

- [19] S. Moore & W. H. Stein, 'Methods in Enzymology', Hirs Ed., Vol. 6, 819, Academic Press, New York 1963.
- [20] W. L. Bencze & K. Schmid, *Analyt. Chemistry* 29, 1193 (1957).
- [21] C. C. Sweely, R. Bentley, M. Makita & W. W. Wells, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 2497 (1963).
- [22] R. J. Winzler, *Meth. Biochem. Anal.* 2, 279 (1955).
- [23] C. François, R. D. Marshall & A. Neuberger, *Biochem. J.* 83, 335 (1962).
- [24] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers & J. Smith, *Analyt. Chemistry* 28, 350 (1956).
- [25] J. F. McKelvy & Y. C. Lee, *Arch. Biochemistry Biophysics* 132, 99 (1969).
- [26] Z. Dische, *Methods Carbohydrate Chemistry* 1, 477 (1962).
- [27] J. M. Sempere, C. Gancedo & C. Asensio, *Analyt. Biochemistry* 12, 509 (1965).
- [28] L. Svennerholm, *Acta chem. scand.* 12, 547 (1958).
- [29] L. Warren, *J. biol. Chemistry* 234, 1971 (1959).
- [30] S. Gardell, *Acta chem. scand.* 7, 207 (1953).
- [31] N. F. Boas, *J. biol. Chemistry* 204, 553 (1953).
- [32] L. A. Elson & W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* 27, 1824 (1933).
- [33] G. J. M. Rondle & W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* 61, 586 (1955).
- [34] J. G. Kraan & H. Muir, *Biochem. J.* 66, 55 P (1957).
- [35] F. Auricchio & C. B. Bruni, *Biochem. Z.* 340, 321 (1964).
- [36] A. L. Shapiro, E. Viñuela & J. V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).
- [37] K. Weber & M. Osborn, *J. biol. Chemistry* 244, 4406 (1969).
- [38] J. W. Keyser, *Analyt. Biochemistry* 9, 249 (1964).
- [39] C. Tanford, K. Kawahara & S. Lapanje, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 729 (1967).
- [40] F. J. Castellino & R. Barker, *Biochemistry* 7, 2207 (1968).
- [41] F. A. Bovey & S. S. Yanari in P. D. Boyer, H. Lardy & K. Myrback (Eds.), 'The Enzymes', IV, 63, Academic Press, New York 1960.

48. ESR.-Untersuchung zur Reaktion von Hydroxylradikalen mit Glycin

von H. Paul und H. Fischer

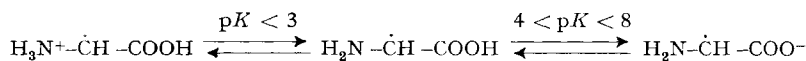
Physikalisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Schweiz

(12. I. 71)

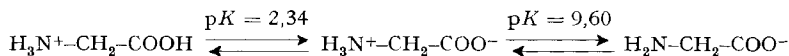
Summary. Radicals $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$ and $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COO}^-$ which have different ESR. spectra are observed during the reaction of hydroxyl radicals with glycine in aqueous solution. Rapid and reversible exchange between the different dissociated radicals is induced by addition of phosphoric acid. The pH dependence of the ESR. spectra yields the pK value and rate constants for proton transfer reactions between the radicals and phosphoric acid.

ESR.-Spektren kurzlebiger Radikale, die bei der Reaktion von Hydroxylradikalen mit Glycin in wässrigen Lösungen entstehen, sind bereits von mehreren Autoren angegeben worden [1]–[7]. Die Spektren hängen stark vom pH-Wert der Lösungen ab. Für $\text{pH} > 8$ lassen sie sich mit einiger Sicherheit dem Radikal $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COO}^-$ zuordnen, dessen NH_2 -Protonen inäquivalent erscheinen [3] [4] [6] [7]. Im Bereich $3 < \text{pH} < 4$ wurde ein Spektrum beobachtet, das nach Smith und Mitarb. [5] dem Radikal $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$ zugehört und äquivalente NH_2 -Protonen aufweist. Andere Autoren [1] [4] haben andere Interpretationen des in diesem pH-Bereich beobachteten

Spektrums angegeben. Ist die von *Smith* [5] vorgeschlagene Deutung richtig, so sollte sich die Folge der verschiedenen Dissoziationsstufen des Radikals



stark von der des Glycins [8]



unterscheiden. Die in bestrahlten Glycinkristallen beobachtete [9] zwitterionische Form $\text{H}_3\text{N}^+\text{-}\dot{\text{C}}\text{H-COO}^-$ sollte in wässrigen Lösungen, im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Hayon* und Mitarb. [10], nicht auftreten.

