

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Wilcoxon and Related Tests of Significance

VAN DER VAART¹ has given exact expressions for the probability of obtaining a result in the Wilcoxon two-sample test deviating by a given amount or more from that expected, when the two samples are drawn from the same population. In his terminology, if n_1 and n_2 are the numbers in the two samples, and U_{12} is the number of pairs of individuals, in which the value observed for the member of the first sample exceeds the value observed for the second, he finds the exact probability that $U_{12} \leq u$, where u is the observed value. To do so, it is necessary to evaluate two determinants of degree u . If u is fairly large, for example 23 in one of his examples, "the calculations" he writes "may turn out to be somewhat cumbersome".

HALDANE and SMITH² have solved this problem approximately. But as their work was concerned with a question of human genetics, it seems to have escaped the notice of some statisticians. In VAN DER VAART's terminology, and choosing $n_2 \leq n_1$, their equations (10) and (11) become:

$$X = \frac{1}{2}n_2 + (u + \frac{1}{2} - \frac{1}{2}n_1n_2) [n_1(n_1 + n_2 + 1)]^{-\frac{1}{2}}$$

and

$$P(U_{12} \leq u) = \frac{X^{n_2}}{n_2!0!} - \frac{(X-1)^{n_2}}{(n_2-1)!1!} + \frac{(X-2)^{n_2}}{(n_2-2)!2!} - \dots + \frac{(-1)^r (X-r)^{n_2}}{(n_2-r)!r!},$$

where r is the greatest integer not exceeding X . This expression is not very accurate when n_2 is less than about 4, nor for very small values of P . But, as the following examples show, it is good enough for practical purposes over the range of values of P which are usually taken as critical in tests of significance. VAN DER VAART gives two numerical examples.

For $n_1 = 49$, $n_2 = 2$, $u = 7$, he finds

$$P(U_{12} \leq 7) = 0.015686.$$

Our formula gives $X = 0.17784$, $P = 0.01581$.

For $n_1 = 21$, $n_2 = 5$, $u = 23$, he finds

$$P(U_{12} \leq 23) = 0.028717.$$

Our formula gives $X = 1.2821$, $P = 0.02863$.

¹ H. R. VAN DER VAART, *Exper.* 12, 14 (1956).

² J. B. S. HALDANE and C. A. B. SMITH, *Ann. Eugen.* 14, 117 (1948).

In the first case only one term of the series was required, in the second two. The calculation takes about 5 min. We also gave methods for combining the results of several pairs of samples, for dealing with "ties", or equality between members of the two samples, and so on. VAN DER VAART's method, being exact, is perhaps preferable to ours for values of u up to 4 or 5, but I think that at higher values the simplicity of our method makes up for its slight inaccuracy.

J. B. S. HALDANE

Department of Biometry, University College, London, February 23, 1956.

Résumé

Une formule assez simple permet le calcul rapide des probabilités dans le test de WILCOXON et d'autres méthodes semblables. Sans fournir des résultats exacts, elle donne, dans les exemplaires choisis, des chiffres qui se rapprochent de la formule exacte de VAN DER VAART, avec des erreurs inférieures à 1%.

The Structure of Isothebaine

The alkaloid isothebaine, isolated by GADAMER¹ from the roots of *Papaver orientale* during the period of withering and rest of the plant, was examined in detail by KLEE², who degraded the methyl ether through a trimethoxyvinylphenanthrene to a trimethoxyphenanthrene carboxylic acid, which on decarboxylation afforded 3:4:5-trimethoxyphenanthrene (I); the work was repeated and the identity of the final product confirmed by SCHLITTLER and MÜLLER³. In view of the agreement of these independent workers the contention of KISELEV and KONOVALOVA⁴ that the end-product of the degradation is not identical with 3:4:5-trimethoxyphenanthrene may be discounted. On the basis of this degradation isothebaine methyl ether has been hitherto allotted the structure (II, $R = \text{Me}$)⁵, but attempts to

¹ J. GADAMER, *Arch. Pharm.* 249, 41 (1911).

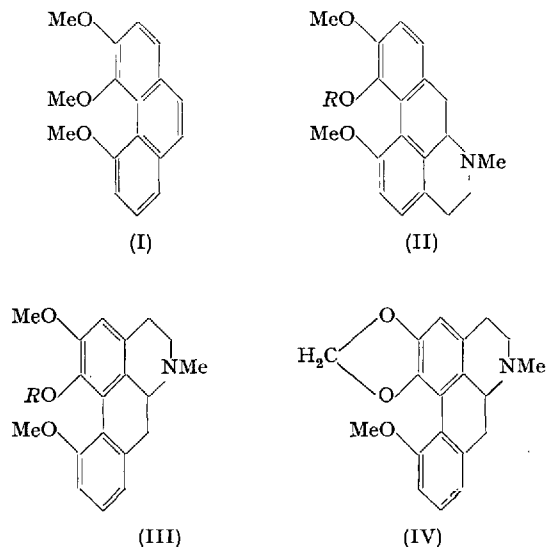
² W. KLEE, *Arch. Pharm.* 252, 211 (1914).

