

Asymmetrische Katalyse, 67<sup>[1]</sup>

# Diastereoselektive Hydrierung der Folsäure mit optisch aktiven Rhodium(I)-Diphosphan-Komplexen

Henri Brunner\* und Christian Huber

Institut für Anorganische Chemie der Universität Regensburg,  
Universitätsstraße 31, W-8400 Regensburg, F.R.G.

Eingegangen am 8. Februar 1992

**Key Words:** Diastereoselective hydrogenation / Immobilized enantioselective rhodium(I)-diphosphane catalysts / Folic acid / (6*S,S*)-Folonic acid / 5,6,7,8-Tetrahydrofolic acid, *N*-5-(menthyloxycarbonyl)-

## Asymmetric Catalysis, 67<sup>[1]</sup>. – Diastereoselective Hydrogenation of Folic Acid with Optically Active Rhodium(I)-Diphosphane Complexes

With immobilized rhodium(I)-diphosphane catalysts supported on silica gel, the C=N bonds of the pyrazine ring of folic acid (**1**) are reduced with hydrogen in aqueous solution to give 5,6,7,8-tetrahydrofolic acid. A mixture of the two diastereomers **2a** and **3a** is obtained with (6*S*)- and (6*R*)-configuration, respectively, at the newly formed asymmetric center in the pterine system and (*S*)-configuration in the L-glutamic

acid moiety. The unstable hydrogenation products are derivatized with (–)-menthyl chloroformate. An improved HPLC procedure for the analysis of the products has been developed. By using optically active chelate phosphanes as cocatalysts together with [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>, a diastereomeric excess of up to 24% of the natural isomer **2a** with (6*S,S*)-configuration is attained in the heterogeneous hydrogenation of folic acid.

Folsäure (**1**), ein wasserlösliches Vitamin, ist ein 6-substituiertes Pterin-Derivat. Ihre Tetrahydro-Form spielt eine herausragende Rolle bei der Übertragung von Methylgruppen auf heterocyclische Vorstufen von Nucleinbasen in der DNA-Synthese<sup>[2]</sup>. Die unreduzierte Form der Folate zeigt noch keine biologische Aktivität bei der Übertragung von Einkohlenstofffragmenten. Der eigentliche „Carrier“ für Einkohlenstoffeinheiten ist 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a**). Bei der enzymatischen Reduktion der Folsäure bildet sich zunächst 7,8-Dihydrofolsäure, die vom Enzym Dihydrofolat-Reduktase in die physiologisch wirksame Tetrahydro-Form übergeführt wird<sup>[2–5]</sup>.

Schnell proliferierende Krebszellen benötigen zum Aufbau ihrer DNA in verstärktem Ausmaß Nucleinbasen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der chemotherapeutischen Behandlung verschiedener Krebsarten zunutze. Folat-Antagonisten wie Methotrexat hemmen die Dihydrofolat-Reduktase durch eine pseudo-irreversible Verdrängung der natürlichen Substrate<sup>[6]</sup>. Durch diese Enzym-Inhibierung wird die Versorgung der Zellen mit DNA-Bausteinen unterbrochen<sup>[7–12]</sup>.

Zur Behebung eines bei der Methotrexat-Therapie verursachten akuten Folsäuremangels wird Leucovorin, das Calciumsalz der Folsäure (**2f** bzw. **3f**) appliziert<sup>[8,9,13–16]</sup>. Durch die in N-5-Position formylierte 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure kommt es zu einem Wiedereinsetzen des Folatmetabolismus. Darüber hinaus wird Leucovorin zusammen mit 5-Fluoruracil in Kombinationspräparaten gegen fortgeschrittene Coloncancer eingesetzt. Diese Anwendung spielt mengenmäßig sogar eine größere Rolle als die Anwendung als Antidot gegen hochdosiertes Methotrexat bei Osteosarkomen. Zunehmende klinische Bedeutung hat das Medikament Leucovorin auch bei der Behandlung der megaloblastischen Folsäuremangel-Anämie und der rheumatischen Arthritis sowie bei der Verbesserung der Verträglichkeit mancher Antibiotikapräparate<sup>[17]</sup>.

Bei den zur Zeit im technischen Maßstab nutzbaren Leucovorin-Synthesen<sup>[18]</sup> wird Folsäure mit Hilfe von Platinoxid oder Palla-

dium auf einem Trägermaterial in stark polaren Lösungsmitteln wie Eisessig<sup>[19,20]</sup>, Trifluoressigsäure<sup>[21]</sup> und Ameisensäure<sup>[21]</sup> katalytisch hydriert. Auch eine Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in schwach alkalischer, wäßriger Lösung ist möglich<sup>[22,23]</sup>. Bei der Reduktion der prochiralen C=N-Bindung des Pyrazinrings der Folsäure bildet sich ein neues Asymmetriezentrum an C-6 des Pterinsystems. Da Folsäure die (*S*)-konfigurierte Glutaminsäure enthält, entstehen die zwei Diastereomeren der Tetrahydrofolsäure **2a** bzw. **3a** mit (6*S,S*)- bzw. (6*R,S*)-Konfiguration. Die chirale Information im Glutaminsäure-Molekülteil entfaltet keine nennenswerte optische Induktion, so daß die beiden Diastereomeren im Verhältnis von etwa 1:1 anfallen. Das aus der Tetrahydrofolsäure dargestellte Medikament Leucovorin wird bis heute als 1:1-Gemisch der Diastereomeren **2f** und **3f** eingesetzt<sup>[24–26]</sup>.

Nur das natürlich vorkommende (6*S,S*)-Diastereomere **2f** dient im Zellmetabolismus als Carrier-System für Einkohlenstoffgruppen, wohingegen das (6*R,S*)-Isomere **3f** keinerlei Aktivität aufweist und sogar als Enzym-Inhibitor fungiert<sup>[13,24–29]</sup>. Neuere Arbeiten zeigen, daß die (6*R,S*)-Form langsamer metabolisiert und ausgeschieden wird als die (6*S,S*)-Form. Bei der Applikation eines Gemisches der Diastereomeren **2f** und **3f** kommt es im zentralen Nervensystem zu einer Anreicherung der im Metabolismus gebildeten Tetrahydrofolate **3** mit der unnatürlichen (6*R,S*)-Konfiguration und damit zu einer Intoxikation<sup>[24–26]</sup>.

Im Laufe der letzten dreißig Jahre sind mehrfach Anstrengungen unternommen worden, die beiden Diastereomeren der Verbindungen **2** und **3** zu trennen, zum Beispiel durch präparative Chromatographie von Folsäure **2f** und **3f**<sup>[30,31]</sup>, durch fraktionierte Kristallisation der Erdalkalisalze von **2f** und **3f**<sup>[32–35]</sup> und durch Lösungsmittelextraktion der Tetrahydrofolsäurederivate **2b** und **3b**<sup>[22,23]</sup>. Bei der Reduktion von Folsäure (**1**) im wäßrigen Medium kann mit überstöchiometrischen Mengen optisch aktiver Alkoxyaminoboran-Komplexe eine geringe optische Induktion zugunsten des natürlichen Diastereomeren erzielt werden<sup>[26]</sup>. Während die

Synthese von Leucovorin (**2f** bzw. **3f**) durch eine enzymkatalysierte, diastereoselektive Reduktion der Dihydrofolsäure bis vor kurzem nur in geringen Ausbeuten möglich war<sup>[30,36]</sup>, wurde in jüngster Zeit ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von (6*S*,*S*)-Tetrahydrofolsäure durch Behandeln von Dihydrofolsäure mit Dihydrofolat-Reduktase bekannt<sup>[37,38]</sup>, bei dem allerdings die als Ausgangsmaterial benötigte Dihydrofolsäure in einer gesonderten Reaktionsstufe aus Folsäure hergestellt werden muß.