Um dies genauer zu prüfen, haben wir die ESR.-Spektren der durch Reaktion von Hydroxylradikalen mit Glycin in wässrigen Lösungen entstehenden Radikale vor allem im Übergangsbereich $4 \leq \text{pH} \leq 9$ untersucht, für den noch keine Messungen vorliegen. Zur Erzeugung der Hydroxylradikale wurde das früher beschriebene [6] Durchflussverfahren mit dem Redoxsystem $\text{Ti}^{3+}/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ eingesetzt ($[\text{Ti}^{3+}] = 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$, $[\text{EDTA}] = 7 \cdot 10^{-3}\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \cdot 10^{-1}\text{M}$).

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von KOH bzw. HCl variiert. Die Glycinkonzentration betrug 2 M im reduzierenden Strom, die Temperatur der Lösungen $10^\circ \pm 1^\circ$. Die ESR.-Spektren wurden mit dem Spektrometer E-9 (*VARIAN*) aufgenommen und durch Protonenresonanzbestimmungen der Feldstärke vermessen. *g*-Faktoren wurden aus der Mikrowellenfrequenz und der Magnetfeldstärke berechnet.

Fig. 1 zeigt im oberen Teilbild ein bei $\text{pH} = 5,9$ beobachtetes Spektrum. Es stimmt mit den von anderen Autoren bei $\text{pH} = 3,9$ [5] und $\text{pH} = 4,0$ [4] gefundenen Spektren überein und lässt sich unter Annahme der Gültigkeit der Interpretation durch $\text{H}_2\text{N-}\dot{\text{C}}\text{H-COOH}$ durch die Parameter $a_{\text{H}}^{\text{CH}} = (12,12 \pm 0,05)$ G, $a_{\text{N}} = (6,35 \pm 0,05)$ G, $a_{\text{H}}^{\text{NH}_2}(1) = a_{\text{H}}^{\text{NH}_2}(2) = (5,40 \pm 0,05)$ G, $a_{\text{COOH}}^{\text{H}} = (0,90 \pm 0,05)$ G und $g = (2,00344 \pm 0,00003)$ beschreiben. Das untere Teilbild von Fig. 1 gibt ein bei $\text{pH} = 8,3$ erhaltenes Spektrum wieder. Es gehört im wesentlichen dem Radikal $\text{H}_2\text{N-}\dot{\text{C}}\text{H-COO}^-$ mit $a_{\text{H}}^{\text{CH}} = (13,71 \pm 0,02)$ G, $a_{\text{N}} = (6,10 \pm 0,02)$ G, $a_{\text{H}}^{\text{NH}_2}(1) = (3,47 \pm 0,02)$ G, $a_{\text{H}}^{\text{NH}_2}(2) = (3,02 \pm 0,02)$ G und $g = (2,00341 \pm 0,00003)$ zu. Neben dem Spektrum dieses Radikals treten bei $\text{pH} = 8,3$ weitere, intensitätsschwächere Linien auf, deren Lagen durch die Parameter $a = (15,88 \pm 0,04)$ G (1:1), $a = (3,29 \pm 0,04)$ G (1:1), $a = (2,09 \pm 0,04)$ G (1:1:1) und $g = (2,00341 \pm 0,00003)$ beschrieben werden. Eine Deutung dieses Spektrums ist uns nicht gelungen.