³ E. SCHLITTLER and J. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* 31, 1119 (1948).

⁴ V. V. KISELEV and R. A. KONOVALOVA, *J. gen. Chem. (USSR)* 19, 148 (1949).

⁵ W. KLEE, *Arch. Pharm.* 252, 211 (1914). - E. SCHLITTLER and J. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* 31, 1119 (1948).

synthesize a base of this constitution by a variety of methods have failed⁶.



What appears to have escaped notice until now, however, is that the results of degradation are equally explicable on the basis of the structure (III, $R = \text{Me}$), which we now propose for isothebaine methyl ether. That isothebaine is a 4:5:6-trioxyaporphine may be inferred from the following facts.

(a) All other naturally-occurring aporphine alkaloids, even the dioxy-bases roemerine⁷ and anohaine⁸, have oxygen substituents in positions 5 and 6 (i.e. in positions 6 and 7 of the *isoquinoline* system); in particular a base having the 4:5:6-orientation of substituents, namely pukateine (IV)⁹, is known to occur naturally.

(b) All naturally-occurring bases derived from *isoquinoline* have oxygen substituents in positions 6 and 7 of the *isoquinoline* ring, except 3 bases of the *cularine* group¹⁰, which are 7:8-disubstituted, and evidently arise by cyclisation of the *isoquinoline* ring *ortho* instead of *para* to hydroxyl. In contrast numerous bases derived from *benzylisoquinoline* are known with only one oxygen substituent in the benzyl group (e.g. coclaurine, armapavine, corpaverine, tuduranine, laureline, pukateine, anolobine, stephanine, and almost all the bisbenzylisoquinoline alkaloids¹⁰).

($\pm$)-4:5:6-Trimethoxyaporphine has been synthesized by GOVINDACHARI and PAI¹¹, and Professor GOVINDACHARI has been able to supply us with a few milligrams of somewhat impure hydriodide of this base, the infra-red spectrum of which, together with that of pure (+)-isothebaine methyl ether hydriodide, in Nujol, is shown in Figure 1. The fact that only a salt was available

precluded the comparison of the spectra in solution, and bearing in mind that the racemate necessarily has a crystal form different from that of the pure (+)-isomer,

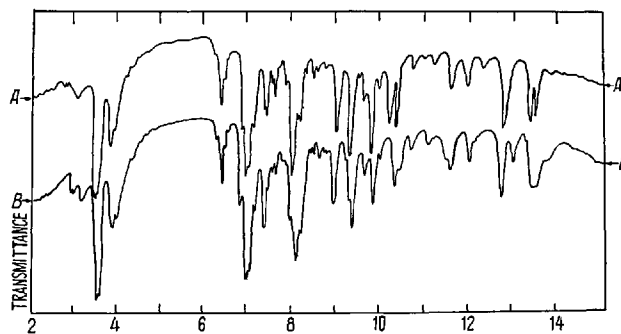


Fig. 1.—Curve A is 4:5:6-trimethoxyaporphine hydriodide; Curve B is isothebaine methyl ether hydriodide.

difference in the spectra of the two salts in Nujol mulls would be expected due to differences in distortion in the two forms of crystal. Some differences do exist between the spectra shown in Figure 1, but these are no greater

