

Bildung eines ascorbigenähnlichen Produktes aus *p*-Hydroxybenzylalkohol und L-Ascorbinsäure

Bei der Zerkleinerung von Kohlpflanzen wird Glucobrassicin enzymatisch und hydrolytisch zu 3-Hydroxymethylindol, Bisulfat und Glucose abgebaut. Die Reaktion des 3-Hydroxymethylindols mit L-Ascorbinsäure führt zur Entstehung der epimeren Ascorbigene A und B, über deren Konstitution und Bildungsmechanismus kürzlich berichtet wurde¹.

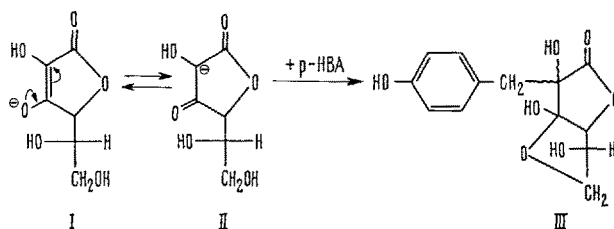
Ein weiterer reaktionsfähiger Alkohol, der *p*-Hydroxybenzylalkohol (*p*-HBA), entsteht auf ähnliche Weise aus Sinalbin, dem Senfölglycosid des weissen Senfs (*Sinapis alba* L.) durch Hydrolyse des primär gebildeten, instabilen *p*-Hydroxybenzylisothiocyanates². Es konnte nun gezeigt werden, dass auch *p*-HBA mit L-Ascorbinsäure reagiert, wobei wiederum 2 epimere Kondensationsprodukte entstehen³.

Die Umsetzung von *p*-HBA mit einem dreifachen Überschuss an L-Ascorbinsäure erfolgt in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur. Nach 72 h Reaktionszeit konnte das Hauptprodukt durch Ausschütteln mit Äthylacetat in kristalliner Form in einer Ausbeute von 32% gewonnen werden.

Die erhaltene Verbindung ist gut löslich in Wasser, Alkohol und Äthylacetat, unlöslich in Benzol. Smp. 182° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = +6^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol). Die Elementaranalyse ist in Übereinstimmung mit der Summenformel $C_{13}H_{14}O_7$, ebenso das Molekulargewicht (thermoelektrische MG-Best.): 283 ber. 282,2). IR-Spektrum (KBr): Banden bei 3480, 3430, 1758, 1520, 1225, 1110, 1025 und 835 cm^{-1} . UV-Spektrum (Äthanol): λ_{max} 277–278 nm ($\log \epsilon = 3,2$), λ_{min} 250 ($\log \epsilon = 2,6$).

Die Verbindung gibt positive Phenolreaktionen, reduziert Triphenyltetrazoliumchlorid (nicht aber Dichlorphenolindophenol) und wird in methanolischer Salzsäure in das Methylglykosid übergeführt. 0,1*n* Salzsäure bewirkt, im Gegensatz zu Ascorbigen A, keine Freisetzung von L-Ascorbinsäure.

Alle Daten für das isolierte Produkt weisen übereinstimmend auf Struktur III, die der Ascorbigenstruktur analog ist. Die Verbindung kann daher als ein 2-C-(*p*-Hydroxybenzyl)-3-keto-hexulosonsäurelacton (als Halbketal vorliegend) bezeichnet werden. Ihre Bildung kann gleich wie die Reaktion von Benzylchlorid⁴ und 3-Hydroxymethylindol¹ mit Ascorbinsäure formuliert werden: das Ascorbation II wird demnach am C-2 mit *p*-HBA benzyliert:



Die Konfiguration von III am C-2 ist noch nicht gesichert. Das Epimere von III konnte dünnsschichtchromatographisch nachgewiesen werden, wurde jedoch wegen der äusserst niedrigen Ausbeute nicht isoliert.

Die Bildung von III in *Sinapis alba* ist wegen der Abwesenheit von L-Ascorbinsäure in den Samen des weissen Senfs zweifelhaft. Andererseits kann man den *p*-HBA als Modellschubstanz für die sehr reaktionsfähigen und in der Natur verbreiteten Polyhydroxy-flavan-(3,4)diole (Leucoanthocyanidine, Proanthocyanidine) auffassen, die ebenfalls eine Benzylalkoholgruppierung enthalten und mit L-Ascorbinsäure ähnlich reagieren könnten. Vorläufige dünnsschichtchromatographische Untersuchungen der Reaktion zwischen Leukocyanidin und L-Ascorbinsäure scheinen diese Vermutung zu bestätigen.

