

Viergliedrige cyclische Peroxide als Äquivalente angeregter Zustände: Eine neue Dimension der Bioorganischen Chemie

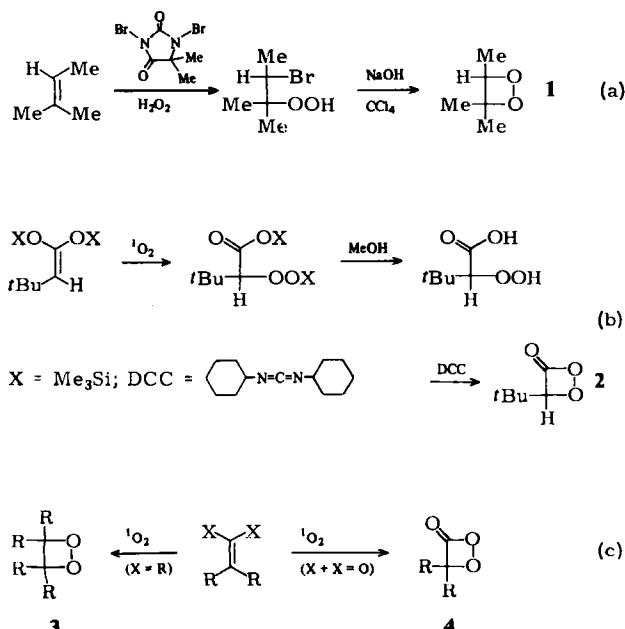
Von Waldemar Adam* und Giuseppe Cilento

Professor Günther O. Schenck zum 70. Geburtstag gewidmet

Bei der Beschäftigung mit Chemilumineszenz- und Biolumineszenzvorgängen drängt sich unweigerlich der Gedanke an die viergliedrigen cyclischen Peroxide - 1,2-Dioxetane und α -Peroxylactone (1,2-Dioxetanone) - auf. Während Chemilumineszenz und Biolumineszenz jedoch traditionelle Gebiete wissenschaftlicher Betätigung sind, befaßt man sich mit derartigen isolierbaren und charakterisierten hochenergetischen Molekülen erst seit etwa einem Jahrzehnt. Diese faszinierenden Verbindungen erzeugen in der Tat während ihres thermischen Zerfalls elektronisch angeregte Produkte, die sich durch Lichtemission zu erkennen geben. Wichtiger ist noch, daß solche Umwandlungen bei enzymkatalysierten Lumineszenz- und Dunkelprozessen beteiligt sind. In diesem Fortschrittsbericht sollen die neuesten Entwicklungen zusammengestellt werden. Dabei erheben wir keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern konzentrieren uns auf jene Aspekte, die weitere Aktivitäten erfordern.

1. Synthese

Das erste stabile 1,2-Dioxetan, das Trimethyllderivat **1**, wurde 1969 durch die Kopecky-Reaktionsfolge [Reaktion (a)] hergestellt und isoliert^[1], während das erste α -Peroxylacton (1,2-Dioxetanon), das *tert*-Butylderivat **2**, 1972 erhalten wurde [Reaktion (b)]^[2]. Seitdem sind weit über 100 Dioxetane **3** und ungefähr ein Dutzend α -Peroxylactone **4** isoliert und charakterisiert worden.



Außer den inzwischen klassischen Synthesewegen (a) und (b) hat sich die Photooxygenierung als recht allgemein anwendbar erwiesen. Sofern En-Reaktionen und Diels-Alder-Additionen nicht stören, bietet die photosensibilisierte Oxidation von Olefinen und Ketenen mit Singuletsauerstoff [Reaktion (c)] einen brauchbaren und einfachen Zugang zu den viergliedrigen cyclischen Peroxiden **3** bzw. **4**^[3]. Als Substituenten sind z. B. Alkyl-, Aryl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Dialkylamino- und neuerdings sogar Thioalkyl- und Thioarylgruppen^[4, 5], die zu den ersten schwefelsubstituierten 1,2-Dioxetanen **5** bzw. **6** führen, geeignet. Bei **5** und **6** wurde der Dioxetanring durch die Spiroadamantan-Substitution ausreichend stabilisiert, um eine spektroskopische Charakterisierung dieser Spezies bei -60°C zu ermöglichen.



Die Vorteile der Photooxygenierung [Reaktion (c)] gegenüber der klassischen Kopecky-Methode [Reaktion (a)] sind die gewöhnlich höheren Ausbeuten, die milden Bedingungen und die tiefen Reaktionstemperaturen. Vor allen Dingen jedoch lassen sich bei Verwendung von Sensibilisatoren (Tetraphenylporphyrin, polymergebundenes Bengalrosa usw.) und deuterierter Lösungsmittel (Chloroform, Dichlormethan, Aceton usw.) auch sehr instabile Dioxetane und α -Peroxylactone durch ^1H - oder ^{13}C -NMR-Spektroskopie nachweisen, ohne daß sie isoliert werden müßten.

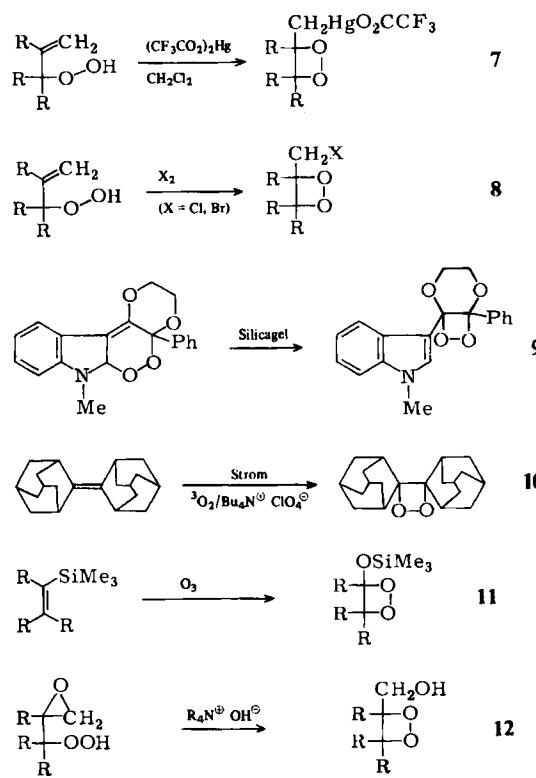
Weniger allgemein anwendbar sind z. B. Peroxymercuierung^[6], Peroxyhalogenierung^[7], silicagelkatalysierte Umlagerung von Endoperoxiden^[8], elektrochemische Oxygenierung^[9] und Ozonolyse von Vinylsilanen^[10]. Eine vielversprechende Synthesemethode, die zu hydroxymethylsub-

[*] Prof. Dr. W. Adam

Institut für Organische Chemie der Universität
Am Hubland, D-8700 Würzburg
und Departamento de Química, Universidad de Puerto Rico
Rio Piedras, PR 00931 (USA)

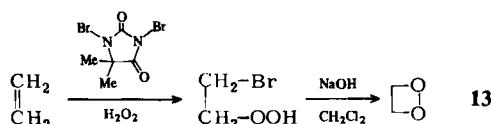
Prof. Dr. G. Cilento
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química
Universidade de São Paulo, C.P. 20.780, São Paulo (Brasilien)

stituierten Dioxetanen **12** führt, ist die basekatalysierte Ringöffnung von α -Hydroperoxyepoxiden^[11].



Mit den Dioxetanen **7**, **8**, **11** und **12** könnten aufgrund der funktionellen Gruppen Derivate biologischer Moleküle (Zucker, Steroide, Fettsäuren, Proteine, Pyrimidine, Purine usw.) hergestellt werden, die interessante Substrate für biologische Untersuchungen sein sollten.

Damit ist das Repertoire der Synthesemethoden für 1,2-Dioxetane und α -Peroxylactone umrissen. Die Ausbeuten sind gering, und der Anwendungsbereich der Methoden ist begrenzt – typisch für die Herstellung von viergliedrigen Ringen. Hinzu kommt die Labilität dieser hochenergetischen Verbindungen gegenüber Wärme und Licht, Säuren und Basen sowie Nucleophilen und Elektrophilen. Am schlimmsten wirken Übergangsmetallionen, die schon in Spuren Zersetzung hervorrufen.

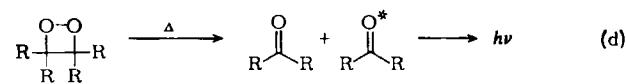


Folglich ist von den Syntheseexperten noch immer Pionierarbeit zu leisten, um diese äußerst ungünstige Situation zu verbessern, besonders wenn biologisch relevante viergliedrige cyclische Peroxide erzeugt werden sollen. Doch auch einfache Spezies für mechanistische Untersuchungen, z. B. unsubstituiertes Dioxetan **13**, bilden eine beachtliche Herausforderung. Das intermediäre Auftreten von **13** wird durch die Formaldehyd-Chemilumineszenz bei der Photo-oxygenierung von Ethylen in der Gasphase nahegelegt^[12]. Versuche, isolierbare Mengen durch Tieftemperatur-Photooxygenierung von gelöstem Ethylen in Trichlorfluorme-

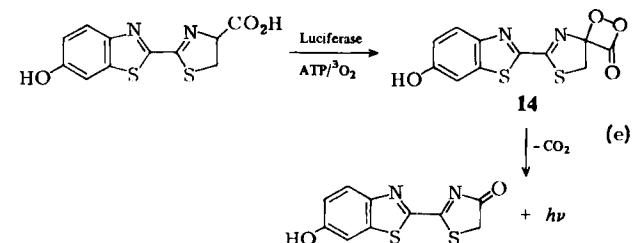
than herzustellen, sind fehlgeschlagen. Nicht einmal Spuren von Peroxiden waren nachzuweisen. Jedoch konnten wir kürzlich nach der klassischen Kopecky-Methode mg-Ausbeuten von Dioxetan **13** herstellen und isolieren. Die beobachtete Chemilumineszenz bei thermischer Zersetzung und die charakteristische NMR-Resonanz untermauern diesen Erfolg^[13].

2. Charakterisierung

Die herausragende Eigenschaft viergliedriger cyclischer Peroxide ist ihre Fähigkeit, während des Zerfalls Licht zu emittieren [Reaktion (d)]. In der Chemie ist dies als Chemilumineszenz, in der Biologie als Biolumineszenz bekannt.

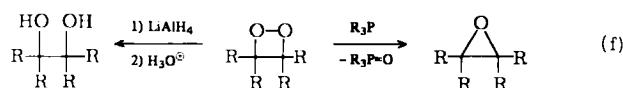


Eines der am besten untersuchten und mechanistisch am vollständigsten aufgeklärten Beispiele ist die Biolumineszenz der Leuchtkäfer [Reaktion (e)], bei der Luciferin mit dem Enzym Luciferase und ATP über das α -Peroxylacton **14** in das entsprechende Keton („Oxyluciferin“), CO_2 und Licht umgewandelt wird^[14]. Obwohl alle Dioxetane und α -Peroxylactone beim Zerfall Licht emittieren, wenn auch häufig nur schwach, ist der Umkehrschluß, daß diese Spezies bei allen chemischen oder biologischen Autoxidationen beteiligt sind, die unter Lichtemission ablaufen, keinesfalls richtig. Während bei chemischen Reaktionen zumindest prinzipiell die Möglichkeit besteht, die erwarteten Dioxetane und α -Peroxylactone zu isolieren oder auf unabhängigem Wege herzustellen, ist die Beweisführung bei biologischen Reaktionen indirekt und umständlich. Soweit wir wissen, ist noch kein natürliches Dioxetan oder α -Peroxylacton isoliert oder unabhängig hergestellt worden. Fraglos steht hier anspruchsvolle, aber auch lohnende Arbeit bevor.

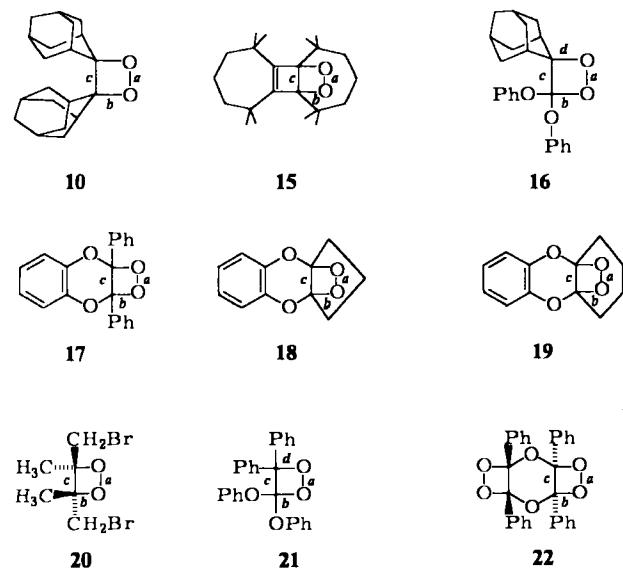


Welche Kriterien außer dem der Lichtemission [Reaktion (d)] können nun für die endgültige Charakterisierung angewendet werden, wenn es gelingt, natürliche viergliedrige cyclische Peroxide herzustellen und zu isolieren? Angesichts der zahlreichen bekannten Daten^[15] ist die spektroskopische Identifizierung einfach und verlässlich. Die Carbonylfrequenz bei 1870 cm^{-1} ist charakteristisch für α -Peroxylactone, bei Dioxetanen ist gewöhnlich die NMR-Spektroskopie brauchbar. Ringprotonen haben im allgemeinen chemische Verschiebungen von $\delta = 4.5$ bis 5.5, Ring-C-Atome von $\delta = 80$ bis 110.

