorcinol und Katechol in Gegenwart von **BP** photolysiert und diese Reaktion mittels CIDNP verfolgt (Spektren siehe die Hintergrundinformationen). Während Resorcinol-basierte Phenoxylradikale thermodynamisch weniger stabil sind als Katecholradikale, zeigt die für kurzlebige Spezies empfindliche CIDNP-Technik klar das Vorhandensein beider Typen von Radikalen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Polyphenol-basierte Antioxidantien nicht rein durch thermodynamische Faktoren wie Dissoziationsenergien der phenolischen OH-Bindungen charakterisiert werden können. Einen wesentlichen Anteil an den primär durch hohen oxidativen Stress gebildeten Radi-

kalen haben die thermodynamisch weniger bevorzugten Radikale vom Resorcinol-Typ (A-Ring).

Diese kinetischen Effekte bieten eine Erklärung für zahlreiche nachgewiesenen Metaboliten.^[45–47] Zusätzlich sind solche Kurzzeitphänomene wesentlich in (anti)oxidativen Prozessen, da Polyphenole mit nichtkonjugierten (Poly)Phenol-Bestandteilen, wie unsere Ergebnisse zeigen, an mehreren Stellen gleichzeitig reagieren können.

Die nichtspezifische H-Abstraktion im ns-Zeitbereich führt sowohl zu stabilisierten als auch zu reaktiven Phenoxylradikalen. Bemerkenswerterweise ist dies in Einklang mit Klassifizierungen basierend auf dem TEAC-Assay,^[48] wobei Resorcinolbestandteile nicht als besonders aktive Antioxidantien gelten.^[3,49,50] Letztere^[3,46] könnten für schädliche Effekte verantwortlich sein.^[4,51]

Eingegangen am 6. August 2014,
veränderte Fassung am 6. September 2014
Online veröffentlicht am 24. Oktober 2014

Stichwörter: EPR-Spektroskopie · Oxidativer Stress · Polyphenole · Radikale · Wasserstoffabstraktion

- [1] L. R. Juneja, M. P. Kapoor, T. Okubo, T. P. Rao, *Green Tea Polyphenols: Nutraceuticals of Modern Life*, CRC, Boca Raton, FL, **2013**.
- [2] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouysegou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586–621; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 610–646.
- [3] C. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.
- [4] A. E. Hagerman, R. T. Dean, M. J. Davies, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *414*, 115–120.
- [5] W. Bors, C. Michel, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 1413–1426.
- [6] V. Butković, L. Klasinc, W. Bors, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2816–2820.
- [7] J. F. Severino, B. a. Goodman, C. W. M. Kay, K. Stolze, D. Tunega, T. G. Reichenauer, K. F. Pirker, *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *46*, 1076–1088.
- [8] J. V. Higdon, B. Frei, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, *43*, 89–143.
- [9] J. van Duynhoven, E. E. Vaughan, D. M. Jacobs, R. A. Kemperman, E. J. J. van Velzen, G. Gross, L. C. Roger, S. Possemiers, A. K. Smilde, J. Dore, J. A. Westerhuis, T. Van de Wiele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4531–4538.
- [10] M. Matxain Jon, D. Padro, M. Ristila, A. Strid, A. Eriksson Leif, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9629–9632.
- [11] E. Nazarpour, M. Zahedi, E. Klein, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10093–10104.
- [12] T. Yoshida, K. Hirozumi, M. Harada, S. Hitaoka, H. Chuman, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4564–4570.
- [13] P. Mulder, H.-G. Korth, D. a. Pratt, G. a. DiLabio, L. Valgimigli, G. F. Pedulli, K. U. Ingold, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2647–2655.
- [14] S. V. Jovanovic, Y. Hara, S. Steenken, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9881–9888.
- [15] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846–4851.
- [16] C. Cren-Olivé, P. Hapiot, J. Pinson, C. Rolando, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14027–14038.
- [17] D. Neshchadin, R. Levinn, G. Gescheidt, S. N. Batchelor, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7008–7016.
- [18] C. Evans, J. C. Scaiano, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4589–4593.