Bei Erhöhung des pH-Wertes von $\text{pH} = 5,9$ auf $\text{pH} = 8,3$ nimmt die Intensität des bei $\text{pH} = 5,9$ beobachteten Spektrums ab. Es kann ab $\text{pH} \approx 7,1$ nicht mehr nachgewiesen werden. Ab $\text{pH} \approx 6,3$ erscheint das dem Radikal $\text{H}_2\text{N-}\dot{\text{C}}\text{H-COO}^-$ zugeordnete Spektrum. Bei $\text{pH} = 6,8$ wird das im mittleren Teilbild von Fig. 1 dargestellte Spektrum gefunden, das eine Superposition der bei $\text{pH} = 5,9$ und $\text{pH} = 8,3$ beobachteten Spektren darstellt. Der Übergang des einen Spektrums in das andere erfolgt ohne merkliche Linienverbreiterungseffekte. Bei Gültigkeit der Deutung nach *Smith* [5] bedeutet dies, dass die mittleren Lebensdauern der Radikale in den beiden Dis-

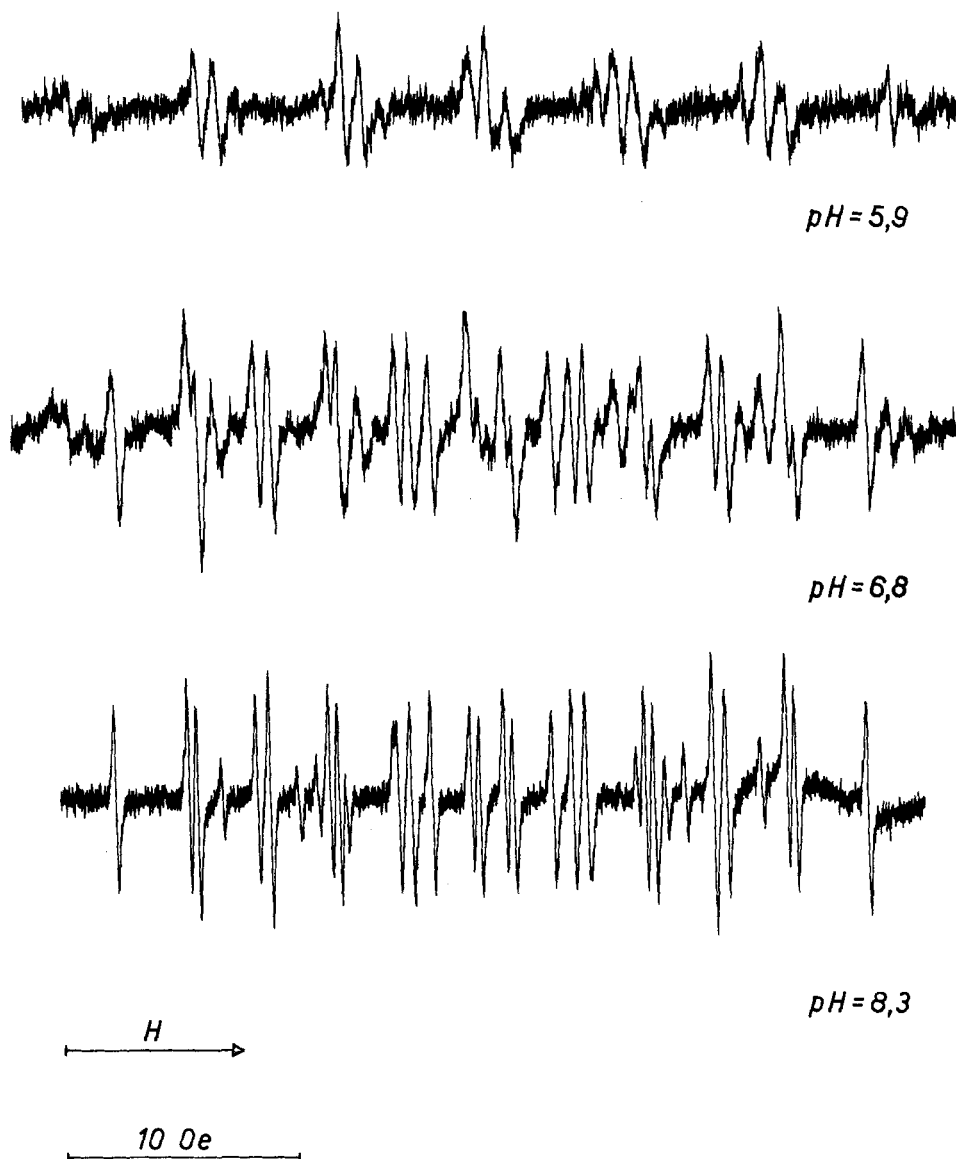
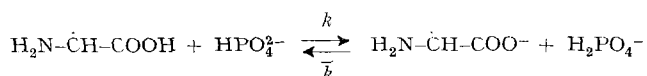


