

ring protons at 7.66 ppm (symm. multiplet A_2B_2 type, 4H), 3 methyl groups which were overlapped by 3 triplet signals at 0.92–0.95 ppm ($J = 6.0$ Hz, 9H) and doublet at 4.25 ppm ($J = 5.0$ Hz, 2H) assigned $-\text{CO}_2\text{CH}_2-\text{CH}-$ group and triplet at 4.13 ppm ($J = 6.2$ Hz, 2H) assigned $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ group. From above spectral evidences, it is concluded that the constituent is a phthalate esterified with C_4 and C_6 alcohols, each of which is branched on the 2-position. The alkaline hydrolysis of this unsymmetrical phthalate ester gave phthalic acid, *n*-butyl and 2-ethylbutyl alcohol. Therefore, this constituent is *n*-butyl-2-ethylbutyl phthalate. The IR- and NMR-spectra and gas chromatographic retention time (GLC-Rt) of this ester were completely identical with those of the authentic specimen.

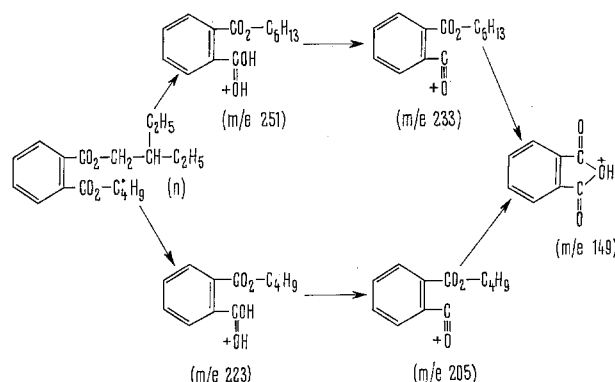
di-2-Ethylbutyl phthalate. The component showed the very similar IR- and UV-spectra to those of the above *n*-butyl-2-ethylbutyl phthalate. Its mass spectrum indicated the parent ion at 334 and characteristic fragment ions at m/e 85 ($\text{C}_6\text{H}_{13}^+$), 149 (base peak), 233 and 251. The NMR-spectrum showed symm. multiplet at 7.65 ppm (4H, *ortho* substituted benzene ring protons), symm. doublet at 4.28 ppm ($J = 5.0$ Hz, 4H) assigned $(-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-)_2$ and triplet at 0.95 ppm ($J = 6.5$ Hz, 12H) assigned $(\text{CH}_3-\text{CH}_2-)_4$. On the basis of the above evidences, the component can be applied for di-2-ethylbutyl

phthalate. The IR, NMR and GLC-Rt of the component coincided with the authentic specimen.

di-Ethyl phthalate. The constituent also showed characteristic IR- and UV-spectra attributable to di-alkyl phthalates and mass spectrum having strong fragment ions at m/e 29 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2^+$), 149 (base peak) and 177. The NMR-spectrum indicated symm. multiplet at 7.63 ppm, quartet at 4.17 ppm ($J = 8.0$ Hz, 4H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) and triplet at 1.32 ppm ($J = 8.0$ Hz, 6H, CH_3-CH_2-). The above spectral evidence can also be applied to di-ethyl phthalate. This assigned structure was further confirmed by the comparison of the IR- and NMR-spectra and GLC-Rt of the authentic sample.

It is known that phthalate esters are widely employed as plasticizer in formulation of plastic tubing and poly bucket. Extreme care was taken to avoid the use of these materials. For this reason, it seems likely that these esters are original components of *Oenanthe stolonifera* DC. There is a small possibility, however, that the phthalate esters are artefacts, although the above 3 phthalate esters have not been found in the benzene solvent, silica gel and filter paper etc. used in our laboratory.

In addition to phthalate esters, *n*-paraffins (*n*- C_{16} to *n*- C_{24}), α -pinene, β -pinene, β -myrcene, limonene, terpinolene, *p*-cymene, δ -guaiene, linalool, *p*-cymene-8-ol, γ -phenylpropanol, elemol, benzyl alcohol, thymolmethyl-ether, elemicin, methyl myristate, methyl palmitate, methyl stearate, methyl oleate, palmitic acid, stearic acid, benzoic acid, phenylacetic acid, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol were identified.



