

R	R'	VI			VII		
		Melting point		$\lambda_{max} \mu$	Melting point		$\lambda_{max} \mu$
H	H	223–224	A, C	6.12	231–232*	D, E, F	5.98
H	OMe	214.5–215.5	A		230–231	D, F	
H	OH	330 (dec.)	B		255–256	E, F	
OMe	H	232–232.5	A, C	6.11	196–197*	D, F	6.06
OMe	OMe	214–215	A		213–214*	D	
OMe	OH	287–288	A				
OH	H		B		277–278*	E	6.11
OH	OH		B		340 (dec.)	E	

Melting points are uncorrected, °C.

\* Known compounds.

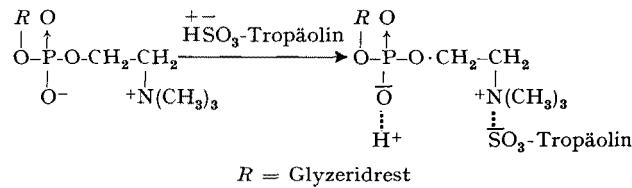
#### Method of preparation:

- A I +  $\text{AlCl}_3$ ;
- B I + Py · HCl;
- C methyl o-methoxybenzoate + phenylacetonitrile;

- D A + hydrolysis;
- E B + hydrolysis;
- F II +  $\text{AlCl}_3$ .

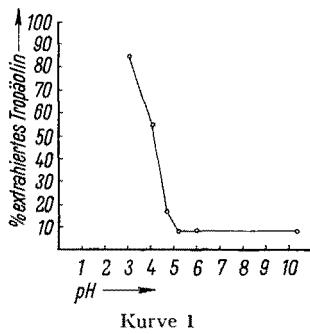
#### Zusammenfassung

Die Einwirkung von Pyridin-Hydrochlorid auf o-Methoxybenzoylbenzylcyanid (I) liefert über entsprechende 2-Imide (IV) die entmethylierten 4-Hydroxy-3-phenylcumarinderivate, denen auf Grund der IR.-Spektren Isoflavonstruktur (VII) zuzuordnen ist.



#### Biophysikalische Studien mit synthetischem Lezithin

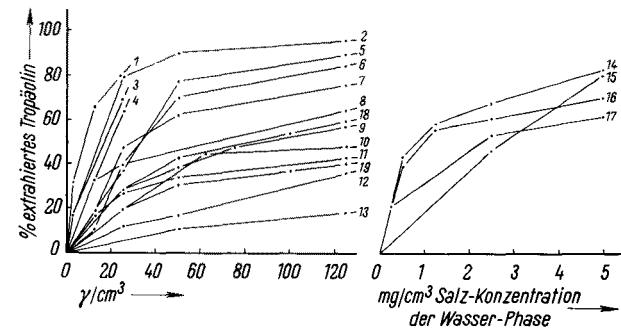
Wenn man die Lösung des Methylsulfats einer hochalkylierten quaternären Ammoniumbase<sup>1</sup> in Chloroform mit einer wässrigen Lösung des Natriumsalzes eines sauren Farbstoffes<sup>2</sup> in molaren Mengen einige Zeit schüttelt und zentrifugiert, so bemerkt man, dass der Farbstoff völlig aus der wässrigen in die lipoide Phase übergetreten ist. Das Anion, in unserem Falle also Methylsulfat-Ion und das Farbstoff-Anion, vertauschen also offenbar die Phase. Dieser Effekt ist weitgehend unabhängig vom pH der wässrigen Lösung.



Kurve 1

Ersetzt man die quaternäre Base durch Lezithin, so tritt bei einem pH über 5 kein Farbstoff in die lipoide Phase über, während von pH 5 an abwärts dies in zunehmendem Masse der Fall ist. Das heisst Lezithin verhält sich in lipoider Phase bei saurem pH wie eine hochmolekulare quaternäre Ammoniumbase ohne saure Gruppe. Der Farbstoff wird als Säure-Anion und Proton nach folgendem Schema an das Lezithin angelagert:

Die Titration eines «Lezithins» mit kleiner Alkylgruppe (damit die Substanz wasserlöslich wird), wie Phenäthylphosphorsäure-cholinester in Wasser, zeigt zwischen pH 2 und 5 keine Spur eines Säureverbrauches, das heisst die Zwitter-Ion-Struktur bleibt erhalten. Es ist also die Löslichkeit in lipoider Phase, die das Lezithin zur Addition von Tropäolin-Säure befähigt.