- [19] D. Griller, J. A. Howard, P. R. Marriott, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 619–623.
- [20] T. Yoshihara, M. Yamaji, T. Itoh, H. Shizuka, T. Shimokage, S. Tero-Kubota, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 993.
- [21] N. K. Bridge, G. Porter, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1958**, *244*, 259–275.
- [22] A. Bedini, E. De Laurentiis, B. Sur, V. Maurino, C. Minero, M. Brigante, G. Mailhot, D. Vione, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1445–1453.
- [23] M. Brustolon, E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, Wiley, Hoboken, **2009**.
- [24] S. Nagakura, H. Hayashi, T. Azumi, *Dynamic Spin Chemistry*, Kodansha and Wiley, Tokyo and New York, **1998**.
- [25] M. Adams, M. S. Blois, R. H. Sands, *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 774–776.
- [26] T. Oniki, U. Takahama, *J. Wood Sci.* **2004**, *50*, 545–547.
- [27] J. A. Pedersen, *CRC Handbook of EPR Spectra from Quinones and Quinols*, CRC, Boca Raton, FL, **1985**.
- [28] V. Barone, P. Cimino, E. Stendardo, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 751–764.
- [29] R. Amorati, G. F. Pedulli, M. Guerra, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3136–3141.
- [30] L. Hermosilla, P. Calle, J. M. G. de La Vega, C. Sieiro, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 1114–1124.
- [31] R. Batra, B. Giese, M. Spichty, G. Gescheidt, K. N. Houk, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18371–18379.
- [32] A. Kawai, T. Hidemori, K. Shibuya, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *414*, 378–383.
- [33] R. Wilson, *J. Chem. Soc. B* **1968**, 84–90.
- [34] S. V. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M. G. Simic, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 2497–2504.
- [35] S. Steenken, P. Neta, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 1134–1137.
- [36] M. Callaghan Rose, J. Stuehr, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7205–7209.
- [37] M. Eigen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 1–19; *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 489–508.
- [38] J. A. Kuhnle, J. J. Windle, A. C. Waiss, *J. Chem. Soc. B* **1969**, 613–616.
- [39] O. N. Jensen, J. A. Pedersen, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1609–1615.
- [40] R. Amorati, G. F. Pedulli, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 814–818.
- [41] G. Litwinienko, P. Mulder, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 14014–14016.
- [42] L. Valgimigli, R. Amorati, S. Petrucci, G. F. Pedulli, D. Hu, J. J. Hanthorn, D. A. Pratt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8348–8351; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8498–8501.
- [43] V. Thavasi, R. P. A. Bettens, L. P. Leong, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3068–3077.
- [44] K. U. Ingold, D. A. Pratt, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9022–9046.
- [45] L. Ridder, J. J. J. van der Hooft, S. Verhoeven, R. C. H. de Vos, R. J. Bino, J. Vervoort, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6033–6040.
- [46] J. J. J. van der Hooft, R. C. H. de Vos, V. Mihaleva, R. J. Bino, L. Ridder, N. de Roo, D. M. Jacobs, J. P. M. van Duynhoven, J. Vervoort, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7263–7271.
- [47] J. Perez-Jimenez, J. Hubert, L. Hooper, A. Cassidy, C. Manach, G. Williamson, A. Scalbert, *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 801–809.
- [48] K. Mukai, S. Mitani, K. Ohara, S.-I. Nagaoka, *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *38*, 1243–1256.
- [49] M. Arts, J. S. Dallinga, H. P. Voss, G. Haenen, A. Bast, *Food Chem.* **2004**, *88*, 567–570.
- [50] P. K. Das, M. V. Encinas, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4154–4162.
- [51] J. T. Fox, S. Sakamuru, R. Huang, N. Teneva, S. O. Simmons, M. Xia, R. R. Tice, C. P. Austin, K. Myung, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5423–5428.