Zur chemischen Identifizierung sind mehrere Kriterien geeignet. Neben der Lichtemission müssen bei der Thermolyse selbstverständlich die erwarteten Carbonylfragmente als Produkte austreten. Die Dioxetane lassen sich mit LiAlH_4 zu 1,2-Diolen reduzieren und mit Phosphanen zu Epoxiden desoxygenieren [Reaktion (f)]. Um die Charakterisierung zu erleichtern, müssen noch andere verlässliche und allgemein anwendbare chemische Umwandlungen entwickelt werden.



Bei weitem die zuverlässigste Methode ist die Röntgen-Strukturanalyse, die wichtige Strukturparameter liefert, z. B. Bindungslängen und Bindungswinkel. Ihre allgemeine Anwendbarkeit ist jedoch begrenzt. Einerseits muß das Dioxetan kristallin sein und gute Reflektoreigenschaften haben, andererseits müssen die Kristalle Röntgenbestrahlung überdauern, was Probleme aufwirft, da Dioxetane empfindlich gegenüber Strahleneinwirkungen sind. Trotz dieser Einschränkungen sind in dieser Richtung beachtliche Fortschritte erzielt worden. Die ersten Röntgen-Strukturanalysen gelangen bei den „superstabilen“ Dioxetanen **10**^[16] und **15**^[17], die aus 2,2'-Biadamantanyliden bzw. einem sterisch gehinderten Cyclobutadien erhalten worden waren (Tabelle 1). Neuerdings haben wir die Reihe der Dioxetane um die Verbindungen **16** bis **21** und sogar um das Bisdioxetan **22**^[18] erweitert. Bei **22** ist interessant, daß die beiden Dioxetanringe *anti* zueinander angeordnet und beträchtlich verdrillt sind, der Dioxanring jedoch fast planar ist. Dies überrascht besonders angesichts der Dioxetane **17**



bis **19**, bei welchen das Gegenteil der Fall ist: Der Dioxetanring ist im wesentlichen planar, der Dihydrodioxinring hat Bootform. Die stärkste Verdrillung wird bei **10** beobachtet; sie wird größtenteils durch sterische Wechselwirkungen der Adamantangruppen hervorgerufen (siehe Abschnitt 4). In **15** ist der Dioxetanring wegen des anellierten

Tabelle 1. Bindungslängen [pm] im Dioxetanring, Verdrillungswinkel [$^\circ$] des Dioxetanrings sowie Zerfallskonstanten [s^{-1}] der anellierten Dioxetane **17**–**19** [a].

Dioxetan	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	*	$10^3 k$
10	148	147.5	155		21.3	
15	149	149	155		0	
16	147	148	148	151	11.7	
17	155	144	161		0.8	1.00 ± 0.5
18	158	144	158		0	8.30 ± 0.5
19	149	149	150.5		0	6.00 ± 2.0
20	144	148	151		15.3	
21	150.5	148	155	143	9.6	
22	150	144	155.5		16.3	

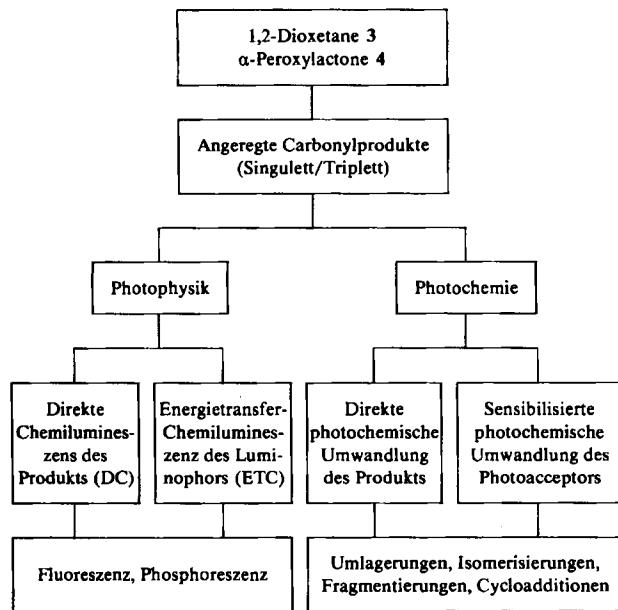
[a] $10^3 k$ (370.2 K), bestimmt durch Chemilumineszenzmessungen unter isothermen Bedingungen [18b].

Cyclobutenrings planar. In Zukunft wird man sicherlich versuchen, weitere Strukturdaten zu ermitteln, besonders da die wenigen hier vorgestellten Beispiele nicht *a priori* Vorhersagen über den Verdrillungsgrad des Dioxetanrings ermöglichen. – Röntgen-Strukturanalysen von α -Peroxy-lactonen konnten bisher aus Mangel an brauchbaren Kristallen nicht durchgeführt werden.

3. Anregungsausbeute

Wir haben gesehen, daß eine charakteristische Eigenschaft viergliedriger cyclischer Peroxide ihre Fähigkeit ist, elektronisch angeregte Carbonylprodukte zu erzeugen, z. B. Aldehyde, Ketone, Ester, Carbonsäuren und Anhydride. In diesem Sinne betrachten wir diese „hochenergetischen“ Moleküle als *Äquivalente angeregter Zustände*, da sie als chemische oder sogar biologische Vorstufen angeregter Zustände dienen. So erhaltene chemisch angeregte Zustände haben die gleichen photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften wie ihre durch Lichtanregung erzeugten Äquivalente. So zeigen sie von den bekannten photophysikalischen Phänomenen direkte Chemilumineszenz (DC) in Form von Fluoreszenz (Singulettzustände) und Phosphoreszenz (Tripletzustände) oder Energi transfer-Chemilumineszenz (ETC) mit einem entsprechenden lumineszierenden Photoacceptor, d. h. einem Luminophor, der anschließend entweder fluoresziert oder phosphoresziert (Schema 1). Hierbei ist es unwesentlich, ob das viergliedrige cyclische Peroxid chemischen oder biologischen Ursprungs ist (außer daß die Emissionen gegebenenfalls als Biolumineszenz bezeichnet werden). Das chemisch angeregte Carbonylprodukt kann direkt photochemische Umwandlungen wie Umlagerungen, Isomerisierungen, Fragmentierungen oder Cycloadditionen eingehen. Es sensibilisiert solche photochemischen Umwandlungen aber auch durch Energi transfer auf einen entsprechenden photoaktiven Acceptor (Schema 1).

Eines der zentralen analytischen Probleme betrifft die Bestimmung der Anregungsparameter. Dazu zählt die Ausbeute an singulett- (ϕ^S) und triplattangeregten Zuständen (ϕ^T) beim Zerfall von 1,2-Dioxetanen oder α -Peroxy-lactonen. Insbesondere würde man aus mechanistischen Gründen gerne die Gesamtausbeute der chemischen Anregung ($\phi^T + \phi^S$) und die Effizienz der Spinselaktivität (ϕ^T/ϕ^S). Zu diesem Zweck kann man entweder die Lichtausbeute der



Schema 1.

photophysikalischen Prozesse oder die chemische Ausbeute der photochemischen Reaktionen bestimmen (Schema 1). Diese Methoden wurden im Detail beschrieben^[19], so daß hier nur die wichtigsten Eigenschaften und Probleme, besonders bei enzymatisch erzeugten angeregten Zuständen, betrachtet werden sollen.

3.1. Lumineszenz-Untersuchungen

Für die Lumineszenz-Techniken, bei denen die Lichtausbeute experimentell bestimmt wird, sind die mathematischen Schlüsselbeziehungen für die direkte (DC) und die Energietransfer-Chemilumineszenz (ETC) in den Gleichungen (g) bzw. (h) angegeben. Im Falle der DC ist die wesentliche Voraussetzung, daß das angeregte Carbonyl-

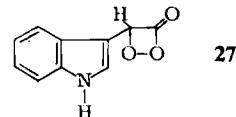
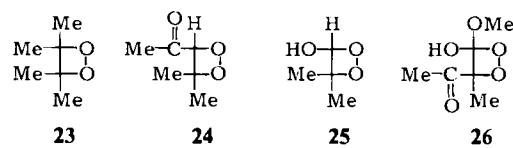
$$\phi_{DC} = \phi_{exc} \cdot \phi_{LUM} \quad (g)$$

$$\phi_{DC} = \phi_{exc} \cdot \phi_{ET} \cdot \phi_{LUM} \quad (h)$$

ϕ_{DC} = Ausbeute der direkten Chemilumineszenz; ϕ_{ETC} = Ausbeute der Energietransfer-Chemilumineszenz; ϕ_{exc} = Ausbeute der chemischen Anregung (ϕ^S für Singulett und ϕ^T für Triplet); ϕ_{LUM} = Lumineszenzausbeute des angeregten Carbonylprodukts oder des Lumino-
phors; Fluoreszenz-Ausbeute (ϕ_F) für Singulett und Phosphoreszenz-Ausbeute (ϕ_{ph}) für Triplet; ϕ_{ET} = Effizienz des Energietransfers von angeregtem Carbonylprodukt auf den Lumino-
phor

produkt bekannt ist. Dies ist für unsymmetrisch substituierte Dioxetane, bei welchen nur eins der beiden möglichen Carbonylprodukte oder beide angeregt werden können [Reaktion (i)], nicht trivial, besonders bei biologischen

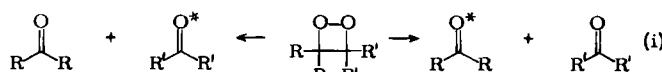
zenzausbeute bekannt oder meßbar, dann braucht zur Bestimmung von ϕ_{exc} nur ϕ_{DC} mit den üblichen photometrischen Methoden gemessen werden^[19]. Da die beobachtete Emission unter Normalbedingungen gewöhnliche Fluoreszenz ist, hat man direkten Zugang zur Singulett-Quantenausbeute (ϕ^S). Die Triplet-Quantenausbeute (ϕ^T) kann nur unter besonderen Bedingungen durch direkte Phosphoreszenz gemessen werden. Die Ausbeute an Triplet-Aceton aus Tetramethyl-1,2-dioxetan 23 wurde z. B. unter Sauerstoffausschluß bestimmt^[20]. Die Triplet-Ausbeute an Methylglyoxal aus dem Dioxetan 24^[21] konnte direkt gemessen werden, da solche α-Dicarbonylverbindungen phosphoreszieren. Bezeichnenderweise wurde die direkte Emission bei der enzymatischen Autoxidation von Isobutyraldehyd durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) in Gegenwart eines Chelatbildners (EDTA, Pyrophosphat) als die von Triplet-Aceton identifiziert, dem Zerfallsprodukt des hypothetischen, intermediären Dioxetans 25^[22]. Wird das Enzym HRP jedoch durch Hämin ersetzt, findet die Autoxidation von Isobutyraldehyd zu Triplet-Aceton zwar weiterhin statt, doch kann die Phosphoreszenz nicht mehr direkt beobachtet werden^[23]. Folglich wurde argumentiert, daß bei der HRP-katalysierten Autoxidation das Triplet-



Aceton vom Enzym gegen Löschen durch Sauerstoff geschützt wurde, bei der häminkatalysierten Autoxidation jedoch nicht. Zwischen diesen Extremen liegt die HRP-katalysierte Autoxidation von Methyl-2-methylacetacetat, welches Triplet-Biacetyl – wahrscheinlich über das Dioxetan 26 – bildet, was durch die direkt auftretende Phosphoreszenz bestätigt wird^[24]. Hier ist das Triplet-Biacetyl ebenfalls nicht gegen Löschen durch Sauerstoff geschützt; da es aber im Vergleich zu Triplet-Aceton in Lösung recht wirkungsvoll phosphoresziert, kann seine Phosphoreszenz nach weitgehendem Sauerstoffverbrauch unmittelbar beobachtet werden. Diese ungewöhnlichen Ergebnisse sind von großer biologischer Bedeutung.