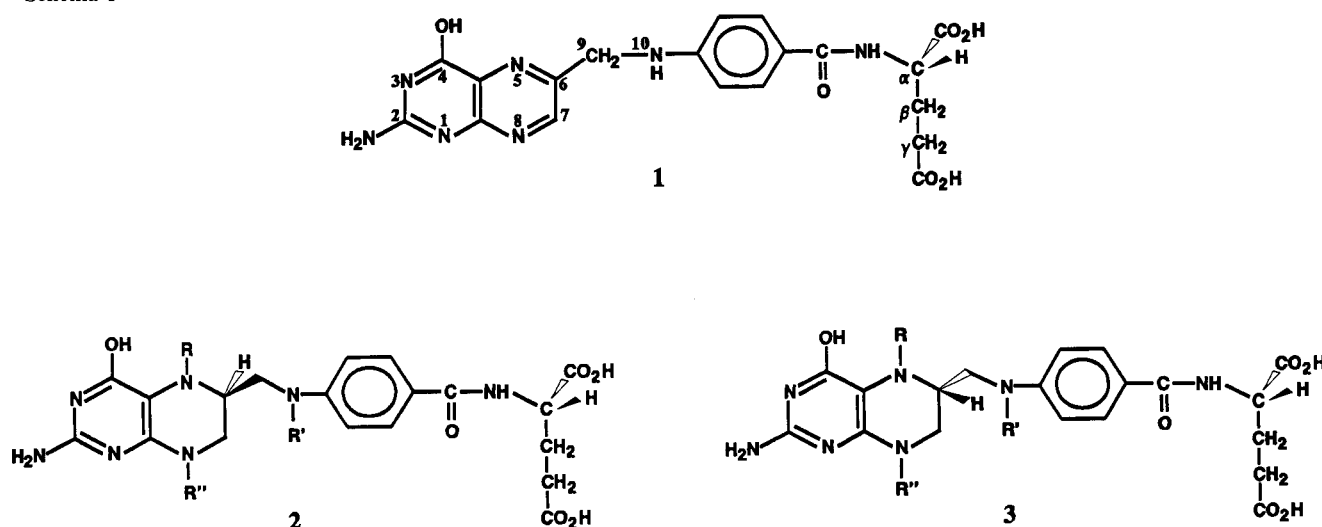
Ein anderer Ansatz ist die asymmetrische Reduktion der prochiralen C=N-Bindung im Pterinheterocyclus, katalysiert durch optisch aktive Übergangsmetallkomplexe. Rhodium(I)/Phosphan-Komplexe vom Wilkinson-Typ zeigten jedoch bei der homogenen Hydrierung des Ringsystems eines derivatisierten Biopterins keine Aktivität und führten zur Zersetzung des Substrates<sup>[39]</sup>. Auch mit einem optisch aktiven Rhodium(I)/DIOP-Katalysator konnte eine in wäßrigem Benzol lösliche, silylierte Folsäure nicht reduziert werden<sup>[40]</sup>. Dagegen ließen sich mit einem in situ aus (Pyridin)<sub>3</sub>RhCl<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub> und Wasserstoff dargestellten, mit chiralen Amidin modifizierten Katalysator bei Hydrierung von L-Biopterin<sup>[39]</sup> und Folsäure<sup>[41]</sup> kleine Diastereomerenüberschüsse erhalten.

Das Ziel unserer Bemühungen war die diastereoselektive Hydrierung der Folsäure in wäßriger Lösung. Dies konnte mit einem auf Kieselgel heterogenisierten Rhodium(I)/Diphosphan-Katalysatorsystem erreicht werden. Zur Bestimmung der erhaltenen Diastereomeren ausbeute wurde die von Rees beschriebene Methode zur Auftrennung der Isomeren des Tetrahydrofolsäure-Derivats **2b** und **3b** durch HPLC<sup>[22,23]</sup> gewählt und zu einer quantitativen Analytik verbessert.

## Derivatisierung mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester

Bei der Reduktion der C=N-Bindung im Pyrazinring von Folsäure (**1**) entsteht 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a** und **3a**), die in Gegenwart von Säuren und Basen schnell durch Luft-sauerstoff unter Zersetzung oxidiert wird<sup>[42–44]</sup>. Die Neigung zu Zersetzungsreaktionen läßt sich durch Derivatisieren der N-5-Amino-Funktion mit elektronenziehenden Substituenten wie einer Formyl- oder Urethangruppe vermeiden<sup>[21]</sup>. Diese Derivate der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure sind in neutraler bis schwach saurer Lösung beständig<sup>[2]</sup>. Aus diesem Grund wird 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a** bzw. **3a**) nicht isoliert, sondern in situ mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester derivatisiert<sup>[22,23]</sup>. Das Reagens reagiert in wäßrigem Ethanol bei pH 7 bevorzugt an N-5 des reduzierten Pterinrings zu 5-(Menthoxycarbonyl)-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (**2b** und **3b**). Dieses Urethan-Derivat ist luftstabil und kann nach Ansäuern der Reaktionsmischung ohne Zersetzung isoliert werden. Die Abspaltung der Menthoxycarbonyl-Hilfsgruppe erfolgt in stark saurer Lösung, wobei N-5 in Gegenwart von Ameisensäure formyliert wird. Nach einer intramolekularen Kondensation unter Wasserabspaltung läßt sich das verbrückte Folat, die luftstabile 5,10-Metheno-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (**2e** bzw. **3e**) isolieren<sup>[19,33,34,45]</sup>. Bei der Hydrolyse dieses „Anhydrofolins“ in heißem, wäßrigem Phosphatpuffer bei pH 7 entsteht Folin-säure (**2f** bzw. **3f**), die durch Zugabe von Calciumchlorid-lösung und Ethanol ausgefällt wird. Das Calciumsalz von

Schema 1



	a	b	c	d	e	f
R	H	COOMenthyl	COOMenthyl	COOMenthyl	} = CH-] +	CHO
R'	H	H	COOMenthyl	H		H
R''	H	H	H	COOMenthyl		H

**2f** bzw. **3f** (Leucovorin) wird durch Umkristallisieren aus wäßrigem Ethanol gereinigt.

### Analytik der derivatisierten Hydrierprodukte

Für 5-(Menthylloxycarbonyl)-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (**2b** und **3b**) beschreibt Rees eine flüssigchromatographische Auftrennung auf einer Reversed-Phase-ODS-Säule (mit Octadecylsilylgruppen belegtes Kieselgel, 25% Acetonitril und 75% 0.05 M Tris/HCl-Puffer pH 7)<sup>[22]</sup>, die jedoch nicht alle bei der Derivatisierung mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester entstehenden Tetrahydrofolat-Derivate erfäßt.

Neben N-5 im reduzierten Pyrazinring können in 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a** bzw. **3a**) auch N-8 und N-10 mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester zum Urethan reagieren. Die Reaktion in N-5-Position ist zwar bevorzugt, es kommt jedoch neben der Monoderivatisierung zu **2b** und **3b** auch zur Bildung der diderivatisierten Tetrahydrofolate **2c/3c** und **2d/3d**. Die Menge der Diderivate ist vom Verhältnis 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a** und **3a**) zu zugesetztem Derivatisierungsreagens abhängig. Bei größerem Überschuß an (–)-Chlorameisensäure-menthylester entstehen die diderivatisierten Produkte **2c/3c** und **2d/3d** in erheblichen Mengen. Schon bei einem Molverhältnis Folsäure/(–)-Chlorameisensäure-menthylester von 1:1.3 liegt die Hälfte der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure **2a/3a** diderivatisiert vor, während ab dem Verhältnis 1:2.0 fast nur mehr die Diderivate **2c,d/3c,d** zu finden sind<sup>[46]</sup>. Angaben zur Charakterisierung von **2c**, **d** und **3c**, **d** durch FAB-Massenspektroskopie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie finden sich in Lit.<sup>[46]</sup>.