Kurve 2

Die Kationen wurden als neutrale Chloride resp. Hydrochloride verwendet.

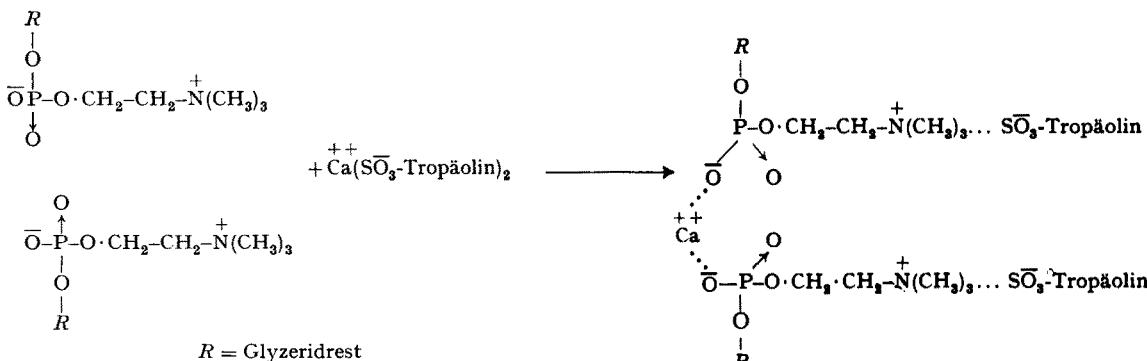
1 Kupfer; 2 Calcium; 3 Magnesium; 4 Barium; 5 Äthylen-bis-2-aminoimidazolin; 6 Cyklohexenyl-1,3-bis-guanidin; 7 Äthylen-1,2-diamidin; 8 Äthyldiamin; 9 Propylamin; 10 Putrescin; 11 Histamin; 12 Butylamin; 13 Methyl-guanidin; 14 Natrium; 15 Hydrazin; 16 Kalium; 17 Äthylamin; 18 Benzamidin; 19 Hexamethonium-bromid.

Es hat sich weiter gezeigt, dass nicht nur Protonen und Farbstoff-Anionen, sondern auch andere Kationen, wie Natrium, Kalium und in ganz besonderem Masse Kupfer, Kalzium und Barium aus neutraler wässriger Lösung zusammen mit Farbstoff in die lipoide Phase aufgenommen werden, sofern das Ionenprodukt Kation-Farbstoffanion eine gewisse Größe erreicht. Zugabe von Komplexon hebt die Wirkung der Erdalkalimetall-Ionen auf.

Wie aus den Kurven ersichtlich, sind neben den zweifach positiv geladenen anorganischen Kationen Kalzium-

<sup>1</sup> Wir verwendeten als quaternäre Base das dem Lezithin ähnliche  $\alpha$ - $\beta$ -Dipalmitoyl-glycerin- $\gamma$ -cholinäther-methylsulfat.

<sup>2</sup> Als Farbstoff gelangte Tropäolin 00 Natriumsalz (9% NaCl) zur Anwendung. Dieser Farbstoff ist an sich vollkommen unlöslich in Chloroform.



Barium usw. auch Amine wirksam, sofern sie die folgenden Bedingungen erfüllen:

Sie müssen mindestens 2 stark basische N-Atome besitzen, die bei neutralem pH je ein Proton addieren. Speziell bis-Imidazoline sind stark wirksam, während die entsprechenden Monoimidazoline nur sehr schwache Wirkung zeigen. Monoamine mit kleiner Alkylgruppe sind ebenfalls nur schwach wirksam. Die Wirkung der Monoamine steigt an mit zunehmender Länge der Alkylgruppen. Höhere Amine als Butylamin können wir an unserer Anordnung nicht prüfen, da dann bereits auch ohne Lezithin ein Übertritt des Farbstoffes in die Chloroformphase beginnt, was die Resultate unklar macht. Dass einfache Amine mit grösserer Alkylgruppe auch wirksam werden, dürfte mit der Löslichkeit und Anreicherung ihrer Salze in Chloroform zusammenhängen.

Neben der einfachen Anlagerung im Sinne Proton-Säure-Anion tritt offenbar eine Verknüpfung zweier Lezithin-Moleküle durch das zweiwertige Kation ein.

Die Bedingungen, die für eine Adsorption an Lezithin notwendig sind, sind ähnlich den Anforderungen, die an sogenannte «Histamine releaser»<sup>3</sup> gestellt werden. Tatsächlich wird Histamin bei Gegenwart von Tropolin aus neutraler wässriger Lösung an die lipoide Phase fixiert und dürfte durch Stoffe mit grösserer Affinität wieder daraus verdrängt werden.