Im allgemeinen kann man sagen, daß die Beobachtung der direkten Chemilumineszenz des Produkts (DC) eine bequeme, aber nur beschränkt anwendbare Methode ist. Die schwerwiegendsten Nachteile sind, daß selten Triplettausbeuten bestimmt werden können, daß das angeregte Produkt bekannt sein muß und daß die Fluoreszenz- und Phosphoreszenzausbeuten groß genug sein müssen, um quantitative Bestimmungen zu ermöglichen^[19].

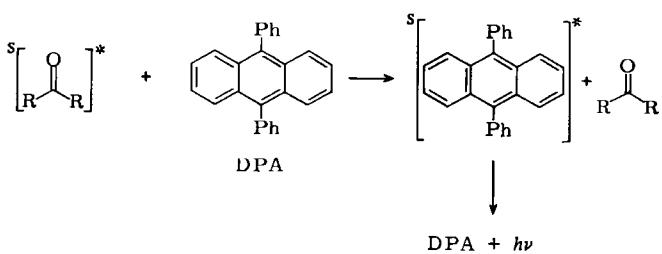
Die Energietransfer-Chemilumineszenz (ETC) wird inzwischen am häufigsten zur Bestimmung von Anregungsausbeuten verwendet. Sie wurde zuerst von der russischen Schule^[25] zur Beobachtung der angeregten Carbonylprodukte entwickelt, welche die Chemilumineszenz bei der



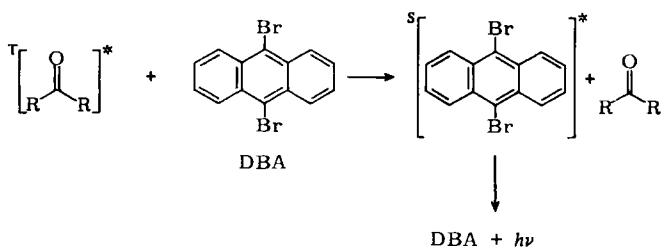
Reaktionen, bei denen das Dioxetan als kurzlebige Zwischenstufe postuliert wird. Kennt man jedoch das chemisch angeregte Carbonylprodukt und ist seine Lumines-

Autoxidation von Kohlenwasserstoffen bewirken. Bei richtiger Wahl des Luminophors, auf den die Anregungsenergie der chemisch angeregten Carbonylprodukte übertragen wird, können die Singulett- (ϕ^S) und Triplet-Ausbeuten (ϕ^T) photometrisch erhalten werden^[26].

Zur Bestimmung von Singulett-Anregungsausbeuten verwendet man häufig 9,10-Diphenylanthracen (DPA) als Luminophor. Seine Fluoreszenz wird durch Singulett-Singulett-Energiotransfer von chemisch angeregtem Carbonylprodukt sensibilisiert. In der Praxis mißt man die DPA-Lichtausbeute (ϕ_{ETC}^{DPA}) bei unendlichen DPA-Konzentrationen unter Stern-Volmer-Bedingungen ($\phi_{ET}^{DPA} = 1.00$). Bei bekannter Fluoreszenz-Quantenausbeute von DPA kann die Singulett-Quantenausbeute (ϕ^S) nach Gl. (h) berechnet werden^[19].

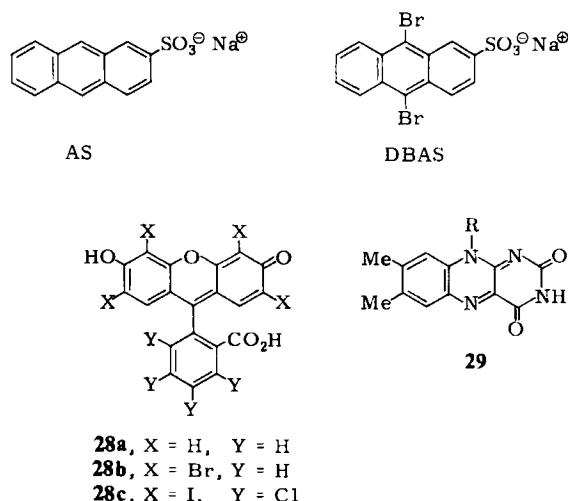


Zur Bestimmung von Triplet-Anregungsausbeuten hat 9,10-Dibromanthracen (DBA) weite Verbreitung gefunden. Durch Spin-Bahn-Kopplung katalysieren die Bromatome den spinverbotenen Triplet-Singulett-Energietransfer von chemisch angeregten Triplet-Carbonylverbindungen auf DBA, wodurch dessen Fluoreszenz sensibilisiert wird. Hierbei bestimmt man die DBA-Lichtausbeute (ϕ_{ETC}^{DBA}) bei unendlichen DBA-Konzentrationen unter Stern-Volmer-Bedingungen ($\phi_{ET}^{DBA} = 0.25$), und da man die Fluoreszenz-Quantenausbeute von DBA kennt, erhält man nach Gl. (h) die Triplet-Quantenausbeute (ϕ^T)^[19].



Die Vorzüge dieser Lumineszenztechniken können nicht genug betont werden. Sie sind einfach in der Durchführung, die Empfindlichkeit ist lediglich durch die Qualität der photometrischen Ausrüstung begrenzt, und, was am wichtigsten ist, die genaue Natur der chemisch angeregten Zustände, die am Energietransfer beteiligt sind, muß nicht bekannt sein. Es sollte daher nicht überraschen, daß solche Methoden häufig angewendet werden, um Anregungsausbeuten, besonders bei biologischen Systemen, zu bestimmen^[27].

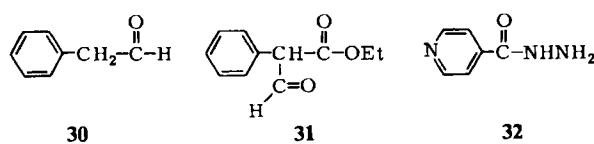
Zu diesem Zweck wurden wasserlösliche Luminophore entwickelt, z. B. Natrium-2-antracensulfonat (AS) und Natrium-9,10-dibrom-2-antracensulfonat (DBAS). Mit ihnen ließ sich bei der HRP-katalysierten Autoxidation von Isobutyraldehyd die Bildung von Tripletts-Aceton dadurch nachweisen, daß die Fluoreszenz von DBAS, nicht



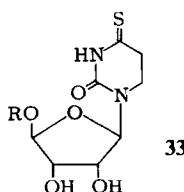
jedoch die von AS sensibilisiert wurde^[22]. Außerdem ließ sich die Fluoreszenz von Xanthenfarbstoffen **28**^[28] und Flavinen **29**^[29] durch Triplet-Aceton - erzeugt durch HRP-katalysierte Autoxidation von Isobutyraldehyd - wirksam stimulieren (**28a**: Fluorescein; **28b**: Eosin; **28c**: Bengalrosa).

Ähnlich konnten die Luminophore **28** und **29** durch HRP-katalysierte Autoxidation geradketiger Aldehyde sensibilisiert werden. An diesem Vorgang sind vermutlich Triplett-Aldehyde beteiligt, die aus Dioxetanol-Zwischenstufen wie **25** entstehen^[30]. Jedoch konnte weder mit Xanthenfarbstoffen noch mit Flavinen triplettangeregter 3-Indolcarbaldehyd nachgewiesen werden, der bei der HRP-katalysierten Autoxidation von 3-Indolessigsäure über das postulierte α -Peroxylacton **27** erzeugt wird^[31]. Bei Experimenten in Gegenwart von micellar gelöstem Chlorophyll fluoreszierten diese Luminophore aber stark. Dies weist darauf hin, daß elektronisch angeregter 3-Indolcarbaldehyd beteiligt war^[32]. Sowohl kationische (CTAB) und anionische (SDS) als auch neutrale (Brij-35 und Triton X-100) micellare Lösungen von Chlorophyll zeigten hervorragende Ergebnisse.

Somit steht ein vielversprechendes neues Nachweissystem für die Suche nach Triplet-Carbonylverbindungen zur Verfügung, die durch peroxidasekatalysierte Autoxidation geeigneter Substrate erzeugt werden, sofern chemisch induzierte Elektronenaustausch-Lumineszenz (CIEEL) ausgeschlossen werden kann. Zum Beispiel war es bei Verwendung micellarer Chlorophyll-Lösungen möglich, Triplet-Carbonylprodukte bei der HRP-katalysierten Autoxidation von Phenylacetaldehyd **30**^[33], Ethyl-2-formyl-2-phenylethylacetat **31**^[34] und Isonicotinsäurehydrazid **32**^[35] nachzuweisen.



Sogar komplexe biologische Moleküle können als Luminesphore zum Nachweis enzymatisch erzeugter Triplett-Carbonylprodukte dienen. So ließ sich bei der HRP-katalysierten Autoxidation von 3-Indolessigsäure in Gegenwart von tRNA^{Phe} die Emission des 4-Thiouridinteils 33 sensi-



bilisieren^[36]. In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, daß „lichtangeregter“ 3-Indolcarbaldehyd die gleiche Emission hervorruft. Wird tRNA^{Ph} durch Hefe-tRNA ersetzt, der die Thiouridingeruppe fehlt, kann keine Sensibilisierung beobachtet werden. Neuerdings wurde festgestellt, daß Triplet-Aceton, geradkettige Triplet-Carbaldehyde und Triplet-3-Indolcarbaldehyd – alle durch HRP-katalysierte Autoxidation erzeugt – bei intakten Chloroplasten Emission im Roten hervorrufen^[37]. Alle anderen Prozesse außer dem Energietransfer konnten ausgeschlossen werden.

Nachdem die Vorteile der Energietransfer-Chemilumineszenz (ETC) für den Nachweis und die quantitative Bestimmung chemisch oder biologisch erzeugter angeregter Zustände dargelegt wurden, soll auch auf die Einschränkungen hingewiesen werden. Offensichtlich muß die Anregungsenergie des Luminophors niedrig genug sein, damit der Energietransfer exotherm und somit effektiv ist. Für einfache Carbonyl-Anregungszustände wie die von Aceton, Benzaldehyd und Methylbenzoat ist die Wahl des geeigneten Luminophors nicht schwer, weil diese alle relativ hohe Anregungsenergien haben. Sogar DPA, DBA, AS und DBAS können verwendet werden, obwohl ihre Singulett-Anregungsenergien bis zu 70 kcal/mol betragen. Für stark konjugierte Carbonylverbindungen jedoch, deren Singulett-Anregungsenergien unter 50 kcal/mol und deren Triplet-Anregungsenergien unter 30 kcal/mol liegen, ist die Wahl eines Luminophors problematisch. Werden Luminophore mit genügend niedriger Anregungsenergie benutzt, z. B. Porphyrine oder Rubren, läuft man Gefahr, Elektronen-Austauschlumineszenz (CIEEL) hervorzurufen^[38]. Adäquate Lösungen für solche analytischen Probleme stehen bisher noch aus.

3.2. Chemische Titrationen

Wie schon in Schema 1 dargelegt, geht bei dieser Art von Nachweissystem der chemisch erzeugte angeregte Zustand entweder direkt oder unter Energietransfer eine bekannte photochemische Umwandlung ein. Die für die Bestimmung der Anregungsausbeuten notwendigen mathematischen Beziehungen sind in Gl. (j) und (k) angegeben.

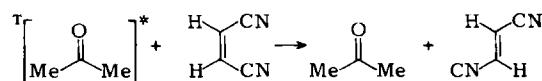
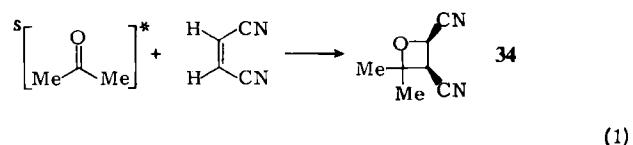
$$\phi_{\text{Chem}} = \phi_{\text{exc}} \cdot \phi_{\text{Photo}} \quad (j)$$

$$\phi_{\text{Chem}} = \phi_{\text{exc}} \cdot \phi_{\text{ET}} \cdot \phi_{\text{Photo}} \quad (k)$$

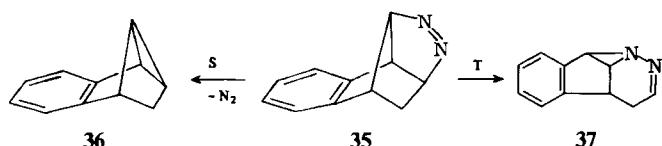
ϕ_{Chem} = Ausbeute an chemisch erzeugtem Photoprodukt (direkte oder sensibilisierte Reaktion); ϕ_{exc} = Ausbeute der chemischen Anregung (ϕ^s für Singulett und ϕ^T für Triplet); ϕ_{Photo} = Ausbeute der Photoreaktion; ϕ_{ET} = Effizienz des Energietransfers

In der Praxis muß die chemische Ausbeute (ϕ_{Chem}) an Photoprodukt spektroskopisch oder chromatographisch bestimmt werden. Die photochemische Ausbeute (ϕ_{Photo})

ist dabei gewöhnlich bekannt oder kann durch die üblichen photomechanistischen Techniken für die photochemische Umwandlung bestimmt werden. Bei einer sensibilisierten photochemischen Reaktion wird die Effizienz der Energieübertragung bei unendlichen Konzentrationen an Photoacceptor unter Stern-Volmer-Bedingungen ($\phi_{\text{ET}} = 1.0$) bestimmt. Somit liegen alle experimentellen Daten vor, um ϕ_{exc} nach Gl. (j) oder (k) zu berechnen. Ist die direkte oder sensibilisierte photochemische Umwandlung singulettspezifisch, erhält man Singulett-Ausbeuten (ϕ^s), ist sie triplettspezifisch, Triplet-Ausbeuten (ϕ^T). Solche photochemischen Bestimmungen von Anregungsausbeuten werden allgemein als „chemische Titration“ chemisch erzeugter Anregungszustände bezeichnet.