Weiter unten wird ausgeführt, daß die Bildung von **2c/3c** und **2d/3d** aus **2b/3b** diastereoselektiv verläuft. Damit verändert sich das Verhältnis der beiden diastereomeren Monoderivatisierungsprodukte **2b** und **3b** in Abhängigkeit von der Zugabe an (–)-Chlorameisensäure-menthylester, und zwar zugunsten der (6*S,S*)-Verbindung **2b**<sup>[46]</sup>.

Mit den HPLC-Bedingungen von Rees können nur die monoderivatisierten Verbindungen **2b** und **3b** detektiert werden<sup>[22]</sup>, aber nicht die diderivatisierten Verbindungen **2c**,

**d** und **3c**, **d**. Um alle in den derivatisierten Hydrierproben enthaltenen Tetrahydrofolate von der ODS-Säule zu lösen, muß die Solvenszusammensetzung der flüssigen Phase während der Messung mit einem Stufengradienten zu höherem Acetonitrilanteil verändert werden. Deshalb wird, beginnend mit einem Volumenverhältnis von 19% Acetonitril in 81% 0.05 M Phosphatpuffer, der organische Solvensanteil nach 15 Minuten Laufzeit in 2 Minuten auf 35% Acetonitril in 65% 0.05 M Phosphatpuffer gebracht. Abb. 1 zeigt ein typisches HPLC-Diagramm bei vollständiger Hydrierung von Folsäure mit dem achiralen Cokatalysator 1,2-Bis(diphenylphosphanyl)ethan (1,2-BDPE).

Nach der Elution der durch Zersetzung gebildete Pterine (Signal A) werden mit den Signalen B und C die Diastereomeren der in N-5-Position derivatisierten Tetrahydrofolsäure **2b** und **3b** detektiert, wobei des (6*R,S*)-Isomere **3b** vor dem (6*S,S*)-Isomeren **2b** erscheint. Die Zuordnung der Isomeren zu diesen Signalen erfolgt mit angereicherten Proben der beiden Diastereomeren, die durch Extraktion eines Gemisches von **2b** und **3b** mit *n*-Butanol erhalten wurden<sup>[22,23]</sup>.

Noch vorhandene Folsäure (**1**) wird von (–)-Chlorameisensäure-menthylester an N-10 derivatisiert und ergibt bei erhöhtem Acetonitril-Gehalt des Solvens das Signal D. Das Spaltfragment *N*-(*p*-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure wird von (–)-Chlorameisensäure-menthylester an der *p*-ständigen Aminogruppe derivatisiert. Diese Verbindung erscheint in den HPLC-Spektren als Signal E. Beide Verbindungen konnten nach Isolierung durch präparative HPLC anhand der <sup>1</sup>H-NMR- und FAB-Massenspektren identifiziert und charakterisiert werden<sup>[46]</sup>.

Zuletzt werden die vier Signale F, G, H und J für die beiden in den Arbeiten von Rees nicht berücksichtigten Diastereomerenpaare der diderivatisierten Tetrahydrofolate **2c**, **d** und **3c**, **d** bei einem Acetonitrilanteil von 35% in 65% 0.05 M Phosphatpuffer von der Reversed-Phase-Säule eluiert. Die aufeinanderfolgenden Signale F/G und H/J entsprechen je einem Diastereomerenpaar, wobei die (6*R,S*)-Isomeren **3c**, **d** (F und H) vor den (6*S,S*)-Isomeren **2c**, **d** (G und J) erscheinen. Bei einem Derivatisierungsverhältnis [Folsäure zu (–)-Chlorameisensäure-menthylester] von 1:1.0 und einem Hydriergrad von nahezu 100% fehlen die Signale H und J der Isomeren eines Diderivates völlig<sup>[46]</sup>. Bezüglich <sup>1</sup>H-NMR-Spektren, FAB-Massenspektren und Drehwerten der durch präparative HPLC isolierten Fraktionen F, G und der aufgrund der geringen Substanzmenge zusammengefaßten Fraktionen H/J siehe Lit.<sup>[46]</sup>.

### Hydriergrad und optische Induktion

Die Bestimmung der chemischen Ausbeute nach der Derivatisierung mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester durch Wiegen der Proben ist wegen der Produktzusammensetzung [Mono- und Diderivate der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, 10-(Menthylloxycarbonyl)folsäure und derivatisiertes Spaltfragment *p*-Aminobenzoyl-L-glutaminsäure] und des schwankenden Wassergehaltes ausgeschlossen. So ergeben sich rechnerische Rohausbeuten von über 100% an monoderivatisierter 5-(Menthylloxycarbonyl)-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure<sup>[23]</sup>.

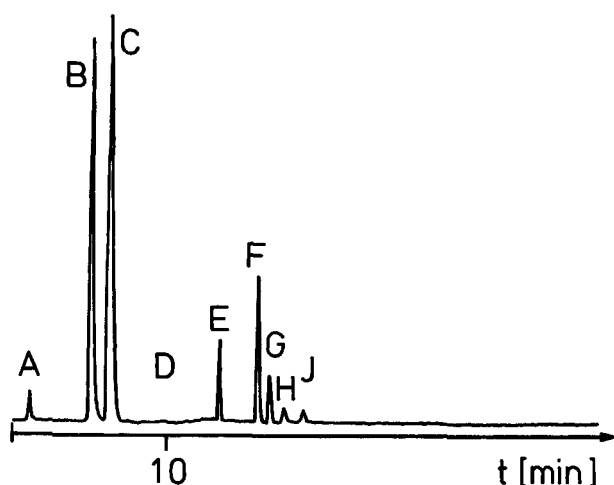


Abb. 1. HPLC-Diagramm einer Probe, in der Folsäure (**1**) unter Standardbedingungen mit 2.5 Mol-% des immobilisierten Katalysators [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>/1,2-BDPP hydriert wurde

Zur Beschreibung des Hydriergrades (% HG) wird daher der Quotient aus der Summe der Peakflächen der Tetrahydrofolat-Derivate **2b–d** und **3b–d** und der Summe der Peakflächen der reduzierten Folat-Derivate **2b–d** und **3b–d** sowie der unreduzierten, aber derivatisierten 10-(Menthylloxycarbonyl)folsäure (Signal D) und des derivatisierten Spaltfragments (Signal E) gebildet (Gleichung 1). Eine Abhängigkeit der Intensität der Detektion von den molaren Extinktionskoeffizienten der Verbindungen ist dabei nicht berücksichtigt.