*Experimentelles.* Zur Verwendung gelangte eine  $1/_{1000}$  molare Lösung von synthetischem DL-Dipalmitoyl- $\alpha$ -lezithin (73 mg%) in gewöhnlichem Chloroform. Dieses darf beim Schütteln mit Wasser keine Säure abgeben. Zur Anwendung gelangte ferner eine Lösung von 1 mg% gereinigtem Tropolin 00 in destilliertem Wasser. Von der zu prüfenden Substanz wird darin eine Stammlösung hergestellt und durch eine Spur verdünnter Natronlauge resp. Salzsäure auf pH 6–7 eingestellt.

Je 4 cm<sup>3</sup> der Lezithin-Chloroformlösung und 4 cm<sup>3</sup> der mit Tropolin-Lösung verdünnten Stammlösung werden in einem Reagenzglas 2–3 min kräftig durchgeschüttelt. Das Gleichgewicht stellt sich rasch ein. Nun wird zentrifugiert, bis sich mindestens 2 cm<sup>3</sup> klare wässrige Lösung abgetrennt haben. Diese wird vorsichtig abgezogen, nach Kontrolle des pH mit Salzsäure verdünnt auf 10 cm<sup>3</sup> und der noch vorhandene Farbstoff spektrophotometrisch in 1 n Salzsäure durch Vergleich der Extinktionen bei 535, 540 und 545 m $\mu$  mit denen einer bekannten Farbstofflösung bestimmt.

Zu erwähnen ist, dass die Absorption aus der wässrigen Phase ausbleibt, wenn an Stelle des Chloroforms Tetrachlorkohlenstoff verwendet wird. Wir nehmen an, dass die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels eine wesentliche Rolle spielt.

<sup>3</sup> W. D. M. PATON, Histamine release by Compounds of simple chemical structure, Pharmacol. Rev. 9, 269 (1957).

Die spektrophotometrischen Bestimmungen, für die wir herzlich danken, wurden in unserem physikalisch-chemischen Laboratorium (Leitung Dr. A. V. WILLI) durch Herrn A. SOPRANETTI ausgeführt.

R. HIRT und R. BECHTOLD

Forschungsinstitut der Dr. A. WANDER AG., Bern,  
11. August 1958.

#### Summary

Synthetic lecithin, dissolved in chloroform, is able to add salts which are non-soluble in chloroform and to transfer these at neutral pH from the aqueous into the lipoid phase. The effect is dependent on the cation concentrations and particularly on their valency. Calcium, barium, copper ions, etc., are about one hundred times more effective than sodium and potassium. Two-basic amines are also very effective. For experimental reasons, anion was, up to now, not varied and in all tests tropoline was used.

#### A Contribution to the Problem of the Haem-Protein Linkage in Haemoglobin

Opinions differ as to whether the haem group in haemoglobin is bound to two or to only one imidazole in the protein. The former opinion was expressed by CONANT<sup>1</sup> and, among others, by LEMBERG and LEGGE<sup>2</sup> in their monograph on hematin compounds; the latter opinion (of HAUROWITZ<sup>3</sup>, with his hypothesis that haemoglobin is an aquo-compound, in which one water molecule is bound coordinately to the iron atom) is supported by experimental evidence, as well as by the results of the differential titration of haemoglobin (WYMAN<sup>4</sup>).

We made a series of experiments in which we followed the effect of histidine on the oxygen equilibrium in a dilute haemoglobin solution.

The haemoglobin solutions were prepared from fresh human blood according to HILL and WOLVEKAMP<sup>5</sup>. We used a phosphate buffer (1/15 M, pH 7.39). Histidine in various concentrations was added to these solutions. The degree of oxygenation at different oxygen pressures was determined with the aid of a two-stage colorimeter com-

<sup>1</sup> J. B. CONANT, Harvey Lectures 28, 159 (1933).

<sup>2</sup> R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments* (Interscience Publishers, New York-London 1949).

<sup>3</sup> F. HAUROWITZ, *The Bond between Haem and Globin, Haemoglobin*, a symposium (Ed. F. J. W. Roughton and J. C. Kendrew, Butterworths Scientific Publications, 1949), p. 51.

<sup>4</sup> J. WYMAN, *Heme Proteins*, Adv. Protein Chem. 4, 402 (1948).

<sup>5</sup> R. HILL and H. P. WOLVEKAMP, Proc. Roy. Soc., London [B] 120, 484 (1936).