Fig. 1. ESR.-Spektren während der Reaktion von $\cdot OH$ mit $H_3N^+-CH_2-COO^-$ bei verschiedenen pH-Werten

soziationsformen im Übergangsbereich gross gegen die reziproken Frequenzdifferenzen entsprechender Linien in den beiden Grenzspektren (pH = 5,9 und pH = 8,3) sind [11]. Bei kleinen Lebensdauern wäre ein anderes Verhalten der Spektren im Übergangsbereich zu erwarten: Es sollte jeweils ein Radikal beobachtet werden, dessen Aufspaltungsparameter pH-abhängige Mittelwerte der den beiden Grenzformen zugehörigen Aufspaltungsparameter sind. Ein solches Verhalten würde die Deutung

nach *Smith* [5] direkt stützen. Wie im folgenden gezeigt wird, lassen sich kleine Lebensdauern der Radikale in den beiden Dissoziationsformen durch Zugabe von Phosphorsäure erzwingen, die im Bereich $5 \leq \text{pH} \leq 8$ die Austauschreaktion



induziert.

Das in Fig. 2 dargestellte Spektrum wurde bei $\text{pH} = 6,8$ mit Lösungen erhalten, denen $0,5\text{M H}_3\text{PO}_4$ zugesetzt war. Aus dem Interpretationsschema geht hervor, dass die Lagen der Linien in diesem Spektrum Mittelwerte der Linienlagen in den Grenzspektren ($\text{pH} = 5,9$ und $\text{pH} = 8,3$, Fig. 1) sind. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist im Interpretationsschema des Spektrums von $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$ die Aufspaltung $a_{\text{H}}^{\text{COOH}}$ nicht berücksichtigt. Bei anderen pH -Werten wurden entsprechende Spektren raschen Austauschs erhalten. Damit scheint uns die Deutung der ESR.-Spektren in sauren Lösungen ($3 \leq \text{pH} \leq 6$) durch $\text{R}\cdot = \text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$ und in basischen Lösungen ($\text{pH} \geq 7$) durch $\text{R}\cdot^- = \text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COO}^-$ gesichert.

Die Aufspaltungsparameter der im Übergangsbereich bei Zusatz von $0,5\text{M H}_3\text{PO}_4$ beobachteten Spektren sind in Fig. 3 als Funktion des pH -Wertes angegeben. Da die Aufspaltungsparameter auch von der Ionenstärke der Lösungen abhängen, wurden Änderungen der Ionenstärke infolge Dissoziation von H_3PO_4 im Übergangsbereich