Während der Hydrierung von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure entstehen nicht näher identifizierte Pterin-Derivate und *N*-(*p*-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure im Verhältnis 1:1<sup>[42–44]</sup>. Bei der Aufarbeitung wird ein Großteil der heterocyclischen Verbindungen abgetrennt. Daher hat das Integral von Signal A der Pterin-Fraktion keine Bedeutung für die Berechnung des Hydriergrads. Zur Erfassung der zersetzten Tetrahydrofolate wird stattdessen das Integral von Signal E (derivatisierte *p*-Aminobenzoyl-L-glutaminsäure) in Zähler und Nenner aufgenommen.

$$\% \text{ HG} = \frac{I_B + I_C + I_E + I_F + I_G + I_H + I_J}{I_B + I_C + I_D + I_E + I_F + I_G + I_H + I_J} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Zur Berechnung der optischen Induktion (% de) der bei der katalytischen Hydrierung erhaltenen 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a** und **3a**) lassen sich die bis auf die Grundlinie getrennten Peakflächen der Diastereomeren **2b–d** und **3b–d** der HPLC-Spektren heranziehen (Abb. 1). Dazu werden die Peakflächen von allen Diastereomeren mit der gleichen Konfiguration addiert. Der Quotient aus der Differenz der Flächenintegrale der (6*S,S*)- bzw. (6*R,S*)-Diastereomeren zur Summe der Peakflächen aller Diastereomeren ergibt dann den Diastereomerenüberschuß in Prozent (Gleichung 2). Die Diastereomerenüberschüsse sind bezüglich der durch die Aufarbeitung bedingten Verluste und der geringfügig unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten der Diastereomeren unkorrigiert.

$$\% \text{ de} = \frac{[(I_B + I_F + I_H) - (I_C + I_G + I_J)]}{(I_B + I_C + I_F + I_G + I_H + I_J)} \cdot 100 \% \quad (2)$$

Gleichung (3) gibt den Diastereomerenüberschuß (% de<sup>s</sup>) der monoderivatisierten Verbindungen **2b** und **3b** an, der für die Diastereomerenreinheit des Folgeprodukts Leucovorin von Bedeutung ist.

$$\% \text{ de}^s = \frac{|I_B - I_C|}{(I_B + I_C)} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Die Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses **2a/3a** nach der Derivatisierung nur durch Integration der Signale B und C für das Isomerenpaar der monoderivatisierten 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2b** und **3b**) ohne Berücksichtigung der Diderivate **2c, d** und **3c, d** führt zu falschen Ergebnissen. Dies zeigt sich deutlich bei mit steigendem Überschuß an (–)-Chlorameisensäure-menthylester derivatisier-

ten Hydrierproben. Im Balkendiagramm (Abb. 2) für die heterogene Hydrierung von Folsäure (**1**) mit dem Chelatliganden (–)-DIOP sind die Diastereomerenüberschüsse in Abhängigkeit vom Verhältnis 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a/3a**) zu (–)-Chlorameisensäure-menthylester aufgeführt. Die gestrichelten Balken (% de<sup>s</sup>) geben das Isomerenverhältnis **2b/3b** des Monoderivates ohne Berücksichtigung der isomeren Diderivate an. Die ausgefüllten Balken (% de) entsprechen den um die diderivatisierten Isomeren **2c, d** und **3c, d** korrigierten Diastereomerenüberschüssen aller Tetrahydro-Derivate **2b–d** und **3b–d**, die für die Verhältnisse **2a/3a** zu (–)-Chlorameisensäure-menthylester zwischen 1:1 und 1:2 konstant sind. Die gemessenen Werte liegen dabei innerhalb der Balkenaufsätze (Fehlerbereich).

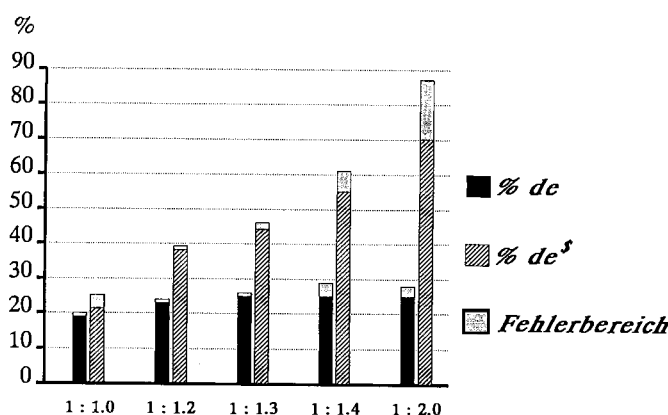


Abb. 2. Abhängigkeit des Diastereomerenüberschusses von der Menge Derivatisierungsreagens (–)-Chlorameisensäure-menthylester. Abszisse: Verhältnis **2a/3a** zu (–)-Chlorameisensäure-menthylester. Katalysator [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>/(–)-DIOP<sup>[49]</sup>, Standardbedingungen

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, kommt es bei der Derivatisierung der Diastereomeren **2a** und **3a** durch (–)-Chlorameisensäure-menthylester zu einer diastereoselektiven Reaktion, in der das (6*R,S*)-Isomere **3a** schneller zu **3b–d** weiterderivatisiert wird als das (6*S,S*)-Isomere **2a** zu **2b–d**. Bei steigendem Verhältnis Derivatisierungsreagens/5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure ergibt sich deshalb ein steigender Überschuß des (6*S,S*)-Isomeren bei den monoderivatisierten Verbindungen **2b** bzw. **3b** (% de<sup>s</sup>). Eine Vernachlässigung der diderivatisierten Verbindungen **2c, d** und **3c, d** täuscht damit eine zu hohe (6*S,S*)-Isomerenanreicherung vor. Die Abweichung wird umso größer, je größer das Verhältnis (–)-Chlorameisensäure-menthylester/5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure ist. Dagegen bleiben die um die diderivatisierten Diastereomeren **2c, d** und **3c, d** korrigierten Diastereomerenverhältnisse (% de) auch bei einem Überschuß an Derivatisierungsreagens konstant (Abb. 2).

#### Immobilisierter Hydrierkatalysator und Reaktionsbedingungen

Folsäure (**1**) und ihre Tetrahydro-Derivate **2b–d** bzw. **3b–d** lösen sich in Eisessig und Ameisensäure, aber auch in wäbrigem, gepuffertem Alkali bei pH 7. Werden in diesen

Lösungsmitteln homogen gelöste, in situ gebildete Rhodium(I)/Diphosphan-Komplexe als Hydrierkatalysatoren eingesetzt, kommt es zu keiner Reduktion der Folsäure. Nach Derivatisierung mit (–)-Chlorameisensäure-menthyl-ester kann nur 10-(Menthylloxycarbonyl)folsäure isoliert werden<sup>[46]</sup>. Dagegen erweisen sich auf Kieselgel abgeschiedenes Rhodium und auf Kieselgel immobilisierte Rhodium(I)/Diphosphan-Komplexe<sup>[47]</sup> in wäßriger Lösung bei der Hydrierung von Folsäure als katalytisch aktiv (Tab. 1)<sup>[46]</sup>.

Tab. 1. Hydrierung<sup>[a]</sup> von Folsäure (**1**) mit heterogenisierten Rhodium-Katalysatoren

Nr.	Ligand	% HG	% de	Konfig.	Anzahl
1	<sup>[b]</sup>	96–98	1–4	(6 <i>S,S</i> )	3
2	1,2-BDPE <sup>[c]</sup>	95–97	5–7	(6 <i>S,S</i> )	2
3	1,3-BDPP <sup>[d]</sup>	98–99	1–5	(6 <i>S,S</i> )	2
4	1,4-BDPB <sup>[e]</sup>	97–99	1–4	(6 <i>S,S</i> )	5
5	(–)-1,4-BDPP <sup>[f]</sup>	96–98	20–24	(6 <i>S,S</i> )	3
6	(–)-2,4-BDPP <sup>[g]</sup>	98–99	18–20	(6 <i>S,S</i> )	2
7	(+)-PROPHOS <sup>[48]</sup>	97–99	9–12	(6 <i>R,S</i> )	3
8	(+)-DIOP <sup>[49]</sup>	96–99	10–12	(6 <i>R,S</i> )	4
9	(–)-DIOP <sup>[49]</sup>	96–98	18–21	(6 <i>S,S</i> )	5
10	(+)-NORPHOS <sup>[50]</sup>	96–98	18–22	(6 <i>S,S</i> )	3
11	(–)-NORPHOS <sup>[50]</sup>	98–99	11–13	(6 <i>R,S</i> )	3
12	(–)-BPPM <sup>[51]</sup>	34–39	8–10	(6 <i>S,S</i> )	2
13	(+)-BINAP <sup>[52]</sup>	78–82	15–16	(6 <i>S,S</i> )	2
14	(–)-Ph-β-glup <sup>[53]</sup>	81–83	8–12	(6 <i>S,S</i> )	2
15	(+)-1,2,4-TDPB <sup>[h]</sup>	85–88	1–3	(6 <i>R,S</i> )	2