Zusammenfassung. Aus dem Extrakt von *Oenanthe stolonifera* DC. (Umbelliferae) wurden *n*-Butyl-2-äthylbutyl-phthalat, di-2-Äthylbutyl-phthalat und di-Äthylphthalat isoliert und deren Struktur durch chemischen Abbau und mit Hilfe physikalischer Methoden aufgeklärt.

Y. ASAKAWA, S. HAYASHI
and T. MATSUURA

Department of Chemistry, Faculty of Science,
Hiroshima University, Hiroshima (Japan), 27 May 1969.

Heterozyklische Equileninanaloge

Östronanaloge, bei denen der aromatische Ring durch einen 5- oder 6gliedrigen Heterozyklus ersetzt ist, sind schon verschiedentlich beschrieben worden¹⁻⁴. Wir berichten im folgenden über neue heterozyklische Derivate des Equilenins (I–III), die uns als potentielle Östrogene interessierten.

Die Synthese dieser Präparate erfolgte ausgehend vom bekannten $(\pm)$ -trans-2, 3, 3a, 4, 5, 9b-Hexahydro-7-hydroxy-3a-methyl-1H-benz[e]inden-3-on (IV)^{5, 6}.

Zum Aufbau⁷ des Furanderivates I unterwarfen wir den aus IV und Allylbromid erhältlichen Allyläther V (Smp. 65–67°) in *N,N*-Dimethylanilin bei 200° einer Claisen-Umlagerung. Die Ausbeute an phenolischen Produkten betrug rund 50%; nicht umgesetztes Ausgangsmaterial wurde isoliert und erneut zur Reaktion gebracht. Die aus mehreren Ansätzen gesammelten Umlagerungsprodukte bildeten ein nicht trennbares Gemisch, das sich aus $2/3$ 6-Allylderivat VI und $1/3$ isomerer 8-Allylverbin-

dung zusammensetzte (NMR-Interpretationen). Das Isomerenmisch wurde zunächst mit NaBH_4 reduziert und

¹ E. CASPI und D. M. PIATAK, *Experientia* 19, 465 (1963); *Chem. Ind.* 1963, 1495; *J. org. Chem.* 31, 4255 (1966).

² L. R. MORGAN, *Chem. Ind.* 1963, 293.

³ A. G. M. WILLEMS, R. RITSEMA v. ECK, U. K. PANDIT und H. O. HUISMAN, *Tetrahedron Lett.* 1966, 81; M. A. T. SLUYETER, U. K. PANDIT, W. N. SPECKAMP und H. O. HUISMAN, *Tetrahedron Lett.* 1966, 87.

⁴ G. LEHMANN, *Tetrahedron Lett.* 1967, 123; *Chem. Ber.* 101, 787 (1968).

⁵ D. K. BANERJEE, S. CHATTERJEE, C. N. PILLAI und M. V. BHATT, *J. Am. chem. Soc.* 78, 3769 (1956).

⁶ W. E. BACHMANN und D. G. THOMAS, *J. Am. chem. Soc.* 64, 94 (1942).

⁷ K. D. KAUFMANN, *J. org. Chem.* 26, 117 (1961).

dann azetyliert. Die anfallenden Diazetate (VII + entsprechendes 8-Allyl-Isomeres) konnten durch Bromierung und Verkochen mit alkoholischer KOH in ein Gemisch zyklisierter Stoffe übergeführt werden, aus dem sich I durch Chromatographie leicht isolieren liess (Ausbeute ca. 35% der Th. bezogen auf V). Reines ($\pm$)-2-Methyl-3-oxa-A-nor-östra-1,5(10),6,8-tetraen-17 β -ol (I)⁸, $C_{17}H_{20}O_2$ ⁹, schmilzt bei 154–158°. NMR ($CDCl_3$)¹⁰: 7,20 (1 H, d, $J = 8$ Hz) und 6,82 (1 H, d, $J = 8$ Hz) arom. H; 6,29 (1 H, s) H im Furanring; 3,90 (1 H, m) 17 α -H; 2,48 (3 H, s) CH_3 -Gruppe im Furanring; 0,69 (3 H, s) Methylgruppe an C-18.