Reaktion (1) zeigt das mittlerweile klassische Beispiel einer chemischen Titration durch Energietransfer. Danach bildet singulett- bzw. triplettangeregtes Aceton mit Maleonitril das Oxetan 34 bzw. Fumaronitril^[39]. So können ϕ^s und ϕ^T in einem einzigen Experiment nach Gl. (k) durch quantitative Bestimmung der chemischen Ausbeuten dieser Photoprodukte erhalten werden.

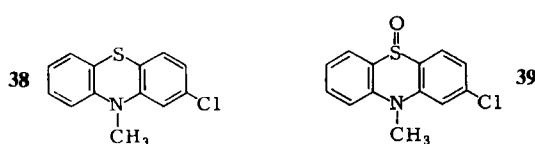


Ein neues, spinspezifisches System zur chemischen Titration chemisch erzeugter singulett- und triplettangeregter Carbonylprodukte ist die tetracyclische Azoverbindung 35, die bei Singulettensensibilisierung den tetracyclischen Kohlenwasserstoff 36 und bei Triplettensensibilisierung das Aziridin 37 bildet^[40]. Zahlreiche weitere Beispiele solcher sensibilisierten und direkten chemischen Titrationen chemisch erzeugter angeregter Carbonylprodukte wurden bereits zusammengestellt^[19].

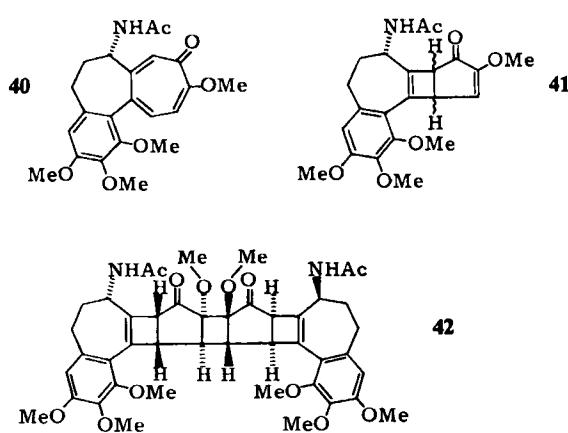
Hauptvorteil solcher chemischer Titrationen ist, daß keine spezielle photometrische Ausrüstung benötigt wird, um Lichtausbeuten zu ermitteln. Stattdessen wird die chemische Ausbeute des Photoprodukts durch spektroskopische und chromatographische Standardtechniken bestimmt. Außerdem steht eine Vielzahl photochemischer Umwandlungen zur Verfügung. Wiederum ist die sensibilisierte chemische Titration brauchbarer als die direkte, da bei ersterer die genaue Natur des chemisch erzeugten angeregten Zustands nicht bekannt sein muß. Außerdem muß bei der direkten chemischen Titration jedesmal ein spezifisches Dioxetan oder α -Peroxylacton als Anregungsäquivalent synthetisiert werden. Bei der sensibilisierten chemischen Titration jedoch braucht nur ein geeigneter Photoacceptor gefunden zu werden. Damit die Energie-

übertragung effizient ist, muß seine Anregungsenergie natürlich unter der des chemisch erzeugten Zustands liegen.

Es ist daher nicht überraschend, daß solche sensibilisierten chemischen Titrationen für den Nachweis enzymatisch erzeugter angeregter Zustände genutzt wurden. Zum Beispiel ließen sich die 7% Isopropylalkohol, die bei der HRP-katalysierten Autoxidation von Isobutyraldehyd in Ethanol gefunden wurden, auf die Reduktion von intermediär gebildetem Triplett-Aceton durch Ethanol zurückführen^[22d].

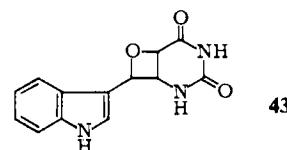


Mittlerweile wurde eine Anzahl solcher „dunkler photobiologischer“ Umwandlungen beschrieben^[27]. Beispielsweise ergibt die HRP-katalysierte Autoxidation von Isobutyraldehyd in Gegenwart von Chloropromazin 38 das Sulfoxid 39 und das Radikalkation von 38^[41]. Es ist bekannt, daß Chloropromazin tripletsensibilisiert photoxidiert wird^[42], wobei eine Triplett-Triplett-Energieübertragung durch enzymatisch erzeugtes Triplett-Aceton stattfindet. DBAS hemmt diese Reaktion, wahrscheinlich durch Löschen des Triplett-Acetons. Nach quantitativen Abschätzungen beträgt die Ausbeute an Triplett-Aceton bei dieser peroxidasekatalysierten Autoxidation beinahe 100%. In gleicher Weise wird die gegenseitige Umwandlung der Phytochrome P_R und P_F durch enzymatisch erzeugtes Triplett-Aceton aus der HRP-katalysierten Autoxidation von Isobutyraldehyd sensibilisiert^[43].



Eine der faszinierendsten Untersuchungen auf diesem Gebiet befaßt sich mit der sensibilisierten Umwandlung von Colchicin 40 in β - und γ -Lumicolchicin 41 sowie α -Lumicolchicin 42 durch das bei der HRP-katalysierten Autoxidation von Isobutyraldehyd erzeugte Triplett-Aceton^[44]. Die chemische Ausbeute (ϕ_{Chem}) beträgt ungefähr 7%. Besonders interessant ist, daß diese photochemische Umwandlung bei *Colchicum autumnale L.* auch in nicht dem Licht ausgesetzten Teilen stattfindet^[45]. Es ist deshalb denkbar, daß im lebenden Organismus triplettangeregte Zustände endogen erzeugt werden, welche die Colchicin-Lumicolchicin-Umwandlung durch Energietransfer sensibilisieren. Der Befund, daß α -Lumicolchicin 42, ein Photo-

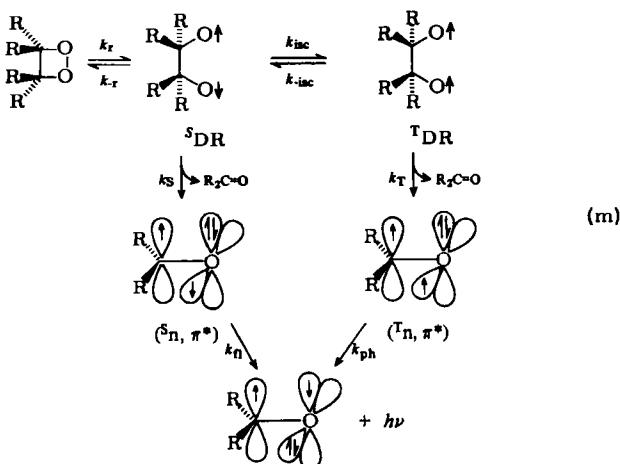
todimer von β -Lumicolchicin 41, unter biologischen Bedingungen im Dunkeln entsteht, läßt Schlüsse auf die durch endogen erzeugte angeregte Zustände hervorgerufene Thymindimerisierung zu. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich durch HRP-katalysierte Autoxidation von Isobutyraldehyd ein Photoaddukt aus Lysozym und Riboflavin gewonnen^[46]. Außerdem wurde die Bildung des Paterno-Büchi-Addukts 43 aus enzymatisch erzeugtem Triplett-3-Indolcarbaldehyd und der Uridingruppe der tRNA nachgewiesen^[36b]. Aufgrund dieser chemischen Titration wurde geschätzt, daß die Triplett-Anregungsausbeute (ϕ^T) von 3-Indolcarbaldehyd bei der HRP-katalysierten Autoxidation von 3-Indolessigsäure ca. 20% erreicht.



Offensichtlich ist die Technik der chemischen Titration für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von enzymatisch erzeugten angeregten Zuständen, die vermutlich aus intermediären 1,2-Dioxetanen und α -Peroxylactonen entstehen, hervorragend brauchbar. Zusammen mit den Lumineszenzmethoden verfügt man damit über ein breites Spektrum allgemein anwendbarer analytischer Methoden. In Zukunft sollten die Aktivitäten in diesem Neuland der Bioorganischen Chemie verstärkt werden.

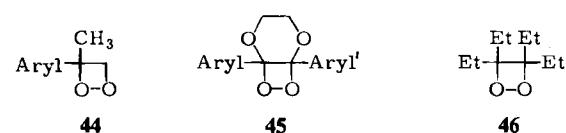
4. Mechanistische Incognita

Um die thermische Stabilität der Dioxetane und α -Peroxylactone und ihre Fähigkeit zur Erzeugung elektronisch angeregter Zustände erklären zu können, ist ein gründliches Verständnis des Mechanismus des thermischen Zerfalls notwendig. Es überrascht daher kaum, daß man sich seit der Entdeckung der Dioxetane und Dioxetanone intensiv um die Lösung dieses verblüffenden mechanistischen Problems bemüht hat^[15]. Zwei einander ausschließende mechanistische Betrachtungsweisen haben das letzte Jahrzehnt überdauert, jede durch überzeugende experimentelle Daten gestützt. Aufgrund von thermokinetischen Berechnungen^[47] wurde der diradikalische Mecha-

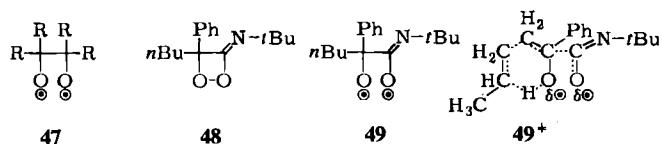


nismus (m) als beste Erklärung für die thermische Stabilität der Dioxetane vorgeschlagen. Weiterhin kann damit, unter Voraussetzung der kinetischen Bedingungen $k_{isc} > k_s$ und $k_T > k_{isc}$ ($isc =$ intersystem crossing), der hohe Anteil an Triplettanregung ($^Tn, \pi^*$ -Zustand) des Carbonylprodukts erklärt werden.

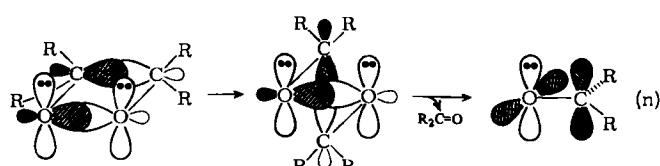
Neuere Befunde, die den diradikalischen Mechanismus stützen, betreffen Hammett-Beziehungen von Substituenteneffekten und Zerfallsgeschwindigkeiten bei 3-Aryl-3-methyl-1,2-dioxetanen **44**^[48] und 2a,6a-Diarylperhydro[1,2]dioxetan[3,4-b][1,4]dioxinen **45**^[49] sowie den Einfluß sterischer Effekte auf die Thermolysegeschwindigkeiten von 3,3-Dialkyl- und Trialkyl-1,2-dioxetanen^[50]. Zur Erklärung der ungewöhnlichen Stabilität von Tetraethyl-1,2-dioxetan **46** ist der diradikalische Mechanismus jedoch völlig unbrauchbar^[51].



Absangsexperimente würden den besten Beweis für die Beteiligung von diradikalischen Zwischenstufen wie **47** bei der Thermolyse von 1,2-Dioxetanen liefern. Wenn sich auch noch kein Diradikal abfangen ließ, so machte man bei der Thermolyse des Derivats **48** doch die interessante Beobachtung, daß Acetophenon und Propen gebildet werden. Die Produkte sollen aus der diradikalischen Zwischenstufe **49** entstehen^[52], welche über den Übergangszustand **49⁺** zerfällt.