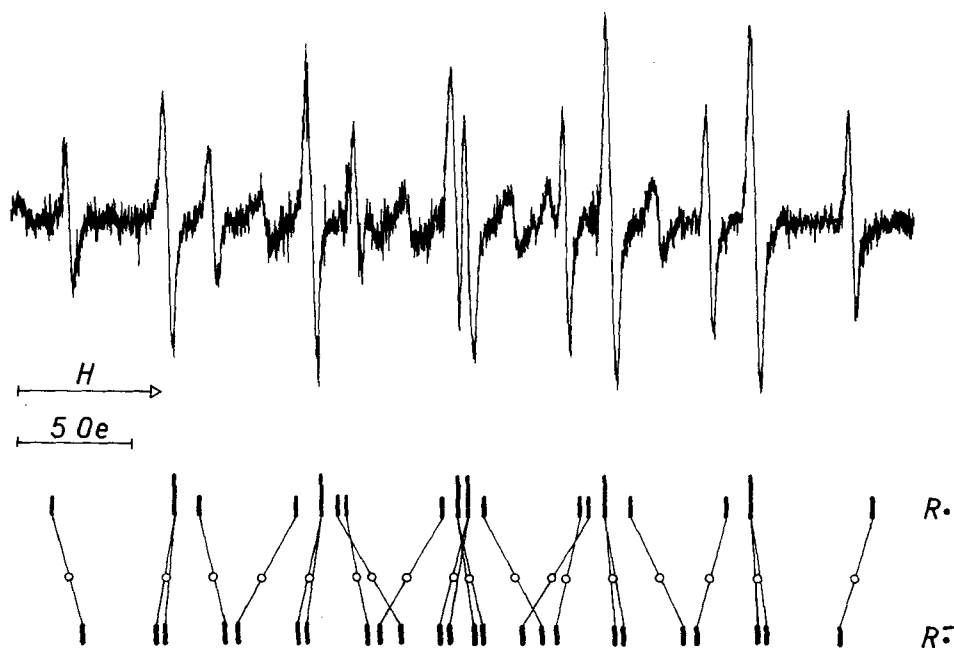


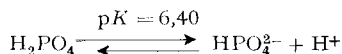
Fig. 2. ESR.-Spektrum während der Reaktion von $\cdot\text{OH}$ mit $\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ bei $\text{pH} = 6,8$ in $0,5\text{M}$ Phosphorsäure

durch Zugabe von KCl kompensiert. Die in Fig.3 durchgezeichneten Kurven entsprechen den für raschen Austausch erwarteten pH-Abhängigkeiten

$$\bar{a}(\text{pH}) = a(\text{R}\cdot) \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH}-\text{pK})}} + a(\text{R}\cdot^-) \frac{1}{1 + 10^{-(\text{pH}-\text{pK})}}$$

und wurden mit dem für die gewählte Ionenstärke geltenden pK -Wert des Radikals $\text{pK} = 6,66 \pm 0,05$ und den an der Ordinate von Fig.3 ablesbaren Aufspaltungsparametern von $\text{R}\cdot$ und $\text{R}\cdot^-$ angepasst.

Aus dem durch die Anpassung gewonnenen pK -Wert des Radikals lässt sich das Verhältnis der den Austausch mit Phosphorsäure charakterisierenden Konstanten k und \bar{k} unter Verwendung des für gleiche Ionenstärke geltenden pK -wertes der Phosphorsäure



zu

$$\frac{k}{\bar{k}} = 10^{\text{pK}(\text{H}_2\text{PO}_4^-) - \text{pK}(\text{R}\cdot)} = 0,55$$

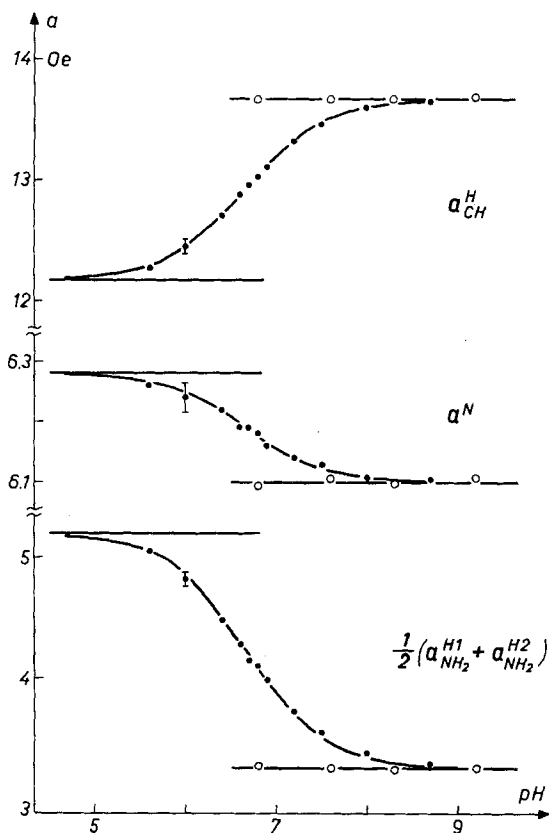


Fig. 3. pH -Abhängigkeit der Aufspaltungsparameter von $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COO}^-$ (o) und bei schnellem Austausch zwischen $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COO}^-$ und $\text{H}_2\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$ (●)