Zur Synthese der Equileninanalogue II und III sowie des «Anthrasteroids» XII wurde das Benzinden IV zunächst in Eisessig bei 20° mit 65% HNO_3 (ca. 0,9 Mol) nitriert. Dabei bildeten sich ca. 30% 6-Nitroderivat VIII vom Smp. 218–219°, ca. 50% 8-Nitroverbindung X vom Smp. 185–186° und geringe Anteile 6,8-Dinitrokörper (Smp. 223–229°). Die Lage der Nitrogruppe in den beiden isomeren Hauptprodukten konnte aus den NMR-Spektren durch die beobachteten Kopplungen der aromatischen Protonen ermittelt werden: X zeigte in $CDCl_3$ keine bzw. nur schwache Aufspaltung der Signale bei 7,01 (1 H, s) und 7,86 (1 H, d, $J \sim 1$ Hz), während VIII Dubletten bei 7,02 (1 H) und 7,31 (1 H) mit J -Werten von je 8 Hz aufwies (*o*-Kopplung). Umsatz von VIII bzw. X zunächst mit $NaBH_4$ zur Reduktion der Ketofunktion, dann mit Raney-Nickel und Hydrazin lieferte die entsprechenden Aminophenole IX und XI. Das Präparat IX besitzt den Smp. 255–261° (Zers.). NMR (DMSO): 6,10 (1 H, d,

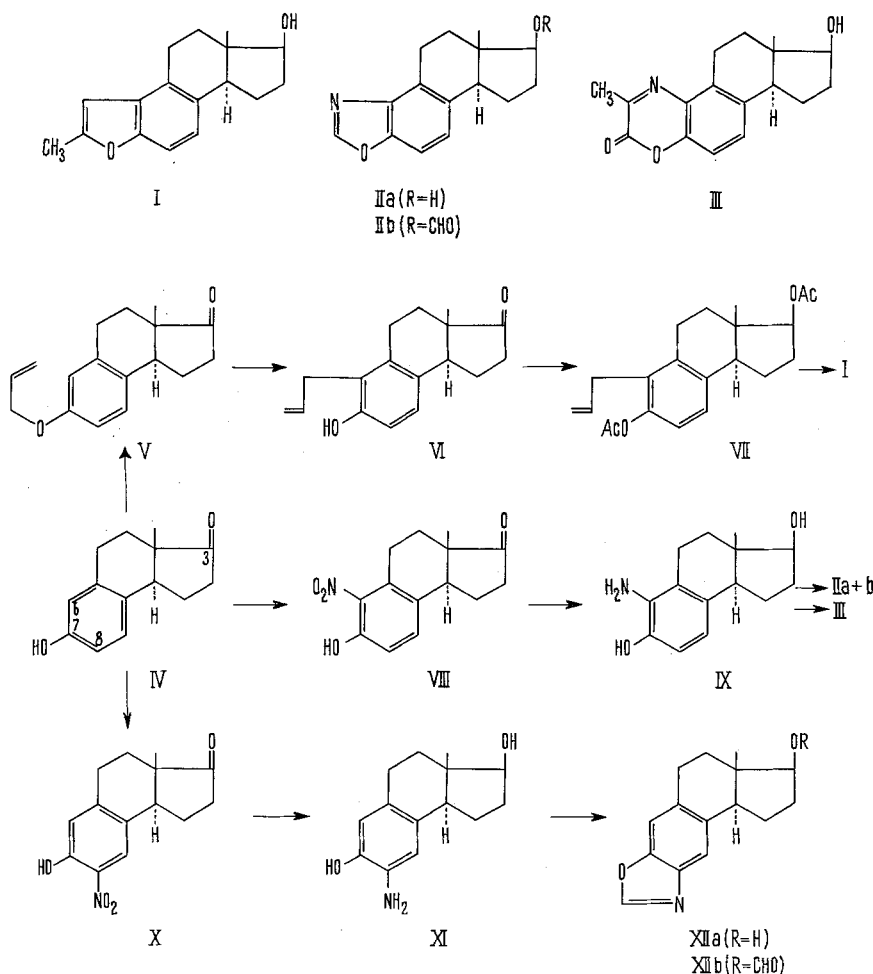
$J = 8$ Hz) und 6,51 (1 H, d, $J = 8$ Hz); XI schmilzt unter Zersetzung bei 217–225°. NMR (DMSO): Singulette der aromatischen Protonen bei 6,25 (1 H) und 6,42 (1 H). Ringschlussreaktionen wurden zunächst mit dem 6-Aminophenol IX ausgeführt: Kondensation von IX mit *Ortho*ameisensäure-triäthylester¹¹ ergab nebeneinander die Oxazolverbindung IIa (Ausbeute: 54%) und das entsprechende Formiat IIb (Ausbeute: 42%). Beide Stoffe lassen sich leicht durch Chromatographie trennen. ($\pm$)-1-Aza-3-oxa-A-nor-östra-1,5(10),6,8-tetraen-17 β -ol (IIa), $C_{16}H_{17}NO_2$, schmilzt bei 125–128°. NMR ($CDCl_3$): 8,09 (1 H, s) H im Oxazolring; 7,41 (1 H, d, $J = 8$ Hz) und 7,05 (1 H, d, $J = 8$ Hz) arom. Protonen; 4,00 (1 H, m) H an 17 α ; 0,69 (3 H, s) CH_3 -Gruppe. Der 17 β -Formylester IIb besitzt den Smp. 157–159°. NMR ($CDCl_3$):