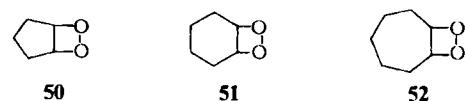
Ebensowenig war es bisher möglich, Dioxetan-Diradikale spektroskopisch nachzuweisen. Zum Beispiel gelang es nicht, durch Multiphotonen-Infrarot-Anregung von Tetramethyl-1,2-dioxetan in der Gasphase diradikalische Zwischenstufen zu erfassen. Somit ist ihre Lebensdauer kürzer als 5 ns^[53]. Daß solche Diradikale, sollten sie tatsächlich gebildet werden, extrem kurzlebig sein müssen (Lebensdauer kürzer als 10 ps), wird noch überzeugender durch den Befund belegt, daß es sogar durch Picoskunden-Spektroskopie nicht möglich war, solche Spezies bei der gepulsten 264nm-Photolyse von Tetramethyldioxetan in Acetonitril nachzuweisen. Dabei wurde ein modengekoppelter Neodymophosphat-Laser verwendet^[54].



Beim anderen Mechanismus (n) werden die Sauerstoff-Sauerstoff- und die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung gleichzeitig getrennt, die Dioxetanzersetzung findet konzertiert statt^[55]. Durch die Verdrillung des viergliedrigen

Rings ordnen sich die schraffiert gezeichneten Orbitale optimal zur Bildung eines n, π^* -angeregten Zustandes des Carbonylproduktes an. Die hohe Ausbeute an triplettangeregtem Produkt kann durch verstärkte Spin-Bahn-Kopplung während des Verdrillungsvorgangs erklärt werden^[56].

Neuere Anhaltspunkte, die für diesen Zerfallsmechanismus sprechen, liefert die Reihe der Dioxetane **50–52**^[57].



Die Aktivierungsparameter (Tabelle 2) zeigen, daß das Dioxetan **51** mit anelliertem Sechsring thermisch viel labiler als die Homologen **50** und **52** ist^[58]. Die Abhängigkeit der thermischen Stabilität von der Ringgröße kann kaum mit dem diradikalischen Mechanismus (m) erklärt werden.

Tabelle 2. Aktivierungsparameter der bicyclischen 1,2-Dioxetane **50–52** [a].

Dioxetan	ΔH^\ddagger [kcal/mol]	ΔS^\ddagger [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG^\ddagger (333.2 K) [kcal/mol]	$10^4 k$ (333.2 K) [s ⁻¹]
50	25.3	+ 1.6	24.8	3.8
51	21.9	- 2.1	22.5	110
52	25.4	+ 1.9	24.8	4.0

[a] Bestimmt durch Chemilumineszenzmessungen unter isothermen Bedingungen [58].

Es wurde argumentiert^[54], daß beim Dioxetan **51** der viergliedrige Ring verdrillt und somit auf der Reaktionskoordinate des konzertierten Mechanismus (n) schon in Richtung auf die Zerfallsprodukte verschoben ist, während bei **50** und **52** die viergliedrigen Ringe planar sein können und folglich eine stärkere thermische Aktivierung erfordern, um den verdrillten Übergangszustand zu erreichen. Dreiding-Modelle stützen diese Vorstellung.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die kristallinen Dioxetane **17–19** hergestellt und ihre Aktivierungsparameter und Kristallstrukturen bestimmt^[18b]. Wie die Strukturdaten zeigen (Tabelle 1), erzwingt die Dihydrobenzodioxin-Anellierung in allen drei Dioxetanen unglücklicherweise eine im Wesentlichen planare Struktur des viergliedrigen Rings. Es ist daher nicht überraschend, daß die Zerfallskonstanten annähernd gleich sind (Tabelle 1). Die Synthese kristalliner Dioxetane mit fixierter verdrillter oder planarer Geometrie, z. B. vom Typ **53** und **54**, wäre somit ein lohnendes Ziel. **53** ist thermisch beträchtlich labiler als **54**^[59]. Durch Röntgen-Strukturanalyse könnte man dieses interessante mechanistische Problem möglicherweise lösen.



Offensichtlich gibt es also experimentelle Befunde sowohl für als auch gegen den diradikalischen und den konzertierten Mechanismus^[15]. Um einen Ausweg aus dieser mechanistischen Zwickmühle zu finden, wurde kürzlich eine Reihe von Untersuchungen über thermische Stabilität und Anregungsparameter durchgeführt, z. B. an der vollständigen Reihe der methylierten 1,2-Dioxetane **1**, **13**, **23** und **55–57** (Tabelle 3)^[13]. Dabei war beabsichtigt, den Sub-

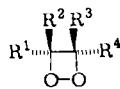


Tabelle 3. Aktivierungsparameter der methylsubstituierten 1,2-Dioxetane [a].

Diox- etan	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	ΔH ⁺ [kcal/mol]	ΔS ⁺ [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG ⁺ (343.2 K) [kcal/mol]	10 ⁴ k (343.2 K) [s ⁻¹]
13	H	H	H	H	19.1 ± 1.7	-3.0 ± 1.0	19.9 ± 1.9	150 ± 10
55	Me	H	H	H	21.5 ± 0.6	-1.4 ± 0.5	21.9 ± 0.7	85 ± 5
56	Me	Me	H	H	22.5 ± 0.2	-1.3 ± 0.2	22.9 ± 0.3	26 ± 3
57a	Me	H	Me	H	21.6 ± 0.6	-1.8 ± 0.8	22.1 ± 0.7	35 ± 3
57b	Me	H	H	Me	22.1 ± 1.0	-1.6 ± 0.8	22.6 ± 1.2	27 ± 3
1	Me	Me	Me	H	24.5 ± 1.5	-1.0 ± 0.5	24.8 ± 1.5	8.6 ± 0.5
23	Me	Me	Me	Me	24.9 ± 0.6	-0.8 ± 0.4	25.1 ± 0.6	2.0 ± 0.2

[a] Bestimmt durch Chemilumineszenzmessungen unter isothermen Bedingungen [13].

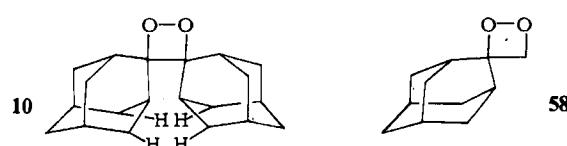
stituenteneffekt einer bestimmten Alkylgruppe, in diesem Fall der Methylgruppe, durch Messung der Aktivierungsparameter unter exakt gleichen Bedingungen in ein und demselben Laboratorium zu untersuchen und dadurch die große Divergenz solcher Resultate, wie sie aus einer neuen Zusammenfassung^[60] hervorgeht, zu vermeiden. Die Zerfallskonstanten in Tabelle 3 zeigen einen starken Substituenteneffekt. So zerfällt z. B. unsubstituiertes Dioxetan 13 bei 343.2 K ungefähr 75mal schneller als Tetramethyl-dioxetan 23; die Änderung der Aktivierungsenthalpie (ΔH^+) beträgt pro Methylsubstituent ungefähr 1 kcal/mol. Während dieser signifikante Substituenteneffekt für den konzertierten Mechanismus spricht, sagen thermokinetische Berechnungen^[47] unter Annahme eines diradikalischen Zerfalls ebenso eine gleichmäßige Zunahme der thermischen Stabilität von 1,2-Dioxetanen mit zunehmender Methylsubstitution voraus.

Weiterhin sei erwähnt, daß sich die Effizienz der chemischen Anregung mit zunehmender Methylsubstitution erhöht. Diese Zunahme kommt hauptsächlich in der Triplettausbeute zum Ausdruck und stimmt mit dem empirischen Trend überein, daß die Triplettausbeute (ϕ^T) mit der Aktivierungsenergie zunimmt^[61].

Es sollte klargeworden sein, daß selbst eine so einfache Moleküleigenschaft wie die thermische Stabilität dieser faszinierenden Dioxetane noch nicht befriedigend erklärt werden kann. Welcher Mechanismus zutrifft, bleibt weiterhin offen. Theoretische Untersuchungen haben einige Fortschritte gebracht. Die neuesten und anspruchsvollsten Berechnungen^[63] sprechen für den diradikalischen Mechanismus. Unabhängig von der Genauigkeit der angewendeten quantenmechanischen Methode sagen jedoch alle sowohl für den konzertierten als auch für den diradikalischen Mechanismus einen verdrillten Übergangszustand voraus^[60] – die Theoretiker haben somit reichlich Stoff zum Nachdenken.

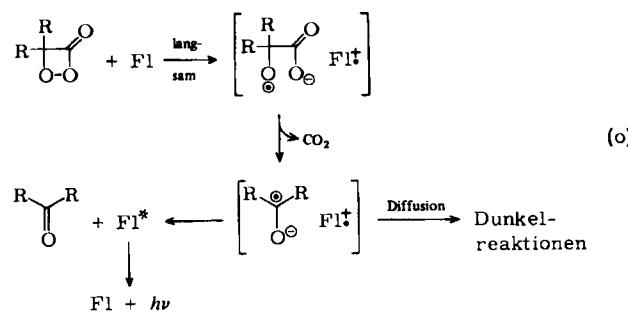
Außer der thermischen Stabilität dieser hochenergetischen Verbindungen ist auch die Effizienz der Erzeugung angeregter Zustände in Abhängigkeit von der Struktur dieser Verbindungen noch nicht völlig zu verstehen. Nach einer neuen und provozierenden Hypothese wird beim Zerfall von 1,2-Dioxetanen als erste angeregte Spezies ein Exciplex aus den beiden Carbonylfragmenten gebildet^[48]. In der Tat wurde bei indolylsubstituierten Dioxetanen Exciplex-Emission beobachtet^[64]. Durch solche Effekte könnten sich einige kaum verständliche empirische Befunde^[19] bei den Anregungsparametern erklären lassen. Offensichtlich liegt hier ein Betätigungsfeld auch für Molekül-Spektroskopiker. Verblüffender noch ist die ungewöhnliche Fähigkeit der Dioxetane, bevorzugt triplattangeregte Carbonylprodukte chemisch zu erzeugen. In diesem Zusammenhang interessiert das noch kaum verstandene Phänomen des „crossings“ von Energiehyperflächen. Eine qualitative Behandlung^[65] betont die Möglichkeiten einer solchen Be- trachtungsweise; weitere intensive Bemühungen in dieser Richtung scheinen geboten.

An biologischen Objekten sind mechanistische Untersuchungen über den Zerfall von viergliedrigen cyclischen Peroxiden noch schwieriger, weil diese als Zwischenstufen postulierten Substanzen zu labil für die Isolierung sind. Trotzdem wurde beim Mechanismus der Luciferin-Biolumineszenz^[14], insbesondere dem des Leuchtkäfer-Luciferins [Reaktion (e)], ein wichtiger Fortschritt erzielt. Nachdem das Phänomen der chemisch induzierten Elektronenaustausch-Lumineszenz (CIEEL) zwischen Peroxiden und leicht oxidierbaren Fluoreszenzfarbstoffen (Fl) einmal erkannt war^[38], bestätigten Modellstudien, daß der katalysierte, lumineszente Zerfall von α -Peroxylactonen zu die-

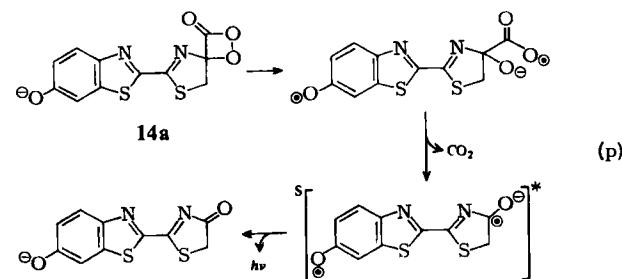


Noch zu erklären wäre die ungewöhnliche thermische Stabilität des 1,2-Dioxetans 10 mit zwei Spiroadamantan-Einheiten. Schon eine Spiroadamantan-Einheit stabilisiert solche Dioxetane deutlich gegen Thermolyse^[4, 62]. Bei 10 sind die vier äquatorialen Methylen-H-Atome der beiden starren Adamantangruppen ineinander verzahnt^[16]. Als Folge davon enthält 10 einen der am stärksten verdrillten Dioxetanringe (Verdrillungswinkel ca. 21.3°). Die Verzahnung dieser H-Atome verhindert nun eine weitere Verdrillung des viergliedrigen Rings. Demnach scheint der diradikalische Mechanismus plausibler als der konzertierte zu sein. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, das noch unbekannte Spiro[adamantan-dioxetan] 58 zu untersuchen, bei dem eine solche Stabilisierung durch Verzahnung nicht möglich ist.