Summary. L-Ascorbic acid reacts with *p*-hydroxybenzyl alcohol in a similar way as with 3-hydroxymethyl indole in the formation of ascorbigen (bound ascorbic acid). The crystalline reaction product was identified as a 2-C-(*p*-hydroxybenzyl)-3-keto-hexulosonic acid lactone.

G. KISS und H. NEUKOM

Agrikulturchemisches Institut, Eidg. Technische Hochschule, 8006 Zürich (Schweiz),
19. Dezember 1967.

¹ G. KISS und H. NEUKOM, *Helv. chim. acta* 49, 989 (1966).

² J. BAROTHY, Diss. ETH (1964); J. BAROTHY und H. NEUKOM, *Chemy Ind.* 1965, 308.

³ G. KISS, Diss. ETH (1967).

⁴ K. G. A. JACKSON und J. K. N. JONES, *Can. J. Chem.* 43, 450 (1965).

The Metabolism of Hexamethylphosphoramide and Hexamethylthiophosphoramide¹

Following the initial report of the chemosterilant activity of hexamethylphosphoramide (HMPA, I) in male houseflies², JACKSON and CRAIG have shown that it produces marked antifertility effects when given orally in relatively low doses to male rats³. As the development of effective male antifertility agents in mammals is a new and fundamentally important field⁴, we have studied the fate of HMPA and of its thio-analogue (V) in both the rat and the mouse in case more active metabolites were responsible for the antispermatic activity.

An i.p. injection to rats and mice of ³²P-labelled HMPA (500 mg/kg) resulted in no tissue localization and in the excretion of 87% of the radioactivity in the urine during the first 13 h with an almost quantitative recovery after 50 h. Due to this rapid urinary clearance and the indication in chromatographed urine of 3 radioactive areas by

autoradiography, HMPA was administered as a 0.1% solution in the animals' drinking water, the concentrated urine exhaustively extracted with chloroform and the extract chromatographed on Whatman's SG31 'Chromedia'. Elution with chloroform-methanol (9:1) gave 2 metabolites which were purified by thin-layer chromatography on preparative silica gel G plates. These were

¹ This work was supported by grants from the Ford Foundation and the Wellcome Trust.

² S. C. CHANG, P. H. TERRY und A. B. BORKOVEC, *Science* 144, 57 (1964).

³ H. JACKSON und A. W. CRAIG, *Nature* 212, 86 (1966).

⁴ H. JACKSON, *Antifertility Compounds in the Male and Female* (Thomas, Springfield, Illinois 1966).

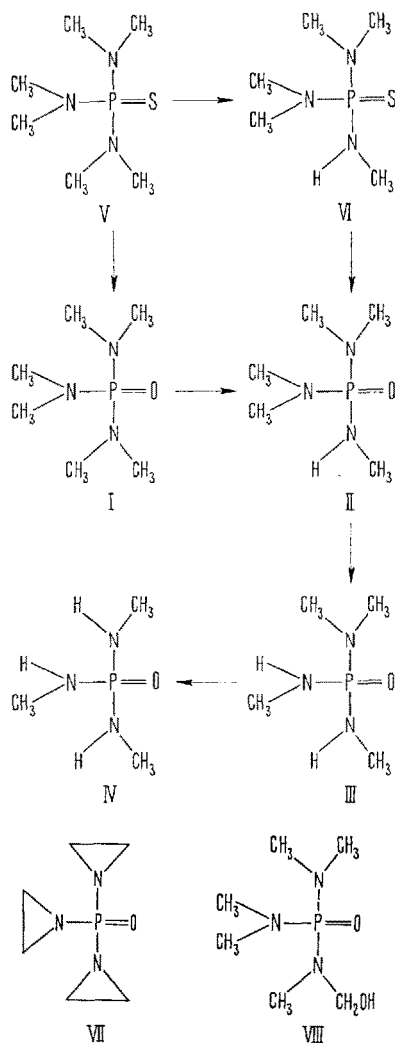
identified as pentamethylphosphoramidate (PMPA, II) and tetramethylphosphoramidate (III), comparison being made by mass spectroscopy and gas chromatography with authentic samples synthesized by the method of ARCE-NEAUX *et al.*⁵ Although it was confirmed that degradation of HMPA to phosphoric acid had not occurred in either species, the isolation of these metabolites contrasts with a previous paper³ in which the compound was reported as being excreted unchanged.