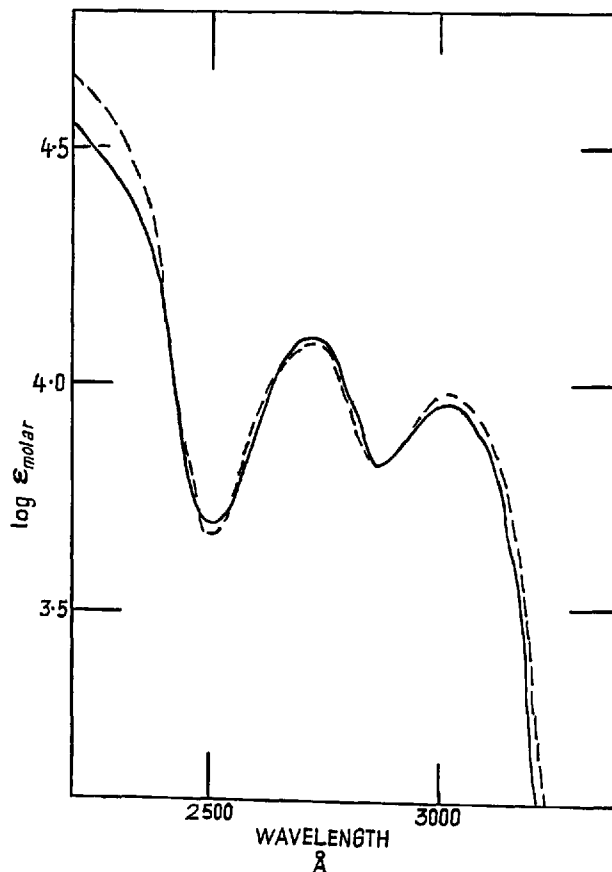


Fig. 2.— — is isothebaine methyl ether; - - - is 4:5:6-trimethoxyaporphine.

⁶ E. SCHLITTLER and J. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* 31, 1119 (1948). — R. K. CALLOV, J. M. GULLAND and R. D. HAWORTH, *J. chem. Soc.* 1929, 1444.

⁷ G. BARGER and G. WEITNAUER, *Helv. chim. Acta* 22, 1036 (1939). — L. MARION and V. GRASSIE, *J. Amer. chem. Soc.* 66, 1290 (1944).

⁸ G. BARGER and G. WEITNAUER, *Helv. chim. Acta* 22, 1036 (1939).

⁹ G. BARGER and E. SCHLITTLER, *Helv. chim. Acta* 15, 381 (1932).

¹⁰ R. H. F. MANSKE, *The Alkaloids*, Vol. 4 (Academic Press Inc., New York, 1954).

¹¹ T. R. GOVINDACHARI and B. R. PAI, *J. org. Chem.* 18, 1352 (1953).

than those we have observed in the spectra of polymorphic forms of the same substance in Nujol on several occasions, and we believe that the spectra shown in Figure 1 strongly support, though do not conclusively establish the structure (III, $R = \text{Me}$) for isothebaine methyl ether. The ultra-violet spectra of the synthetic and natural materials are identical (Fig. 2).

Isothebaine is cryptophenolic and presumably has an *o*:*o*'-substituted phenolic nucleus, and for the alkaloid itself we propose the structure (III, $R = H$), which is strongly supported by the fact that isothebaine gives only a pale fawn colour when treated with diazotized sulphanilic acid in alkaline solution. All 4-hydroxy-bases of the aporphine and morphine groups with a vacant position 1 that we have examined couple immediately with diazotized sulphanilic acid under these conditions to give intensely red solutions, and thus the only other possible cryptophenolic structure, (II, $R = H$) can be ruled out of consideration. Indeed the structure (III, $R = H$) is the only phenolic structure based on a 4:5:6- or a 3:4:5-trioxyaporphine that has not got a free position *ortho* or *para* to hydroxyl available for coupling with diazonium salts.

In further pursuit of this problem the synthesis and resolution of 5-ethoxy-4:6-dimethoxyaporphine for comparison with (+)-isothebaine ethyl ether is now in progress.

We wish to thank Professor T. R. GOVINDACHARI for the kind gift of a sample of ($\pm$)-4:5:6-trimethoxyaporphine hydriodide, Dr. J. MÜLLER of CIBA Limited, Basle, for the very generous gift of 1.5 g of isothebaine hydrochloride, and Dr. F. B. STRAUSS and Mr. F. H. L. HASTINGS of the Dyson Perrins Laboratory, Oxford, for the determination of the infra-red spectra.

K. W. BENTLEY and S. F. DYKE

The Chemistry Department, The University, Aberdeen, March 10, 1956.

Zusammenfassung

Beweismaterial wird vorgelegt, das entschieden darauf hindeutet, dass Isothebain-methyläther (+)-4:5:6-Tri-methoxyaporphin und Isothebain (+)-5-Oxy-4:6-di-methoxyaporphin ist.

Zur biologischen Bedeutung von Fe^{3+} und Cu^{2+} als Komplexbildner

Die Frage, in welcher Weise sich die von den Organismen aufgenommenen Metallionen auf die verschiedenen, für das biochemische Geschehen wichtigen – und in den Fermenten zum Beispiel sicher sehr spezifisch strukturierten – Chelatgruppen verteilen und wie, angesichts des stark unterschiedlichen Komplexbildungsvermögens der «biologischen» Ionen, diese Verteilung aufrechterhalten werden kann, oder aber mit welchen Änderungen in dieser Ordnung im Laufe der Zeit zu rechnen ist, ist in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Anlässlich der Tagung der Gerontologischen Gesellschaft in Basel wurde¹ auf Grund der aus der «Irving-Williams-Reihe»² für die M^{2+} abzuleitenden Gefährdung der Metallenzyme im Organismus durch die «stärksten» Ionen dieser Reihe, insbesondere durch Cu^{2+} , das Problem formuliert, ob sich Alternerscheinungen mit einer zunehmenden Besetzung von Chelatgruppen durch diese die beständig-

sten Komplexe bildenden Ionen und mit den nach solchen Austauschreaktionen besonders für die Fermentaktivität zu erwartenden Störungen in Zusammenhang bringen lassen.