<sup>[a]</sup> Standardbedingungen: Rhodium/Ligand-Verhältnis 1:1.15. Rhodium/Folsäure-Verhältnis 1:40, 40 bar H<sub>2</sub>-Druck, 80 °C, 24 h; Folsäure/(–)-Chlorameisensäure-menthyl-ester-Verhältnis 1:1.0. – <sup>[b]</sup> Rh(O)/SiO<sub>2</sub>. – <sup>[c]</sup> 1,2-Bis(diphenylphosphanyl)ethan. – <sup>[d]</sup> 1,3-Bis(diphenylphosphanyl)propan. – <sup>[e]</sup> 1,4-Bis(diphenylphosphanyl)butan. – <sup>[f]</sup> (S)-1,4-Bis(diphenylphosphanyl)pentan<sup>[54]</sup>. – <sup>[g]</sup> (S,S′)-2,4-Bis(diphenylphosphanyl)pentan<sup>[55]</sup>. – <sup>[h]</sup> (R)-1,2,4-Tris(diphenylphosphanyl)butan<sup>[54]</sup>.

Für die 14 Liganden in Tab. 1 werden Kurzbezeichnungen verwendet. Für die optisch aktiven Liganden sind Literaturzitate angegeben. Mit den heterogenen Katalysatoren wird bei 80 °C und einem Wasserstoffdruck von 40 bar nach 24 Stunden Reaktionszeit (Standardbedingungen) eine nahezu vollständige Hydrierung der Folsäure erreicht.

Während die in Tab. 1 aufgeführten Chelatphosphane bei der Hydrierung von **1** sehr effektiv sind, zeigen immobilisierte Rhodium(I)-Komplexe mit einzähnigen Phosphan-Liganden wie PPh<sub>3</sub>, (+)-GLYPHOS<sup>[56]</sup> und (–)-MDPP<sup>[57]</sup> keine oder nur sehr geringe Hydrieraktivität<sup>[46]</sup>. Bei nahezu allen Versuchen mit Chelatliganden konnten Hydriergrade von mindestens 80% erreicht werden. Eine Ausnahme stellt lediglich der Ligand (–)-BPPM dar, der unter Standardbedingungen nur einen Hydriergrad von 35% ergibt (Nr. 12). Die Optimierung der Reaktionsparameter (40 bar H<sub>2</sub>-Druck, 80 °C, 24 h) erfolgte anhand der Hydrierung von **1** mit 2.5 Mol-% Rhodium(I)/(–)-DIOP-Katalysator. Der Hydriergrad ist vom verwendeten Wasserstoff-Druck abhängig. Bei niedrigen Drücken verläuft die Reduktion unvollständig, wobei mit 2 bar Wasserstoffdruck nur noch etwa die Hälfte der Folsäure hydriert wird. Großen Einfluß auf die Reaktion hat die Reaktionstemperatur. Bei Temperaturen unter 80 °C sinkt der Hydriergrad sehr schnell ab.

Schon bei 60 °C wird weniger als die Hälfte des Substrats reduziert, und ab 40 °C kann keine Hydrierung der Folsäure mehr festgestellt werden. Reaktionstemperaturen über 80 °C führen zu einer verstärkten Zersetzung der 5,6,7,8-Tetrahydrofolate und senken die Produktausbeute. Auch die Reaktionszeit beeinflusst die Hydrierung der Folsäure. Während nach 8 Stunden erst 65% des Substrats hydriert sind, steigt der Hydriergrad bei einer Verdopplung der Reaktionszeit auf fast 100% an. Ein Katalysator/Folsäure-Verhältnis unter 1:40 führt zu geringerem Umsatz, wobei der Hydriergrad mit 0.8 Mol-% Katalysator unter Standardbedingungen noch 85–90% beträgt. Vergleicht man die achiralen Bis(diphenylphosphanyl)-Liganden (Nr. 2–4), die Chelatringe der Gliederzahl 5, 6 und 7 bilden, kann eine Abhängigkeit des Hydriergrades von der Ringgröße nicht festgestellt werden.

### Diastereomerenverhältnisse

Ziel der Folsäurehydrierung mit immobilisierten Rhodium(I)/Diphosphan-Komplexen ist die diastereoselektive Synthese von (6*S,S*)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a**). Werden die Hydrierungen mit achiralen Katalysatoren durchgeführt (Nr. 1–4), erhält man geringe Diastereomerenüberschüsse zwischen 1 und 4% des (6*S,S*)-Isomeren **2b–d** aufgrund einer schwachen Substratinduktion durch den L-Glutaminsäure-Rest. Mit den in dieser Arbeit verwendeten optisch aktiven Chelatphosphanen lassen sich dagegen signifikante Diastereomerenanreicherungen erzielen. Je nach Konfiguration des Liganden ergeben sich entgegengesetzte Diastereomerenüberschüsse. Während mit Cokatalysatoren wie (+)-DIOP und (–)-NORPHOS bevorzugt 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure mit der unnatürlichen (6*R,S*)-Konfiguration **3a** entsteht, bildet sich mit (–)-DIOP und (+)-NORPHOS verstärkt das gewünschte (6*S,S*)-Isomere **2a**.

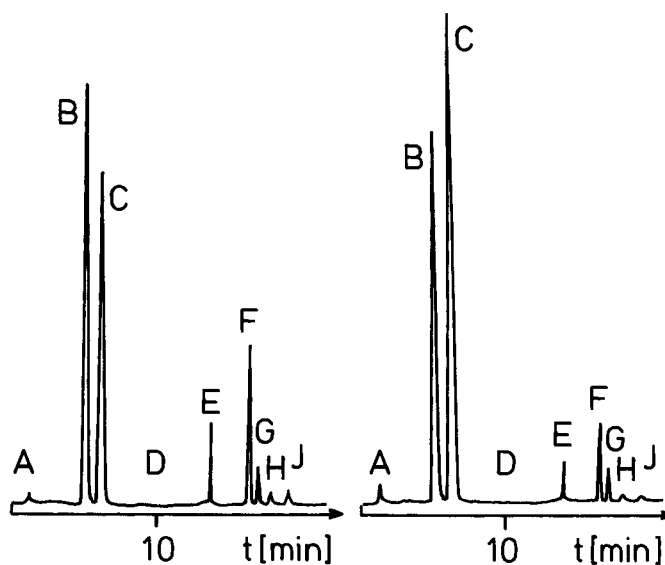


Abb. 3. HPLC-Diagramm von Folsäureproben, die unter Standardbedingungen mit 2.5 Mol-% der immobilisierten Katalysatoren [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>/(+)-DIOP (linke Hälfte) und [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>/(–)-DIOP (rechte Hälfte) hydriert wurden

In den beiden HPLC-Spektren (Abb. 3) für die mit den Cokatalysatoren (+)- und (-)-DIOP erhaltenen Hydrierproben zeigt sich beim Diderivat **2c/3c** (Signale F/G) deutlich die Anreicherung des (6*R,S*)-Isomeren **3c** (Signal F) unabhängig von der Konfiguration des verwendeten Chelatphosphans. Die Bildung des zuletzt eluierten Diderivats **2d/3d** (Signale H/J) weist dagegen kaum eine Diastereoselektivität auf. Dieses Ergebnis bekräftigt die Notwendigkeit der Einbeziehung der Diderivate **2c, d** und **3c, d** bei der Ermittlung der Diastereomerenüberschüsse der katalytischen Folsäurehydrierung.