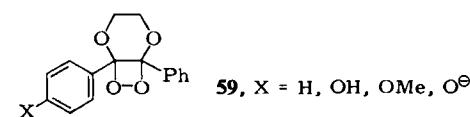
ser neuen Kategorie von Chemilumineszenz-Reaktionen [Reaktion (o)]^[66] gehört. Damit konnte die hohe Quantenausbeute (ca. 90%) an singulettangeregten Zuständen bei der Luciferin-Biolumineszenz erklärt werden. Folglich ist



dieser Fall [Reaktion (p)] eine intramolekulare Version des Modellprozesses (o)^[67]. Wesentlich in diesem Zusammenhang ist die lange bekannte Tatsache^[68], daß die effiziente Erzeugung von singulettangeregten Zuständen die Phenolat-Form **14a** des α -Peroxylactons **14** voraussetzt. Bei **14a** fungiert die Benzothiazolgruppe als Elektronendonator und



die α -Peroxylactoneeinheit als Elektronenacceptor; die intramolekulare Decarboxylierung führt mit hoher Ausbeute zu elektronisch angeregtem Oxyluciferin. Eine neuere Modellstudie^[69] am Dioxetan **59** bietet in der Tat überzeugende Argumente für diese Hypothese. Während **59**, $X = H$, eine große Triplett-Anregungsausbeute lieferte, ergab das Phenolat **59**, $X = O^\ominus$, hauptsächlich singulettangeregtes Produkt. Wie beim α -Peroxylacton **14** findet offensichtlich auch hier ein intramolekularer CIEEL-Prozeß statt. Sicherlich werden in Zukunft weitere Beispiele bekannt werden.



Ein anderes Gebiet biologischer Untersuchungen, auf dem Fortschritte gemacht wurden, betrifft Energietransfer-Phänomene, an denen enzymatisch erzeugte angeregte Zustände beteiligt sind^[27]. Nur einige der jüngsten und wichtigsten Befunde können hier vorgestellt werden. Zum Beispiel sollte bei normalem Triplett-Singulett-Energietransfer durch Stöße zwischen freien Teilchen [Gl. (q)] die Stern-Volmer-Konstante [Gl. (r)] für das Löschen von Triplett-Aceton nicht über der mit molekularem Sauerstoff beobachteten liegen, d.h. K_{SV} beträgt ca. $2 \cdot 10^3$ bis $5 \cdot 10^3$ L mol $^{-1}$. Häufig ist jedoch $K_{SV} \geq 10^4$ L mol $^{-1}$. Da die För-



D = Donor; A = Acceptor; k_{ET} = effektive Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers; τ_0 = Lebensdauer des ungelöschten Donors

ster-Kriterien^[70] für einen Triplett-Singulett-Energietransfer über größere Entfernungen nicht in allen Fällen erfüllt sind, kann man aus diesen hohen K_{SV} -Werten schließen, daß der Acceptor sich vor der Anregung durch den Donor sehr nahe am aktiven Zentrum befindet. So fördert also die räumliche Nähe den Triplett-Triplett-Energietransfer [Gl. (s)]. Dieser Mechanismus könnte sogar auch dann auftre-



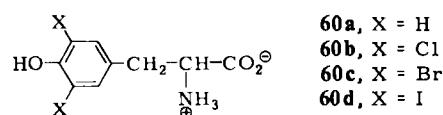
ten, wenn das Förster-Überlappungskriterium erfüllt ist. Solch ein Fall scheint das Löschen von enzymatisch erzeugter Aceton-Phosphoreszenz durch die Xanthenfarbstoffe **28** zu sein^[28]. Wenn das Integral der sensibilisierten Farbstoffemission zusammen mit der Fluoreszenzausbeute berücksichtigt wird, findet man eine relative Besetzung des angeregten Singulettzustands von 1:15:100 für Fluorescein **28a**, Eosin **28b** bzw. Bengalrosa **28c**. Die signifikant höhere Singulettausbeute mit Bengalrosa kann folgendermaßen erklärt werden: Höchstwahrscheinlich wird die Triplettenergie des Aceton-Donors zunächst auf einen höher angeregten Triplettzustand des Farbstoff-Acceptors übertragen; dann fördern die Iodatome (Schweratomeffekt) von Bengalrosa die Bildung des singulettangeregten Zustands durch verstärktes „Intersystem-crossing“ [Gl. (t)]. Wenn nur der traditionelle Förster-Mechanismus [Gl. (q)] wirksam wäre, sollte die relative Effizienz von Fluorescein am größten sein.



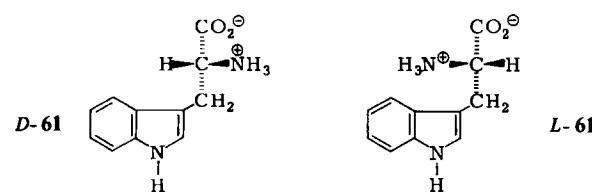
Hinweise, die diese Hypothese stützen, liefert die chemisch angeregte DBA-Fluoreszenz, welche durch Triplett-Aceton aus dem thermischen Zerfall von Tetramethyldioxetan erzeugt wird. Wie in Gl. (t) entsteht zunächst ein höherer Triplettzustand (T_2) von DBA durch erlaubten Triplett-Triplett-Energietransfer; der intramolekulare Schweratomeffekt verstärkt dann das „Intersystem-crossing“ vom T_2 - zum S_1 -Zustand^[71]. Ein solcher Mechanismus scheint auch für den Energietransfer von enzymatisch erzeugtem Triplett-Aceton auf DBAS als Acceptor zu gelten. Es sei erwähnt, daß Energie nicht nur auf DBAS, sondern mit gleicher Effizienz auch auf AS übertragen wird. AS fluoresziert jedoch nicht, denn ihm fehlen die Bromatome, die bei DBAS das „Intersystem-crossing“ vom T_2 - zum S_1 -Zustand fördern. Stattdessen bevorzugt AS „Innere Umwandlung“ vom T_2 - zum T_1 -Zustand, welcher nicht emittiert.

Ein weiterer interessanter Fall von Energietransfer betrifft die Tyrosinderivate **60**. Wird chemisch angeregtes Triplett-Aceton durch Thermolyse von Tetramethyldioxetan in Gegenwart dieser Tyrosine erzeugt, sind die (mit DBAS erhaltenen) Stern-Volmer-Löschkurven linear^[72].

Außer für Tyrosin **60a** selbst sind die Löschkonstanten annähernd diffusionskontrolliert. Es ist anzunehmen, daß die Energie des T_2 -Zustands so hoch ist, daß der T_1 -Zustand der Tyrosine **60b-d** direkt erzeugt wird. So kann also bei diesen Löschen der intramolekulare Schweratomeffekt nicht experimentell beobachtet werden, da der Energietransfer nach Gl. (t) aus energetischen Gründen nicht möglich ist. Wird jedoch Triplet-Aceton enzymatisch durch HRP-katalysierte Autoxidation von Isobutyraldehyd erzeugt, sind die Stern-Volmer-Löschkurven für Tyrosin **60a** und Dichloertyrosin **60b** beinahe linear, während sie für das Dibrom- und besonders das Diiodderivat **60c** bzw. **60d** eine deutliche Aufwärtskrümmung aufweisen. Bei **60c** und **60d** ist auch ein Schweratomeffekt feststellbar. In Gegenwart des Enzyms scheint enzymgeschütztes Triplet-Aceton einen statischen Beitrag zum Löschen zu liefern.



Die Schutzfunktion des Enzyms wird überzeugend beim Löschen der enzymatisch erzeugten Aceton-Phosphoreszenz durch D- und L-Tryptophan **61** demonstriert^[73]. In Gegenwart von D-Tryptophan ist kompetitives Löschen durch L-Tryptophan sehr wenig effizient; in der umgekehrten Situation jedoch wird Löschen durch D-Tryptophan weiterhin beobachtet. Diese chirale Diskriminierung schließt die Möglichkeit aus, daß Triplet-Aceton und der Löscher unter diesen Bedingungen frei in Lösung vorliegen, da durch Thermolyse von Tetramethyldioxetan erzeugtes Triplet-Aceton von D- und L-Tryptophan gleich gut gelöscht wird. Die chirale Diskriminierung durch das enzymatisch erzeugte Triplet-Aceton ist wahrscheinlich auf die Bildung eines „Begegnungskomplexes“ des Löschers mit dem aktiven Zentrum des Enzyms vor dem Energietransfer zurückzuführen.



Mehrere Aspekte dieser ungewöhnlichen Ergebnisse an enzymatisch erzeugtem Triplet-Aceton bleiben weiterhin unklar. Zum Beispiel kann vollständiges Löschen durch Chinone schon bei Konzentrationen beobachtet werden, die weit unter denen des Enzyms liegen^[74]. Unter diesen Bedingungen kann der Löscher höchstens einem Triplet-Aceton-Molekül während dessen Lebensdauer (ca. 10^{-5} s) begegnen. Das Löschen muß also durch Energietransfer über größere Entfernungen zustandekommen. In dieser Hinsicht wird das Förster-Überlappungskriterium von einigen, aber nicht allen Chinonen erfüllt. Löschen durch Elektronentransfer oder Charge-Transfer-Wechselwirkung ist unwahrscheinlich, weil sowohl Triplet-Aceton als auch Chinone Elektronenacceptoren sind.

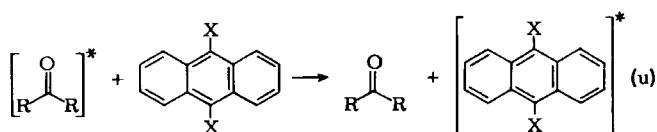
Ein weiteres wichtiges ungelöstes Problem ist, wie es den angeregten Spezies gelingt, ihre Energie auf Organell-

len wie Chloroplasten und auf Acceptoren in Micellen zu übertragen. Wenn der Triplet-Energiedonor durch das Enzym abgeschirmt ist, könnte für den Energietransfer die Beteiligung exponierter Gruppen der Makromoleküle oder Organellen notwendig sein. Bei Micellen ist anzunehmen, daß sich der Acceptor an oder in der Nähe der Oberfläche befindet. Ohne Zweifel stehen uns interessante Resultate in dieser faszinierenden bioorganischen Disziplin bevor.

5. Photologisches Divertimento

Die Tatsache, daß 1,2-Dioxetane und α -Peroxylactone maskierte elektronisch angeregte Zustände sind – hier als „Anregungsäquivalente“ bezeichnet – hat wichtige Konsequenzen für die Aufklärung photophysikalischer, photochemischer und photobiologischer Phänomene^[75]. Wie Schema 1 impliziert, verhalten sich chemisch und biologisch angeregte Zustände genau so wie durch Licht angeregte Zustände. Chemische und biologische Anregung bieten somit faszinierende Möglichkeiten, photologische Probleme auf eine unkonventionelle Art zu untersuchen, die auch als Photochemie^[75] bzw. Photobiologie^[76] im Dunkeln bezeichnet wird. Der grundlegende Unterschied dieser Ansätze ist jedoch, daß man bei der Erzeugung angeregter Zustände durch Licht mit der Lichtabsorption durch das Substrat zu kämpfen hat, während bei chemischer oder biologischer Anregung unkomplizierte konventionelle Techniken angewendet werden können, vergißt man einmal, daß die viergliedrigen cyclischen Peroxide erst synthetisiert werden müssen. Dies ist oft nicht leicht und verhindert vermutlich die häufigere Anwendung dieser hochenergetischen Moleküle. Dennoch: Die Herstellung des stabilen Dioxetans **10** ist bereits im Grundstudium möglich^[77], und die Synthese des labilen Tetramethyldioxetans **23** kann von einem geübten Laboranten in wenigen Tagen erlernt werden. Es gibt folglich keine Entschuldigung, diese interessanten Moleküle nicht zu benutzen.

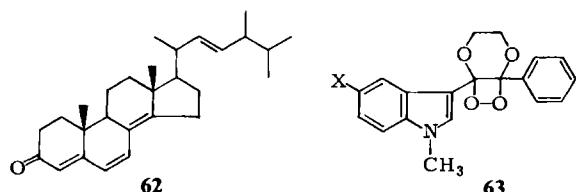
Um die vielfältige Anwendbarkeit zu demonstrieren, sollen einige photophysikalische, photochemische und photobiologische Probleme vorgestellt werden, bei welchen 1,2-Dioxetane und α -Peroxylactone als „Anregungsäquivalente“ genutzt wurden. Diese Auswahl soll zu weiteren intensiven Aktivitäten auf diesem vielversprechenden Gebiet anregen.