Pentamethylphosphoramidate, the major metabolite, was considerably less toxic than HMPA in both rat and mouse, fertility studies showing that an oral dose, equivalent to a sterilizing dose³ of HMPA, had no comparable antifertility effect. When PMPA was administered to rats and mice as a 0.1% oral solution, a third metabolite was isolated from the extracted urine as well as tetramethylphosphoramidate. This was identified as trimethylphosphoramidate (IV), m.p. 103°C; mixed m.p. with a synthetic sample⁵ 102–103°C. While these investigations were in progress, Dr. A. B. BORKOVEC kindly informed us of his unpublished work⁶ on the metabolism of HMPA in houseflies in which he has established that PMPA is the only metabolite and of its lack of chemosterilant activity in that species.

Aziridinyl-phosphoramides, such as triethylenephosphoramidate (VII), are effective alkylating agents with antispermatic activity though they are rapidly excreted⁷. Their thio-analogues are more effective due to

their increased lipid solubility and initial metabolism, by replacement of sulphur with oxygen, to give the corresponding aziridinyl-phosphoramides^{8,9}. As hexamethylthiophosphoramidate (thio-HMPA, V) was a more toxic and less effective antifertility agent than HMPA, it appeared as though it may not be similarly degraded. Administration of thio-HMPA (0.02% in the drinking water) to rats and mice produced 2 metabolites, isolated from chromatograms of extracted urine and characterized as HMPA and pentamethylthiophosphoramidate (thio-PMPA, VI). Fertility studies were not undertaken with synthetic thio-PMPA as it was a toxic compound metabolized (0.02% oral solution) to inactive pentamethylphosphoramidate.

Consequently the antispermatic activity of HMPA is closely associated with the compound itself and not with any of its isolated metabolites. The alternative metabolic pathway for the degradation of thio-HMPA via the toxic intermediate thio-PMPA is interesting in that it would account for its reduced activity and increased toxicity. As this activity in the phosphoramides, which is restricted at least in insects to hexa-alkyl substituted tri-amides¹⁰, could indicate an alkylating mode of action, experiments are in progress with uniformly labelled ¹⁴C-HMPA in rodents to determine whether pentamethylphosphoramidate results from a direct methylation or is produced from HMPA through some initially unstable metabolite such as the methylol (VIII).



Compound-phosphoramidate	Synthetic Rf	Metabolite Rf
(I) hexamethyl-	0.85	0.84
(II) pentamethyl-	0.73	0.73
(III) tetramethyl-	0.62	0.62
(IV) trimethyl-	0.53	0.52
(V) hexamethylthio-	1.00	—
(VI) pentamethylthio-	0.95	0.94

Rf values for synthetic and isolated urinary metabolites on silica gel G plates activated at 110°C for 3 h immediately before use. Solvent system: chloroform-ethanol (3:1). Detection by HANES and ISHERWOOD phosphate spray¹¹.

Résumé. L'hexaméthylphosphoramidate (I), un agent antispermatic efficace pour rongeurs, est dégradé par une succession de déméthylations (I → II → III → IV) pour inactifs métabolites. Le thio-analogue (V), à moins qu'il soit métabolisé (I), est inactif au cours d'un cheminement alternatif (V → VI → II).

A. R. JONES and J. S. BERTRAM

Unit of Reproductive Pharmacology, University of Manchester, Manchester 13 (England),
16 November 1967.

⁵ R. L. ARCEAUX, J. G. FRICK, E. K. LEONARD and J. D. REID, *J. org. Chem.* 24, 1419 (1959).

⁶ S. C. CHANG, P. H. TERRY, C. W. WOODS and A. B. BORKOVEC, *J. econ. Ent.*, in press.

⁷ A. W. CRAIG and H. JACKSON, *Br. J. Pharmac.* 10, 321 (1955).

⁸ R. K. MALLER and C. HEIDELBERGER, *Cancer Res.* 17, 296 (1957).

⁹ A. W. CRAIG, B. W. FOX and H. JACKSON, *Biochem. Pharmac.* 3, 42 (1959).

¹⁰ A. B. BORKOVEC, *Insect Chemosterilants* (Interscience, New York 1966), p. 36.

¹¹ L. S. HANES and F. A. ISHERWOOD, *Nature* 164, 1107 (1949).