⁸ Für die Verbindungen I–III wurde die Steroidnomenklatur benutzt.

⁹ Die Bruttoformeln sind durch Mikroanalysen belegt.

¹⁰ Die NMR-Spektren wurden auf einem Varian-Spektrographen, Mod. A-60, bei 60 MHz aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben. Als interner Standard diente Tetramethylsilan mit $\delta_{TMS} = 0$ ppm. Kopplungskonstanten sind mit J bezeichnet und in Hz angegeben. s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett.

¹¹ G. L. JENKINS, A. M. KNEVER und C. S. DAVIS, J. org. Chem. 26, 274 (1961). – W. RIED, W. STORBECK und E. SCHMIDT, Archiv Pharmazie 295, 143 (1962).



8,20 (1 H, d, $J \sim 1$ Hz) H der Formylgruppe; 8,09 (1 H, s) H im Oxazolring; 7,42 (1 H, d, $J = 8$ Hz) und 7,08 (1 H, d, $J = 8$ Hz) arom. Protonen.

Mit Brenztraubensäure-methylester¹² reagierte IX zum 6gliedrigen Oxazin-analogen III; ($\pm$)-2-Methyl-3-oxo-1-aza-4-oxaöstra-1,5(10),6,8-tetraen-17 β -ol, $C_{17}H_{19}NO_3$, besitzt den Smp. 156–157°. NMR ($CDCl_3$): 7,09 (2 H, s) arom. H; 3,92 (1 H, m) H an 17 α ; 2,52 (3 H, s) CH_3 -Gruppe im Oxazinring; 0,62 (3 H, s) CH_3 -Gruppe an C-18.

Anellierungsreaktionen mit dem 8-Aminophenol XI führten zu Anthrasteroidderivaten. So resultierten zum Beispiel aus XI und Orthoameisensäure-triäthylester das Benzoxazol XIIa und das entsprechende 17 β -Formiat XIIb. ($\pm$)-2,3,3a,4,5,10b-Hexahydro-3 β -hydroxy-3a-methyl-trans-1H-indeno-[4,5-f]benzoxazol (XIIa).

$C_{15}H_{17}NO_2$, schmilzt bei 115–117°. NMR ($CDCl_3$): 8,04 (1 H, s) H im Oxazolring; 7,47 (1 H, s) und 7,38 (1 H, s) arom. Protonen; 3,98 (1 H, m) H an 3 α ; 0,62 (3 H, s) CH_3 -Gruppe. Der entsprechende Formylester XIIb zeigte Smp. 158–165°. NMR ($CDCl_3$): 8,16 (1 H, s) H der Formylgruppe; 8,03 (1 H, s) H im Oxazolring; 7,46 (1 H, s) und 7,38 (1 H, s) arom. Protonen.