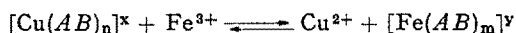
Die kürzlich am Hämatologenkongress in Freiburg von RECHENBERGER³ mitgeteilte Beobachtung:

«Im Laufe des Lebens nimmt der Depoteisengehalt in den Depotorganen chemisch und histochemisch signifikant zu und erreicht in den höchsten Altersklassen bei beiden Geschlechtern sein Maximum»

veranlasst uns, über Untersuchungen zu berichten, die wir – da die angegebene «Irving-Williams-Reihe» nur die M^{2+} berücksichtigt – unternommen haben, um uns über die Konkurrenzierung von Fe^{3+} und Cu^{2+} bei der Besetzung verschiedener Chelatgruppen zu informieren.

Über das Verhältnis der Fe^{3+} - zu den Cu^{2+} -Ionen in bezug auf Stärke der Komplexbildung gegenüber verschiedenen Liganden ist bisher wenig bekannt geworden. Aus Versuchen mit Salizylsäure⁴ und Zitronensäure⁵ geht hervor, dass bei diesen Verbindungen Fe^{3+} stärker gebunden wird als Cu^{2+} . Über eine ähnliche Beobachtung mit Proteinen berichtet KLOTZ⁶.

Wir benutzten bei unseren Untersuchungen ein Austauschgleichgewicht vom Typus:



Die stöchiometrische Zusammensetzung sowohl der Chelatkomplexe als auch der in hydratisierter Form oder in Gegenwart von CH_3COO' als Azetatokomplex vorliegenden Metallionen bleibt ungewiss. Die Lage des angeführten Gleichgewichtes wurde spektrophotometrisch ermittelt unter Verwendung von geeigneten Absorptionsbanden des im System vorliegenden Cu- oder Fe-Komplexes.

Die untersuchten Systeme waren durch 0,5*m* Azetatt-puffer auf pH 4,15 $\pm$ 0,05 eingestellt und enthielten Cu^{2+} , Fe^{3+} und auch den Komplexbildner in einer Konzentration von 10^{-3} – 10^{-4} .

Es zeigte sich in unseren Versuchen, dass Glutaminsäure, Histidin und Histidyl-Histidin Cu^{2+} stärker binden als Fe^{3+} , während durch Weinsäure, *o*-Methoxyphenol, *o*-Aminophenol und Natrium-Pyrophosphat Fe^{3+} stärker als Cu^{2+} gebunden werden, das heisst, es wird entsprechend diesen Angaben durch das eine Ion das Gegenion aus dem vorgelegten Komplex verdrängt.

Diese Ergebnisse zeigen bereits, dass in bezug auf die Stabilität der Fe^{3+} - und Cu^{2+} -Komplexe eine Strukturspezifität für die verschiedenen Chelatverbindungen anzunehmen ist. Entsprechendes wird auch für die Fermentchelat gelten, so dass sowohl Cu^{2+} als aber auch Fe^{3+} die weniger stark gebundenen Metallionen verdrängen können. In welcher Weise und in welchem Umfang die Organismen dieser Gefährdung der Metallfermente begegnen können, ist zu untersuchen. Zu berücksichtigen ist, dass die Unterschiede in den Beständigkeitskonstanten der mit verschiedenen Verbindungen und mit verschiedenen Ionen aufgebauten Chelate nicht, wie man nach der Irving-Williams-Reihe vermuten

³ J. RECHENBERGER, *Europäischer Hämatologen-Kongress 1955*, Autorreferate, S. 42.

⁴ A. K. BABKO, *Zavodskaya Lab.* 13, 645 (1947); ref. in Chem. Abstr. 43, 3306h.

⁵ R. C. WARNER und I. WEBER, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 5086 (1953).

⁶ I. KLOTZ, *A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action* (Baltimore 1954) S. 266.

¹ S. FALLAB, *Schweiz. med. Wschr.* 85, 687 (1955).

² H. IRVING und R. J. P. WILLIAMS, *J. chem. Soc.* 1953, 3192. – Siehe auch: P. G. LÄUGER, S. FALLAB und H. ERLENMEYER, *Helv. chim. Acta* 37, 1050 (1954); 38, 92 (1955). – W. REGENASS, S. FALLAB und H. ERLENMEYER, *Helv. chim. Acta* 38, 1448 (1955).