Die höchsten Diastereomerenüberschüsse zugunsten des (6*S,S*)-Isomeren werden bei vollständiger Hydrierung von Folsäure (**1**) mit den Liganden (*S*)-1,4-Bis(diphenylphosphanyl)pentan [(*-*)-1,4-BDPP] (Nr. 5), (*S,S'*)-2,4-Bis(diphenylphosphanyl)pentan [(*-*)-2,4-BDPP] (Nr. 6), (-)-DIOP (Nr. 8) und (+)-NORPHOS (Nr. 10) erhalten. Der dreizählige Ligand (*R*)-1,2,4-Tris(diphenylphosphanyl)butan (Nr. 15) ergibt einen relativ hohen Hydriergrad von 85–88%, jedoch nur eine optische Induktion von 1–3% de.

Setzt man den heterogenisierten Rhodium(I)/(-)-DIOP-Katalysator mehrfach ein, so sinkt der Hydriergrad zunehmend ab. Nach dreimaliger Verwendung bei Standardbedingungen werden aber immer noch 90% der Folsäure hydriert. Auch die erzielten Diastereomerenüberschüsse werden geringer und betragen nach dem Dritteinsatz des Katalysators nur mehr knapp über 10% zugunsten des (6*S,S*)-Isomeren.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der BASF AG, Ludwigshafen, für die Unterstützung dieser Arbeit.

## Experimenteller Teil

<sup>1</sup>H-NMR: Bruker WM 250 (250 MHz, Meßtemperatur 24 ± 1 °C). – MS: FD-MS Finnigan MAT 90 (Matrix DMSO/Glycerin), FAB-MS Varian MAT 311A (Matrix DMSO/Glycerin) und LI-SIMS-MS Finnigan MAT 90 (Matrix DMSO/Glycerin). – Analytische HPLC: Pumpe Waters Assoc. 6000A, Spectra-Physics SP8700 Solvent Delivery System, wellenlängenvariabler UV-Detektor Perkin Elmer LC55, Integrator Spectra-Physics SP4020 Data Interface and Spectra-Physics SP4000 Central Processor. – Präparative HPLC: Pumpe Orlita SD30, LKB Bromma 8300 UVICORD II-Detektor. – UV-Vis: Hitachi-U-2000-Spektrophotometer.

Die Hydrierungen sowie alle Synthesen mit sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindlichen Verbindungen wurden unter getrocknetem Stickstoff durchgeführt. Verwendet wurde bidestilliertes Wasser, das nach Entgasen im Ultraschallbad durch mehrtägiges Stickstoff-Einleiten von gelöstem Sauerstoff befreit wurde. Die Phosphatpuffer wurden durch Auflösen einer entsprechenden Menge von primärem bzw. sekundärem Natriumphosphat (reinst) (Merck) in Wasser mit anschließender Filterung durch ein 0,45-µm-Nylon-Membranfilter (Schleicher & Schüll NL17) hergestellt und ebenso wie Wasser mit Stickstoff gesättigt. Die benötigten Säuren und Basen erfuhren die gleichen vorbereitenden Maßnahmen. Das Derivatisierungsreagenz (-)-Chlorameisensäure-menthylester wurde vor Gebrauch unter Stickstoff destilliert. Das als Trägermaterial bei den heterogenen Katalysen verwendete Kieselgel 60 (Merck, Korngröße 0,063 bis

0,200 mm, 70–230 mesh ASTM) wurde 18 h im Hochvakuum entgast und mit Stickstoff beladen.

Käuflich waren Folsäure (**1**) (Fluka) und (-)-Chlorameisensäurementhylester (Aldrich).

### Hydrierungen mit immobilisierten Rhodium-Katalysatoren

**Immobilisierung der Rhodium(I)/Diphosphan-Komplexe:** In einem Autoklaveneinsatz werden 7,00 mg (0,028 mmol Rh) [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>, cod = 1,5-Cyclooctadien, entsprechend dazu im Verhältnis 1:1,15 0,033 mmol des Diphosphan-Liganden und 0,80 g Kieselgel eingewogen und mit Stickstoff gesättigt. Nach Lösen in 10 ml Dichlormethan schlägt die gelbe Farbe nach orange um. Diese zunächst tiefgefärbte Suspension läßt man 30 min bei Raumtemp. rühren, währenddessen der orange Rhodium(I)/Diphosphan-Komplex unter Entfärbung der organischen Lösung an der Oberfläche des Trägermaterials adsorbiert. Bei Raumtemp. wird im Ölpumpenvak. das organische Lösungsmittel entfernt und das gelborange Katalysator-Pulver getrocknet.

**Rhodium auf Kieselgel:** Zur Abscheidung von fein verteiltem Rhodium(0) auf Kieselgel wird wie zuvor beschrieben [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>, jedoch ohne einen Diphosphan-Liganden, in Dichlormethan gelöst auf Kieselgel adsorbiert. Das Solvens wird i. Vak. entfernt und das gelbe Pulver i. Vak. getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Wasser wird die Suspension 8 h bei einem Wasserstoffdruck von 40 bar und einer Reaktionstemp. von 60 °C gerührt. [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub> wird dabei zu metallischem Rhodium reduziert. Der Katalysator wird durch Abfrühen vom Solvens abgetrennt und i. Vak. getrocknet.

**Durchführung der heterogenen Katalysen:** Die Hydrierungen werden in 100-ml-Laborautoklaven mit Manometer durchgeführt. 0,50 g (1,13 mmol) mit Stickstoff gesättigte Folsäure (**1**) wird in 25 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers mit pH 7,0 suspendiert und durch Zusetzen einer äquimolaren Menge Natronlauge gelöst, ohne den neutralen Pufferbereich zu verlassen. Die klare, dunkelorange Lösung wird nun unter Schutzgas zu dem im Autoklaveneinsatz vorgelegten, immobilisierten Rhodium(I)-Katalysator gegeben. Der Autoklav wird dreimal mit 20 bar Wasserstoff gespült und auf den Standarddruck von 40 bar gebracht. Dann läßt man den Ansatz 24 h bei 80 °C rühren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wird die gelbliche Lösung über eine GIII-Filterfritte vom heterogenen Katalysator abgetrennt. Den festen Katalysator-Rückstand wäscht man mit 3 ml des entsprechenden Phosphatpuffers und arbeitet die vereinigten wäßrigen Lösungen wie nachfolgend beschrieben auf.

**Derivatisierung mit (-)-Chlorameisensäure-menthylester:** Die wäßrige Lösung der fast farblosen 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (**2a** und **3a**) wird unter strengem Sauerstoffausschluß mit 25 ml Ethanol verdünnt. Die resultierende Lösung versetzt man in einem Guß mit einer bezogen auf das Edukt äquimolaren Menge (-)-Chlorameisensäure-menthylester und rührt kräftig, um eine möglichst schnelle Verteilung des Derivatisierungsreagens zu gewährleisten. Anschließend läßt man noch 18 h bei Raumtemp. reagieren. Dann wird im Wasserstrahlvak. der zuvor von etwaigen unlöslichen Bestandteilen abfiltrierte Derivatisierungsansatz auf etwa 20 ml eingengt. Man füllt mit 0,1 N NaOH auf 25 ml auf, versetzt die leicht alkalische Lösung vorsichtig mit 1 N HCl, bis die Menthylloxycarbonyl-Derivate **2b–d** bzw. **3b–d** der Tetrahydrofolsäure bei pH 5,0 auszufallen beginnen. Nachdem der pH-Wert auf 4,5 eingestellt ist, kann das cremefarbene, gallertartige Produkt von der gelben Lösung bei 8000 U/min abzentrifugiert werden. Der Rückstand wird mit 10 ml Dichlormethan kräftig geschüttelt, wobei das organische Solvens das Wasser aus der Produktgallerte verdrängt und alle organisch löslichen Verunreinigungen abgetrennt werden. Nach dem Zentrifugieren befindet sich das unlösliche Produkt als Schicht

zwischen der gelben wäßrigen und der farblosen organischen Phase, von denen vorsichtig dekantiert wird. Dann trocknet man das erhaltene Pulver 24 h über  $P_2O_5$  im Ölpumpenvak.