Biologische Wirkung. Die neuen Equileninanaloga I–III sowie einige ihrer Derivate zeigten in der pharmakologischen Untersuchung keine oder nur unbedeutende östrogene Aktivität¹³.

Summary. The synthesis of heterocyclic equilenin-analogues is described. The new compounds are devoid of any significant estrogenic activity.

K. HUBER und A. VON WARTBURG

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien,
Sandoz AG, Basel (Schweiz), 6. Mai 1969.

¹² W. WISLICHENUS und F. SCHULTZ, *Annln Chem.* 436, 55 (1924).

¹³ Die biologische Prüfung der Präparate erfolgte durch Herrn Prof. Dr. E. FLÜCKIGER in unserer medizinisch-biologischen Forschungsabteilung (Leitung: PD Dr. A. CERLETTI).

Distribution of Proteins in the Extracellular Space of Muscles and the Possible Role of Mucopolysaccharides

It has been difficult to estimate the volume of the extracellular space of muscle because the uptake of various solutes which are generally assumed not to penetrate into the fibers varies widely. It is desirable, therefore, to study the problem by a more direct approach. Information on this question is important also to solve an apparent paradox. It is generally accepted that the ground substance between tissue cells contains mucopolysaccharides. As shown by OGSTEN and PHELPS¹ these substances exclude sterically large molecules such as proteins and inulin in concentrations as low as 0.2%, but it is also known that proteins, even molecules as large as those of ferritin, readily diffuse into the extracellular space. To study these problems muscles were equilibrated with concentrated solutions of proteins and their distribution was determined with the electronmicroscope.

Most of the work was done with the stomach of the frog, but the same results were obtained with the sartorius and ventricle of the frog and with the taenia coli of the guinea-pig. The muscles were immersed in Ringer solution containing about 20% hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb) or ferritin for 45–120 min. In solutions of Hb and Mb normal spontaneous contractions of stomach muscle continued for more than 2 h, demonstrating that muscles were not injured. Ferritin solutions were prepared as described by HUXLEY². The muscles were fixed in a stretched condition in glutaraldehyde and osmium tetroxide and embedded in Dow epoxy. Thin sections were stained in uranylacetate and lead citrate and examined with a Hitachi electronmicroscope.

That proteins penetrate into muscles is shown by the fact that after immersion in solutions of Hb or Mb most of the extracellular space appeared uniformly darker than the fibers in stained sections. However, in all types of muscles studied long filaments of uniform diameter remained unstained (Figures 1, 2 and 3), probably be-

cause they contain mucopolysaccharides and, therefore, exclude proteins. They will be called mucofilaments. They differ from other known structures of the extracellular space, specifically from collagen fibrils, by their appearance, size and distribution as shown by the following description.

(1) Collagen fibrils take up stain and have sharp outlines, while mucofilaments remain unstained and appear fuzzy. (2) The diameter of the filaments is about 500 Å if shadowed with Hb (single measurements varying between 450 and 600 Å) and 300 Å (with a range of 250 and 350 Å) when Mb is used. The difference between Hb and Mb evidently is due to partial penetration of Mb into the filaments. Collagen fibers of the frog stomach, on the other hand, generally have a diameter of about 220 Å, never more than 300 Å, confirming a previous report³. (3) In frog stomach muscle collagen fibrils are mainly present near the surface and near blood vessels, while mucofilaments are found throughout the extracellular space, except in regions less than 1000 Å wide. Due to their staining, collagen fibrils generally cannot be seen in Hb and Mb treated muscles, but in underdeveloped micrographs both structures can sometimes be seen side by side (Figure 2).

If the filaments consist mainly of mucopolysaccharides it must be assumed that these substances are arranged in a highly oriented form. That they are normally in this

¹ A. G. OGSTEN and C. F. PHELPS, *Biochem. J.* 78, 827 (1960).

² H. E. HUXLEY, *Nature* 202, 1067 (1964).

³ H. GANSLER, *Z. Zellforschung* 52, 60 (1960).