bestimmen. Die Einzelwerte der Konstanten folgen weiter aus der Analyse der in Fig. 2 erkennbaren Linienverbreiterungen im Übergangsbereich. Im Fall noch raschen Austauschs gilt für die Breite eines ESR.-Überganges i , gemessen als Abstand zwischen den Extrema der 1. Ableitung in Frequenzeinheiten [11]

$$\langle \Delta H_{ms} \rangle_i = \langle \Delta H_{ms} \rangle_i^{\circ} + \frac{8\pi^2}{\sqrt{3}} P_{R\cdot}^2 P_{R\cdot-}^2 (\nu_{R\cdot} - \nu_{R\cdot-})_i^2 \left\{ \frac{1}{\bar{k}[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} + \frac{1}{k[\text{HPO}_4^{2-}]} \right\},$$

wobei $\langle \Delta H_{ms} \rangle_i^{\circ}$ die Breite des nicht durch Austausch verbreiterten Überganges, $P_{R\cdot} = (1 + 10^{-(\text{pH}-\text{pK})})^{-1}$, $P_{R\cdot-} = (1 + 10^{-(\text{pH}-\text{pK})})^{-1}$ und $(\nu_{R\cdot} - \nu_{R\cdot-})_i$ die Differenz der Lagen der Linie in den Spektren von $R\cdot$ und $R\cdot-$ sind. In Fig. 4 sind die Differenzen der Linienbreiten zweier Linien i und j als Funktion der Differenzen $\delta(\Delta\nu)_{ij}^2 = |(\nu_{R\cdot} - \nu_{R\cdot-})_i^2 - (\nu_{R\cdot} - \nu_{R\cdot-})_j^2|$ aufgetragen. Sie zeigen die erwartete lineare Abhängigkeit. Aus der Steigung der Geraden folgen mit den bekannten pK -Werten von Radikal und Phosphorsäure und der Phosphorsäurekonzentration $\text{H}_3\text{PO}_4 = 0,5\text{M}$ die Werte

$$k = (1,4 \pm 0,5) \cdot 10^9 \text{ l/Mol s}, \quad \bar{k} = (2,5 \pm 0,5) \cdot 10^9 \text{ l/Mol s}.$$

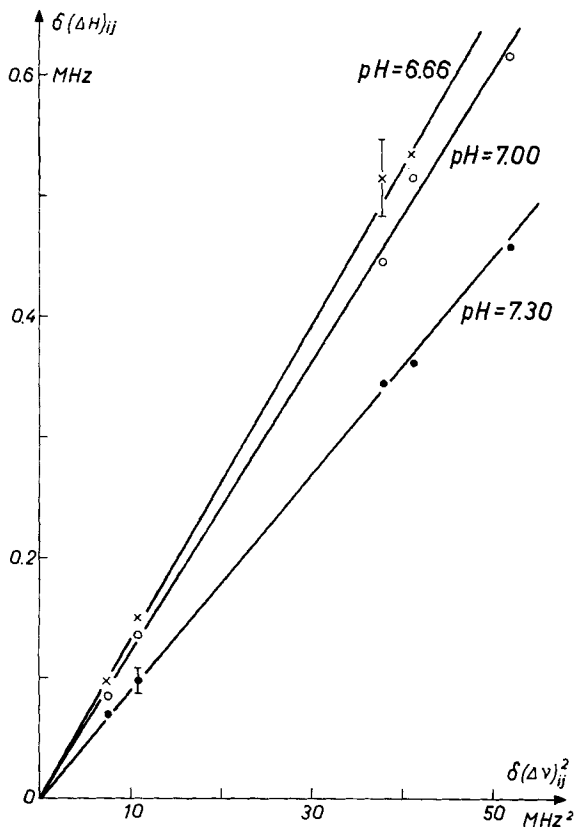


Fig. 4. Linienbreitendifferenzen $\delta(\Delta H)_{ij}$ als Funktion der Differenz der Quadrate von Linienverschiebungen $\delta(\Delta\nu)_{ij}^2$ bei verschiedenen pH -Werten

Diese Werte liegen in der für diffusionskontrollierte Protonenübertragungsreaktionen in wässrigen Lösungen erwarteten Grössenordnung [12].