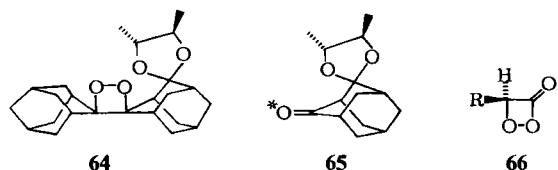
Im photophysikalischen Bereich bieten sich Dioxetane besonders für Energietransfer-Untersuchungen an. Bei Anregung durch Licht wäre es schwierig, Anregungsenergie von einem schwach absorbierenden Donor auf einen stark absorbierenden Acceptor zu übertragen, besonders wenn sich die Absorptionsbanden stark überlappen. Ein Beispiel

[*] Da es keinen Oberbegriff für Photobiologie, Photochemie und Photophysik gibt, schlagen wir den Terminus „Photologie“ für die Wissenschaft (logia) vom Licht (phos) vor.

ist in Gl. (u) dargestellt: Eine angeregte Carbonylverbindung (schwach absorbierender Donor) überträgt ihre Anregungsenergie auf das 9,10-disubstituierte Anthracen (stark absorbierender Acceptor) ($X = \text{Ph}$: DPA; $X = \text{Br}$: DBA). Das offensichtliche Handicap der konventionellen Anregung durch Licht ist hierbei, daß das Licht hauptsächlich vom Anthracen absorbiert wird. Bei Verwendung des entsprechenden Dioxetans wird das gewünschte angeregte Carbonylprodukt chemisch durch Erhitzen in Gegenwart des Anthracens erzeugt; die Probleme der Lichtabsorption werden folglich umgangen. Auf diese Weise konnten wichtige, früher schwer zugängliche photophysikalische Daten für den Triplett-Singulett-Energietransfer von chemisch angeregtem Aceton auf 9,10-Dibromanthracen (DBA) in Lösung und in polymeren Matrices erhalten werden^[71,78]. In ähnlicher Weise konnte der Singulett-Singulett-Energietransfer von chemisch angeregtem Aceton auf Ergostatetraenon **62** untersucht werden.



Solche unkonventionellen Energietransfer-Untersuchungen sind überaus vielversprechend für biologisch relevante Aczeptoren. Sogar Makromoleküle und Organellen (Chloroplasten) konnten mit viergliedrigen cyclischen Peroxiden selektiv angeregt werden. Solche Untersuchungen wurden schon mit enzymatisch erzeugten angeregten Zuständen durchgeführt^[37], doch sollten sich authentische Dioxetane als noch brauchbarer erweisen. Die Beobachtung von Exciplex-Emission^[64] bei der direkten Chemilumineszenz von Indolyldioxetanen **63** und die Überlegung, daß sich Exciplexe recht häufig beim Zerfall von Dioxetanen bilden könnten^[48], wirft anregende Fragen auf. Zum Beispiel führt die Zersetzung des optisch aktiven Dioxetans **64** zu circular polarisierter Fluoreszenz des chiralen Adamantanons **65**^[79]. Beim Leuchtkäfer wurde in der Tat circular polarisierte Biolumineszenz beobachtet^[80], und zwar aus dem achiralen Oxyluciferin [Reaktion (e) und (p)]; das Adamantanone **65** hat hingegen ein permanentes chirales Zentrum. Möglicherweise ruft ein durch Exciplex-Bildung erhaltenen chiraler angeregter Zustand des Oxyluciferins die circular polarisierte Biolumineszenz des Leuchtkäfers hervor. Folglich wäre es interessant, ein optisch aktives α -Peroxylacton **66** oder auch ein 1,2-Dioxetan zu synthetisieren.

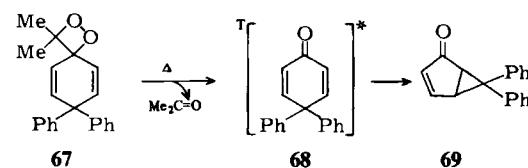


sieren, daß ein achirales Produkt bildet, bei dem aber ein zwischenzeitlich auftretender chiraler angeregter Zustand (vermutlich ein Exciplex) circular polarisierte Chemilumineszenz zeigen könnte. Somit bietet sich eine interessante

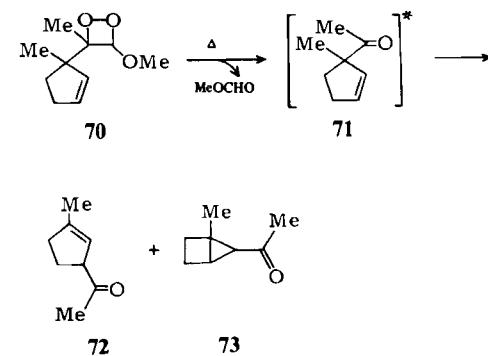
Sonde für die Aufklärung der Geometrie angeregter Zustände an.

Bisdioxetane, z.B. das dimere Benzoesäureanhydrid **22**^[81], sollten hervorragende Edukte für die thermische Erzeugung höherer angeregter Zustände sein. Da jeder Dioxetanring das Äquivalent eines gebundenen Photons ist, könnten solche unkonventionellen Untersuchungen möglicherweise Zwei-Photonen-Prozesse einschließen.

Die chemische Anregung wurde bei photomechanistischen Untersuchungen bisher erstaunlich wenig genutzt. Der Wert der Dioxetane zeigt sich beim Zerfall von **67**, bei dem sich das Enon **69** über den chemisch angeregten $^3n,\pi^*$ -Zustand des Dienons **68** bildet^[82]. Auf diese Weise konnte das alte Problem, ob n,π^* - oder π,π^* -Triplet-Zustände bei der Dienonumlagerung beteiligt sind, gelöst werden.

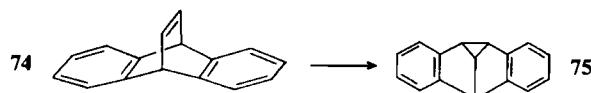


Analog ließ sich das Dioxetan **70** zur Aufklärung der photomechanistischen Details bei der Umlagerung des angeregten Enons **71** in die Produkte **72** (1,3-Acylverschiebung) und **73** (Oxa-di- π -methanumlagerung) nutzen^[83]. Aus dem Vergleich der Ausbeuten an **72** und **73** aus dem chemisch und durch Licht angeregten Enon **71** wurde gefolgt, daß ein n,π^* -Triplet bzw. ein π,π^* -Triplet der Vorläufer für die 1,3-Acylverschiebung bzw. für die Oxa- π -methanumlagerung ist.

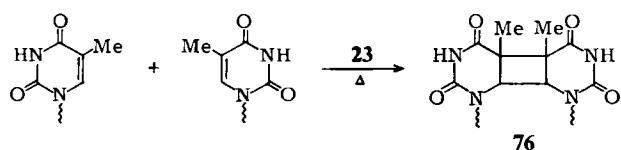


Für diese Nutzbarmachung der chemischen Anregung müssen die spezifischen Anregungsäquivalente, die Dioxetane **67** und **70**, synthetisiert werden. Natürlich ist dies nicht immer eine einfache Aufgabe (siehe Abschnitt 1). Es ist wesentlich bequemer, eine bestimmte photochemische Umwandlung durch Energietransfer unter Verwendung eines chemisch erzeugten angeregten Carbonylprodukts als Donor zu sensibilisieren. Zum Beispiel konnte mit Tetramethyl-1,2-dioxetan **23**, einer Quelle nur für Triplett-Aceton, bestätigt werden, daß die Umlagerung der tetracyclischen Azoverbindung **35** in das Aziridin **37** eine spinspezifische Triplettreaktion ist^[40]. Ähnlich wurde mit chemisch angeregtem Triplett-Aceton nachgewiesen, daß die Di- π -methanumlagerung von Dibenzobarrelen **74** in das Semibullvalen **75** ein spinspezifischer Triplettprozeß ist^[84]. Si-

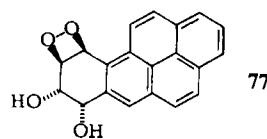
cherlich werden in Zukunft solche photochemischen Anwendungen von Dioxetanen zunehmen.



Über die Beteiligung viergliedriger cyclischer Peroxide an photobiologischen Prozessen und die Nutzung dieser Verbindungen für die Untersuchung solcher Probleme wurde schon nach den ersten Untersuchungen eine recht umfassende Zusammenstellung der Möglichkeiten veröffentlicht^[75, 85]. Entscheidende Fortschritte wurden erzielt, nachdem erstmals die enzymatische Erzeugung triplettangeregter Zustände nachgewiesen worden war^[27].



So wurde z. B. die Lichtschädigung von DNA durch Thymindimerisierung im Hinblick auf die Krebsentstehung intensiv untersucht^[86]. Ein Schlüsselexperiment^[87] brachte den Nachweis, daß aus Tetramethyl-1,2-dioxetan 23 chemisch erzeugtes Triplett-Aceton die DNA durch Bildung von Thymindimeren 76 vernetzt. In der Folge konnte gezeigt werden, daß durch HRP-katalysierte Autoxidation von Isobutyraldehyd biologisch erzeugtes Triplett-Aceton Einzelstrangbrüche^[88] und Veränderung des Circular dichroismus^[89] in der DNA hervorruft. DBAS kann eine solche Schädigung teilweise unterbinden, was die Annahme stützt, daß enzymatisch erzeugtes Triplett-Aceton die schädigende Spezies ist. Die Möglichkeit, daß das Stoffwechsel-System in situ angeregte Zustände über Dioxetan-Zwischenstufen erzeugen kann, wurde kürzlich beim Abbau von Benzo[a]pyren durch Leber-Mikrosomen gezeigt. Die begleitende schwache Chemilumineszenz wurde dem Dioxetan 77 zugeschrieben^[90].



Wenn chemisch und biologisch erzeugte triplettangeregte Zustände bei der DNA über Energietransfer zu Thymindimerisierung führen können, sollte auch die photochemische Behebung eines solchen Schadens im Prinzip auf diese Weise möglich sein. In der Tat zeigen Modellstudien, daß durch Licht angeregte Indole^[91] und Chinone^[92] - Spezies, die im Dunkeln enzymatisch erzeugt werden können - die Spaltung von Thymindimeren 76 induzieren^[93].

Die Photoaffinitätsmarkierung ist ein weiteres vielversprechendes Gebiet^[94]. So konnten die Carbonylfunktionen von Hormonliganden, z. B. Steroidketonen, als Dioxetane oder α -Peroxy lactone maskiert werden. Nach Komplexierung mit dem Rezeptor entsteht durch den Dioxetan-

zerfall der elektronisch angeregte Ligand, der die spezifische Bindungsstelle anzeigt. Der Vorteil einer solchen „Photoaffinitätsmarkierung im Dunkeln“ ist, daß sie in vivo, also auch in wäßrigen Systemen, durchgeführt werden kann. Versuche in dieser Richtung sind im Gange.

Stimulierende bioorganische Probleme, bei welchen „Anregungsäquivalente“ von Interesse sein sollten, betreffen die durch Phytochrome vermittelte Photoregulation^[95], Wirkung von Wachstumshormonen von Pflanzen in Gegenwart von 3-Indolessigsäure^[96], die Umwandlung von Ergosterin in Vitamin D^[97, 98], die Isomerisierung von Retinal^[99], etc. Zusätzlich eröffnet sich die Möglichkeit, eine völlig neue Generation von Chemotherapeutica zu entwickeln.

Wir wollen mit einem Zitat^[100] schließen, welches unsere Überzeugung, daß der Spaß gerade erst begonnen hat, bestens wiedergibt: „Bereits heute besitzt die präparative Strahlenchemie durch ihre besonderen Möglichkeiten einen eigenen Platz innerhalb der Methoden der Chemie. Ihre eigentliche Bedeutung entwickelt sich jedoch aus ihren vielseitigen Beziehungen zu Grenzgebieten, wobei die chemischen Probleme biologischer Strahlenwirkungen besonders aktuell sind“.

Die Autoren möchten Professor Frank H. Quina (Universidade de São Paulo) für seine nie versagende und selbstlose Unterstützung ihren aufrichtigen Dank aussprechen. Dank gilt auch ihren ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern für ihre engagierte, fleißige und anregende Beteiligung. Großzügige finanzielle Unterstützung gaben Financiadora de Estudos e Projetos (Rio de Janeiro), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brasília), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo), Deutsche Forschungsgemeinschaft, Fonds der Chemischen Industrie, Fritz-Thyssen-Stiftung, Alexander-von-Humboldt-Stiftung sowie Stiftung Volkswagenwerk. Die letztere verdient besondere Erwähnung, da sie gegenwärtig die Zusammenarbeit der brasilianischen und der deutschen Gruppe fördert.