**Mehrfachverwendung der immobilisierten Rhodium(I)-Katalysatoren:** Der bei der Aufarbeitung der Hydrieransätze zurückgewonnene immobilisierte Rhodium(I)-Katalysator wird durch Waschen mit dreimal 20 ml sauerstofffreiem Wasser von Substratresten sowie anorganischen Salzen befreit und anschließend im Ölpumpenvak. mehrere Stunden getrocknet. Das erhaltene hellbeige Pulver kann als Hydrierkatalysator wiederverwendet werden.

**Analytische HPLC:** Die flüssigchromatographische Trennung der derivatisierten Hydrierprodukte erfolgt auf einer 300 mm × 4 mm-Reversed-Phase-Kieselgelsäule RP18-Spherisorb ODS-II (5 µm) der Fa. Bischoff. Die wäßrige Phase besteht aus einem 0.05 M  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ -Puffer mit dem Pufferbereich bei pH 7. UV-reines Acetonitril wird durch chromatographische Reinigung über eine mit Aluminiumoxid (ICI Alumina N-Super I neutral) gefüllte Säule erhalten. Nach Filtrieren über ein 0.45-µm-Membranfilter werden die Solvenzien im Volumenverhältnis 19% Acetonitril und 81% Phosphatpuffer vorgemischt. Die flüssige Phase und das HPLC-System werden zur Vermeidung von Zersetzungsreaktionen bei der Messung ständig mit Helium gespült. Während der HPLC-Messung bei konstantem Fluß von 1.0 ml/min wird die Zusammensetzung der mobilen Phase mit einem Stufengradienten zu höherem Acetonitrilanteil verändert. Dem Basissolvens wird 12 min nach Beginn der Messung reines Acetonitril zugemischt. Der Acetonitrilanteil steigt dabei innerhalb von 2 min auf 35% in 65% Phosphatpuffer. Die eluierten Verbindungen werden bei der Wellenlänge 285 nm detektiert.

**Präparative HPLC:** Die präparative Trennung der derivatisierten Hydrierprodukte erfolgt auf einer 250 mm × 20 mm-Reversed-Phase-Kieselgelsäule RP8-Lichrosorb (10 µm) der Fa. Knauer (Detektion bei 254 nm). Dazu werden 400 mg Substanzgemisch in etwa 4 ml 0.05 M Phosphatpuffer gelöst. In 40 Durchgängen wird die Probe mit einem Aufgabenvolumen von 100 µl je Messung (ca. 10 mg gelöste Substanz) bei 100 bar aufgetrennt und in die Fraktionen A–F geschnitten. Das Lösungsmittelgemisch hat die Zusammensetzung 24% Acetonitril in 76% 0.05 M Phosphatpuffer bei pH 7 und wird kontinuierlich mit Helium gesättigt. Die gesammelten Fraktionen müssen durch nochmalige präparative Flüssigchromatographie gereinigt werden. Nach Entfernen des Solvens kristallisiert man die Rückstände aus wäßrigem Ethanol bei pH 4.5 um, zentrifugiert das Produkt ab und trocknet die Probe i. Vak. über  $P_2O_5$ .

**5-(Menthylloxycarbonyl)-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure, N-[4-{[2-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroxy-5-(menthylloxycarbonyl)-6-pteridyl]methyl}aminobenzoyl]-L-glutaminsäure (2b, 3b):** Cremefarbenes Pulver, Umkristallisation aus Ethanol/Wasser, Schmp. 220–244 °C. — IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3500–2450  $cm^{-1}$  (Säure), 3340 (NH), 2960, 2860 (CH), 1720–1600 (C=O und Amid), 1230 (C–O), 755 (Phenylen). —  $^1H$ -NMR ( $[D_6]DMSO/TMS$ ):  $\delta$  = 0.69–2.07 (m, 21 H, Menthylprotonen und  $\beta$ -H<sub>2</sub>), 2.31–2.34 (m, 2 H,  $\gamma$ -H<sub>2</sub>), 2.83–2.88 (m, 1 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>), 2.97–3.07 (m, 2 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>), 3.35–3.40 (Wasser), 4.30–4.43 (m, 2 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>), 6.18–6.33 (breit, 3 H, NH<sub>2</sub> und 8-H), 6.83 (breit, 1 H, 10-H), 6.56/6.59–7.66/7.70 (AA'BB'-System, 4 H, *p*-Phenylen), 8.15 (d, 1 H, 7.8 Hz, NH-Amid-Glu), 10.06 (breit, 1 H, N-3-H-Amid), 12.30 (breit, 2 H, Carboxylprotonen). — UV (1 N NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 279.5 nm (34110). —  $[\alpha]_D^{25}$  = +6.3 ( $c$  = 1.49, 1 N NaOH) für ein >99% HPLC-reines ca. 1:1-Isomerengemisch von 2b und 3b. — MS (NI-FAB):  $m/z$  = 626 [M – H]<sup>–</sup>; MS (NI-LISIMS):  $m/z$  = 626.36 [M – H]<sup>–</sup>.  $C_{30}H_{41}N_7O_8 \cdot xH_2O$  (627.70 +  $x \cdot 18.01$ )

FAB):  $m/z$  = 626 [M – H]<sup>–</sup>; MS (NI-LISIMS):  $m/z$  = 626.36 [M – H]<sup>–</sup>.  $C_{30}H_{41}N_7O_8 \cdot xH_2O$  (627.70 +  $x \cdot 18.01$ )

**5,10-Bis(menthylloxycarbonyl)-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure, N-[4-{[(2-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroxy-5,10-bis(menthylloxycarbonyl)-6-pteridyl)methyl]amino}benzoyl]-L-glutaminsäure (2d, 3d):** Die Isolierung der dimerisierten Tetrahydrofolsäure, die mit überschüssigem (–)-Chlorameisensäure-menthylester entsteht, erfolgte durch präparative HPLC<sup>[46]</sup>. — IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3600–2400  $cm^{-1}$  (Säure), 3250 (NH), 3080 (CH arom.), 2920, 2840 (CH aliph.), 1730–1610 (C=O und Amid), 1480 (CH<sub>2</sub>), 1240 (C–O), 730 (Phenylen). —  $^1H$ -NMR ( $[D_6]DMSO/TMS$ ):  $\delta$  = 0.80–2.20 (m, 38 H, Menthylprotonen), 1.80–2.21 (m, 2 H,  $\beta$ -H<sub>2</sub>), 2.35–2.39 (m, 2 H,  $\gamma$ -H<sub>2</sub>), 3.07–3.38 (m, 1 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>), 3.35–3.41 (m, 1 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>), 3.62–3.73 (m, 1 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>), 3.90 (Wasser), 4.41–4.45 (m, 2 H, 7-H<sub>2</sub>, 6-H, 9-H<sub>2</sub>,  $\alpha$ -H), 7.63 (breit, 2 H, NH<sub>2</sub>), 7.38/7.42–7.85/7.88 (AA'BB'-System, 4 H, *p*-Phenylen), 8.62–8.66 (dd, 1 H, NH-Amid-Glu). — UV (1 N NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 273.0 nm (30608). —  $[\alpha]_D^{25}$  = –27.6 ( $c$  = 1.59, 1 N NaOH) für ein 98% HPLC-reines ca. 1:1-Isomerengemisch von 2d und 3d. —  $[\alpha]_D^{25}$  = –42.3 ( $c$  = 0.7, 1 N NaOH) für ein 95% HPLC-reines ca. 40:60-Isomerengemisch von 2d und 3d. — MS (NI-FAB):  $m/z$  = 808 [M – H]<sup>–</sup>. — MS (NI-LISIMS):  $m/z$  = 808.46 [M – H]<sup>–</sup>.