Die hier dargelegten Ergebnisse bestätigen bereits früher vorgeschlagene Interpretationen der ESR.-Spektren von Radikalen, die bei der Reaktion von Hydroxylradikalen mit Glycin gebildet werden, und erhärten die Vermutung, dass sich die Reihenfolge und Lage der pK-Werte der Glycinradikale stark von denen des Glycins unterscheiden. Ähnlich grosse Unterschiede der pK-Werte von Radikalen und Ausgangssubstanzen sind bisher ESR.-spektroskopisch nicht beobachtet worden [13]. Wir vermuten, dass sie im vorliegenden Fall durch die starke Delokalisation des Radikalelektrons über die NH₂-Gruppe [2] [4] [6] bewirkt wird, die einer starken Beimischung der mesomeren Grenzstruktur H₂N[⊕] - [⊖]CH-COOH entspricht.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds* für die Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *W. A. Armstrong & W. G. Humphreys*, *Canad. J. Chemistry* **45**, 2589 (1967).
- [2] *H. Taniguchi, K. Fukui, S. Ohnishi, H. Hatano, H. Hasegawa & T. Maruyama*, *J. physic. Chemistry* **72**, 1926 (1968).
- [3] *R. Poupko, B. L. Silver & A. Loewenstein*, *Chem. Commun.* **1968**, 453.
- [4] *R. Poupko, B. L. Silver & A. Loewenstein*, pers. Mitteilung.
- [5] *P. Smith, W. M. Fox, D. J. McGinty & R. D. Stevens*, *Canad. J. Chemistry* **48**, 480 (1970).
- [6] *H. Paul & H. Fischer*, *Ber. Bunsenges.* **73**, 972 (1969).
- [7] *P. Neta & R. W. Fessenden*, pers. Mitteilung.
- [8] *J. P. Greenstein & M. Winitz*, «*Chemistry of the Amino Acids*», Vol. 1 Wiley, New York 1961.
- [9] *D. K. Gosh & D. H. Whiffen*, *Mol. Physics* **2**, 285 (1959).
- [10] *P. Neta, M. Simic & E. Hayon*, *J. physic. Chemistry* **74**, 1214 (1970).
- [11] *A. Carrington & A. D. McLachlan*, «*Introduction to Magnetic Resonance*», Harper + Row, New York 1967.
- [12] *M. Eigen*, *Angew. Chem.* **75**, 489 (1963).
- [13] *H. Fischer, K.-H. Hellwege & M. Lehnig*, *Ber. Bunsenges.* **72**, 1166 (1968).

49. Chiroptische Eigenschaften und absolute Konfiguration von 9,9'-Spirobifluoren-Derivaten^{1) 2)}

von **G. Haas³⁾**, **P. B. Hulbert⁴⁾**, **W. Klyne⁴⁾**, **V. Prelog³⁾** und **G. Snatzke⁵⁾**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, Westfield College, University of London, und Organisch-chemisches Institut der Universität Bonn

(12. I. 71)

Summary. The circular dichroism and optical rotatory dispersion of three vespirenes, three vespirones, and of some related 9,9'-spirobifluorene derivatives [4] have been measured. The absolute configurations of these compounds have been determined from chiroptical properties

- 1) Herrn Professor *H. H. Inhoffen*, Braunschweig, von den Autoren zum 65sten Geburtstag gewidmet.
- 2) Zugleich 43. Mitt. über Circulardichroismus von *G. S.* [1] und 73. Mitt. der Westfield-Publikationsserie von *W. K.* [2].
- 3) Organisch-chemisches Laboratorium der ETH, Zürich.
- 4) Westfield College, University of London.
- 5) Organisch-chemisches Institut der Universität, Bonn.