Eingegangen am 25. März 1983 [A 459]
Übersetzt von Wilhelm J. Baader, Würzburg

- [1] K. R. Kopecky, C. Mumford, *Can. J. Chem.* 47 (1969) 709.
- [2] W. Adam, J.-C. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 2894.
- [3] W. Adam, G. Cilento: *Chemical and Biological Generation of Electronically Excited States*, Academic Press, New York 1982.
- [4] W. Adam, L. A. Arias, *Chem. Ber.* 115 (1982) 2592.
- [5] G. G. Geller, C. S. Foote, D. B. Pechman, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 673.
- [6] W. Adam, K. Sakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 3965.
- [7] A. Zahn, Diplomarbeit, Universität Würzburg, September 1981.
- [8] H. Nakamura, T. Goto, *Heterocycles* 15 (1981) 1119.
- [9] a) S. F. Nelsen, R. Akaba, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2096; b) E. L. Cleenan, W. Simmons, C. W. Almgreen, *ibid.* 103 (1981) 2098.
- [10] G. Büchi, W. Wüst, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 294.
- [11] D. Leclercq, J.-P. Bats, P. Picard, J. Moulines, *Synthesis* 1982, 778.
- [12] D. Bogan in [3], Kap. 1.
- [13] W. Adam, W. J. Baader, unveröffentlicht.
- [14] O. Shimomura in [3], Kap. 8.
- [15] W. Adam in S. Patai: *The Chemistry of the Peroxide Bond*, Wiley, New York 1983.
- [16] H. Numan, J. H. Wieringa, H. Wynberg, J. Hess, A. Vos, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977, 591.
- [17] A. Krebs, H. Schmalstieg, O. Jarchow, K.-H. Klaska, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 3171.
- [18] a) W. Adam, L. A. Arias, A. Zahn, K. Zinner, E.-M. Peters, K. Peters, H. G. von Schnerring, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 3251; b) W. Adam, E. Schmidt, E.-M. Peters, K. Peters, H. G. von Schnerring, unveröffentlicht.

- [19] W. Adam in [3], Kap. 4.
- [20] N. J. Turro, P. Lechtken, N. E. Schore, G. Schuster, H.-C. Steinmetzer, A. Yekta, *Acc. Chem. Res.* 7 (1974) 97.
- [21] K. A. Horn, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 6649.
- [22] a) N. Durán, O. M. M. Faria Oliveira, M. Haun, G. Cilento, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977, 442; b) O. M. M. Faria Oliveira, M. Haun, N. Durán, P. J. O'Brien, E. J. H. Bechara, G. Cilento, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 4707; c) G. Cilento, N. Durán, K. Zinner, C. C. C. Vidigal, O. M. M. Faria Oliveira, M. Haun, A. Faljoni, O. Augusto, R. Casadei de Baptista, E. J. H. Bechara, *Photochem. Photobiol.* 28 (1978) 445; d) E. J. H. Bechara, O. M. M. Faria Oliveira, N. Durán, R. Casadei de Baptista, G. Cilento, *ibid.* 30 (1979) 101.
- [23] O. Augusto, E. J. H. Bechara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63 (1980) 203.
- [24] C. H. L. Soares, E. J. H. Bechara, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 117.
- [25] V. A. Belyakov, R. F. Vasil'ev, *Photochem. Photobiol.* 11 (1970) 179.
- [26] N. J. Turro, P. Lechtken, G. Orell, H.-C. Steinmetzer, W. Adam, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 1627.
- [27] G. Cilento in [3], Kap. 9.
- [28] N. Durán, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 113.
- [29] M. Haun, N. Durán, G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978) 779.
- [30] M. Haun, N. Durán, O. Augusto, G. Cilento, *Arch. Biochem. Biophys.* 200 (1980) 245.
- [31] a) C. C. C. Vidigal, K. Zinner, N. Durán, E. J. H. Bechara, G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65 (1975) 138; b) N. Durán, K. Zinner, R. Casadei de Baptista, C. C. C. Vidigal, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* 24 (1976) 383; c) C. C. C. Vidigal, A. Faljoni-Alário, N. Durán, K. Zinner, Y. Shimizu, G. Cilento, *ibid.* 30 (1979) 195.
- [32] I. L. Brunetti, G. Cilento, L. Nassi, unveröffentlicht.
- [33] N. Durán, K. Zinner, C. C. C. Vidigal, G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74 (1977) 1146.
- [34] V. S. Kalyanaraman, S. Mahadevan, S. A. Kumar, *Biochem. J.* 149 (1975) 565.
- [35] K. Zinner, C. C. C. Vidigal, N. Durán, G. Cilento, *Arch. Biochem. Biophys.* 180 (1977) 452.
- [36] a) M. P. De Mello, S. M. De Toledo, M. Haun, G. Cilento, N. Durán, *Biochemistry* 19 (1980) 5270; b) M. P. De Mello, S. M. De Toledo, H. Aoyama, H. K. Sarkar, G. Cilento, N. Durán, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 21.
- [37] L. Nassi, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 233.
- [38] G. B. Schuster in [3], Kap. 6.
- [39] N. J. Turro, P. Lechtken, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 2886.
- [40] W. Adam, K. Hannemann, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 714.
- [41] N. Durán, M. Haun, A. Faljoni, G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978) 785.
- [42] S. Ates, G. Somer, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 77 (1981) 859.
- [43] O. Augusto, G. Cilento, J. Jung, P.-S. Song, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83 (1978) 963.
- [44] I. L. Brunetti, E. J. H. Bechara, G. Cilento, E. H. White, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 245.
- [45] H. Poteschlová, J. Hrbek, Jr., F. Santavý, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32 (1967) 141.
- [46] N. Durán, M. Haun, S. M. De Toledo, G. Cilento, E. Silva, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 247.
- [47] a) H. E. O'Neal, W. H. Richardson, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 6553; 93 (1971) 1828; b) W. H. Richardson, H. E. O'Neal, *ibid.* 94 (1972) 8665.
- [48] W. H. Richardson, D. L. Stiggall-Estberg, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4173.
- [49] A. P. Schaap, S. D. Gagnon, K. A. Zaklika, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 2943.
- [50] A. L. Baumstark, T. Dunams, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 3754.
- [51] E. J. H. Bechara, T. Wilson, *J. Org. Chem.* 45 (1980) 5261.
- [52] Y. Ito, H. Yokoya, K. Kyono, S. Yamamura, Y. Yamada, T. Matsuura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1980, 898.
- [53] a) Y. Haas, G. Lahav, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 4885; b) *Chem. Phys. Lett.* 48 (1977) 63; c) W. E. Farneth, G. Flynn, R. Slater, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 7877; d) B. D. Cannon, F. F. Crim, *ibid.* 103 (1981) 6722.
- [54] a) K. K. Smith, J.-Y. Koo, G. B. Schuster, K. J. Kaufmann, *J. Phys. Chem.* 82 (1978) 2291; b) D. C. Doetschman, J. L. Fish, P. Lechtken, D. Negus, *Chem. Phys.* 51 (1980) 89.
- [55] N. J. Turro, P. Lechtken, *Pure Appl. Chem.* 33 (1973) 363.
- [56] a) H.-C. Steinmetzer, P. Lechtken, N. J. Turro, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1973, 1984; b) H.-C. Steinmetzer, A. Yekta, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 282.
- [57] A. L. Baumstark, C. E. Wilson, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 4363.
- [58] C. Babatsikos, Diplomarbeit, Universität Würzburg, September 1981.
- [59] K. R. Kopecky, P. A. Lockwood, R. R. Gomez, J.-Y. Ding, *Can. J. Chem.* 59 (1981) 851.
- [60] W. Adam, K. Zinner in [3], Kap. 5.
- [61] W. H. Richardson, J. H. Burns, M. E. Price, R. Crawford, M. Forster, P. Slusser, J. H. Anderegg, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7596.
- [62] W. Adam, L. A. Arias Encarnación, K. Zinner, *Chem. Ber.* 116 (1983) 839.
- [63] a) L. B. Harding, W. A. Goddard, III, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4520; b) S. P. Schmidt, M. A. Vincent, C. E. Dykstra, G. B. Schuster, *ibid.* 103 (1981) 1292.
- [64] H. Nakamura, T. Goto, *Photochem. Photobiol.* 30 (1979) 27.
- [65] N. J. Turro, A. Devaquet, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 3859.
- [66] a) S. P. Schmidt, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 306, 7100; b) W. Adam, O. Cueto, *ibid.* 101 (1979) 6511.
- [67] a) J.-Y. Koo, S. P. Schmidt, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 30; b) F. McCapra, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977, 946.
- [68] a) E. H. White, E. Rapaport, H. H. Seliger, T. A. Hopkins, *Bioorg. Chem. I* (1971) 92; b) E. H. White, H. Wörther, H. H. Seliger, W. D. McElroy, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 2015.
- [69] A. P. Schaap, S. D. Gagnon, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3504.
- [70] T. Förster, *Comp. Biochem. Physiol.* 22 (1967) 61.
- [71] a) T. Wilson, A. M. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7272; b) R. Schmidt, H. Kelm, H.-D. Brauer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 81 (1977) 402.
- [72] E. Rivas-Suárez, L. H. Catalani, E. J. H. Bechara, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 93.
- [73] E. Rivas-Suárez, G. Cilento, *Biochemistry* 20 (1981) 7329.
- [74] E. Rivas-Suárez, O. Augusto, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 279.
- [75] E. H. White, J. D. Miano, C. J. Watkins, E. J. Breaux, *Angew. Chem.* 86 (1974) 292; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 229.
- [76] G. Cilento, *Photochem. Photobiol. Rev.* 5 (1980) 199.
- [77] E. W. Meijere, W. Wynberg, *J. Chem. Educ.* 59 (1982) 1071.
- [78] a) R. Schmidt, H.-D. Brauer, W. Adam, K. Zinner, *Z. Phys. Chem. (Frankfurt am Main)* 131 (1982) 129; b) W. Adam, G. Cilento, K. Zinner, *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 87; c) W. Adam, O. Rodriguez, K. Zinner, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 4495; d) W. Adam, E. M. Cancio, O. Rodriguez, *Photochem. Photobiol.* 27 (1978) 617; e) N. J. Turro, I. E. Kochevar, Y. Noguchi, M.-F. Chow, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 3170; f) N. J. Turro, *Pure Appl. Chem.* 49 (1977) 405.
- [79] W. Wynberg, H. Numan, H. P. J. M. Dekkers, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 3870.
- [80] H. Wynberg, E. W. Meijere, J. C. Hummelen, *Nature (London)* 265 (1980) 641.
- [81] W. Adam, C.-C. Cheng, O. Cueto, I. Erden, K. Zinner, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 4735.
- [82] H. E. Zimmerman, G. E. Keck, J. L. Pfleiderer, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 5574.
- [83] M. J. Mirbach, A. Henne, K. Schaffner, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7127.
- [84] W. Adam, O. De Lucchi, K. Peters, E.-M. Peters, H. G. von Schnering, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5747.
- [85] a) G. Cilento, *Q. Rev. Biophys.* 6 (1973) 485; b) *J. Theor. Biol.* 55 (1975) 471.
- [86] W. Wissbroth, *Chem.-Ztg.* 107 (1983) 1.
- [87] A. Lamola, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 (1971) 893.
- [88] R. Meneghini, M. E. Hoffmann, N. Durán, A. Faljoni, G. Cilento, *Biochim. Biophys. Acta* 518 (1978) 177.
- [89] A. Faljoni, M. Haun, M. E. Hoffmann, R. Meneghini, N. Durán, C. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978) 490.
- [90] H. H. Seliger, A. Thompson, J. P. Hammann, G. H. Posner, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 359.
- [91] C. Hélène, M. Charlier, *Photochem. Photobiol.* 25 (1977) 429.
- [92] a) S. Sason, D. Elad, *J. Org. Chem.* 37 (1977) 3164; b) H. D. Roth, H. H. Lamola, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1013.
- [93] J. A. Montgomery, *J. Med. Chem.* 23 (1980) 1063.
- [94] a) W. Chowdhry, F. H. Westheimer, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 293; b) J. R. Knowles, *Acc. Chem. Res.* 5 (1972) 155.
- [95] W. Shropshire in K. C. Smith: *The Science of Photobiology*, Plenum Press, New York 1977, S. 281-312.
- [96] P. J. Davies, A. W. Galston, *Plant Physiol.* 47 (1971) 435.
- [97] E. F. Ullman, US-Pat. 3 689 291; *Chem. Abstr.* 78 (1972) 3585 r.
- [98] G. A. Blondin, B. D. Kulkarni, W. R. Nes, *Comp. Biochem. Physiol.* 20 (1967) 379.
- [99] W. H. Waddell, R. Crouch, K. Nakanishi, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 4189.
- [100] G. O. Schenck, *Angew. Chem.* 69 (1957) 579.