$C_{41}H_{59}N_7O_{10} \cdot xH_2O$  (809.96 +  $x \cdot 18.01$ )

**10-(Menthylloxycarbonyl)folsäure, N-[4-{[(2-Amino-4-hydroxy-6-pteridyl)methyl](menthylloxycarbonyl)amino}benzoyl]-L-glutaminsäure** entsteht aus unreduzierter Folsäure mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester und wird bei der beschriebenen Aufarbeitung der Hydrierproben neben 2b–d bzw. 3b–d erhalten. Gelbes Pulver. — IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3500–2300  $cm^{-1}$  (Säure), 3300 (NH), 3060 (CH arom.), 2980, 2860 (CH aliph.), 1710–1650 (C=O und Amid), 1610 (C=N), 1470 (CH<sub>2</sub>), 1220 (C–O), 770 (Phenylen). —  $^1H$ -NMR ( $[D_6]DMSO/TMS$ ):  $\delta$  = 0.61–1.86 (m, 19 H, Menthylprotonen), 1.92 bis 2.13 (m, 2 H,  $\beta$ -H<sub>2</sub>), 2.29–2.39 (m, 2 H,  $\gamma$ -H<sub>2</sub>), 3.51 (Wasser), 4.34–4.54 (m, 1 H,  $\alpha$ -H), 4.95–5.11 (m, AB-System, 2 H, 9-H<sub>2</sub>), 7.04 (breit, 3 H, NH<sub>2</sub>/8-H), 7.53/7.56–7.83/7.87 (AA'BB'-System, 4 H, *p*-Phenylen), 8.58 (d, 1 H, NH-Amid-Glu), 8.61 (breit, 1 H, N-3-H-Amid). — UV (1 N NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 261 nm (29200), 356 (10100). —  $[\alpha]_D^{25}$  = –26.2 ( $c$  = 0.8, 1 N NaOH). — MS (NI-FAB):  $m/z$  = 622 [M – H]<sup>–</sup>.

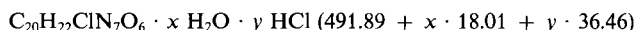
$C_{30}H_{37}N_7O_8 \cdot xH_2O$  (623.67 +  $x \cdot 18.01$ )

**N-{4-[(Menthylloxycarbonyl)amino]benzoyl}-L-glutaminsäure:** Die am *p*-ständigen Stickstoffatom derivatisierte N-(*p*-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure entsteht, wenn das während der Reduktion durch Zersetzung der Tetrahydrofolsäure 2a bzw. 3a abgespaltene Fragment mit (–)-Chlorameisensäure-menthylester reagiert. Die Verbindung wird durch präparative HPLC isoliert<sup>[46]</sup>. — IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3200–2560  $cm^{-1}$  (Säure), 3360 (NH), 3060 (CH arom.), 2970, 2910, 2880 (CH aliph.), 1720 (C=O), 1700 (C=O Urethan), 1485 (CH<sub>2</sub>), 1230 (C–O), 730 (Phenylen). —  $^1H$ -NMR ( $[D_6]DMSO/TMS$ ):  $\delta$  = 0.76–1.69 (m, 18 H, Menthylprotonen), 1.87–2.15 (m, 2 H,  $\beta$ -H<sub>2</sub>), 2.34–2.36 (m, 2 H,  $\gamma$ -H<sub>2</sub>), 4.37–4.42 (m, 1 H,  $\alpha$ -H), 4.52–4.63 (dt, 1 H, Menthyl-Methinproton), 7.53/7.56–7.81/7.85 (AA'BB'-System, 4 H, *p*-Phenylen), 8.46 (d, 1 H, 7.6 Hz, NH-Amid-Glu), 9.89 (s, 1 H, O–CO–NH). — UV (1 N NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 258 nm (31930). — MS (NI-FAB):  $m/z$  = 447 [M – H]<sup>–</sup>.

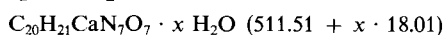
**[5,10-Metheno-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure]<sup>+</sup>Cl<sup>–</sup>, [N-(4-{[(2-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroxy-5,10-metheno-6-pteridyl)methyl]amino}benzoyl)-L-glutaminsäure]<sup>+</sup>Cl<sup>–</sup> (2e, 3e):** Die Abspaltung der Menthylloxycarbonyl-Gruppe an N-5 von 2b bzw. 3b erfolgt in einer stark sauren Lösung unter Formylierung nach



Lit.<sup>[22,23,45]</sup> Gelbes Pulver. Umkristallisation aus Ethanol/Wasser, Ausb. 44–48% (ohne Berücksichtigung des Salzsäure- und Wassergehalts). – IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3500–2100  $\text{cm}^{-1}$  (Säure), 1750–1490 (C=O, C=N und C=C), 1230 (C–O), 740 (Phenylen). –  $^1\text{H}$ -NMR ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{TMS}$ ):  $\delta$  = 1.91–2.18 (m, 2H,  $\beta\text{-H}_2$ ), 2.36–2.38 (m, 2H,  $\gamma\text{-H}_2$ ), 3.50–3.59 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 3.87–3.91 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 4.18–4.27 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 4.37–4.46 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 4.55–4.64 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 4.66–4.76 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 4.80 (Wasser), 6.78 (breit, 3H,  $\text{NH}_2$ ), 7.50/7.53–7.96/8.02 (AA'BB'-System, 4H, *p*-Phenylen), 7.70 (breit, 1H, 8-H), 8.68 (d, 1H,  $J$  = 7.7 Hz, NH-Amid-Glu), 9.66 (s, 1H, [5-CH=N-10] $^+$ ), 10.91 (breit, 1H, N-3-H-Amid). – UV (1 M HCl):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 287.0 nm (10800), 347 (24900). – MS (PI-FAB):  $m/z$  = 456 [ $\text{M}^+$ ].



Ca-Salz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (Leucovorin), Ca-Salz der N-(4-{[(2-Amino-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroxy-6-pteridyl)methyl]amino}benzoyl]-L-glutaminsäure (2f, 3f): In kleinen Portionen werden 1.75 g (3.55 mmol) 2e bzw. 3e langsam in 40 ml heißem Phosphat-Neutralpuffer unter Zugabe weniger Tropfen 2 N NaOH gelöst, so daß ein pH von 7 nicht überschritten wird. Die klare gelbe Lösung wird nun 5 h unter Luftausschluß unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird mit 2 N NaOH auf pH 8 eingestellt. Jetzt rührt man 2.2 ml (8.8 mmol) 4 M Calciumchlorid-Lösung zu und fällt dann das Salz der Folin-säure mit 30 ml Ethanol aus. Das cremefarbene Produkt kann nun abzentrifugiert werden. Der Rückstand wird zweimal mit wäßrigem Ethanol (1:1) aufgeschlämmt, zentrifugiert und dann in trockenem Ethanol zur Wasserverdrängung gewaschen. Nach Abritzen über eine GIII-Filterfritte trocknet man das Pulver, das noch anorganische Salze enthält, im Ölpumpenvak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Cremebeiges Pulver, Umkristallisation aus Ethanol/Wasser, Ausb. 45–49% (ohne Berücksichtigung des Wassergehalts). –  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ ):  $\delta$  = 1.86–2.12 (m, 2H,  $\beta\text{-H}_2$ ), 2.21–2.23 (m, 2H,  $\gamma\text{-H}_2$ ), 3.06–3.45 (m, 4H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 4.18–4.23 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$ ), 4.84 (m, 1H, 7- $\text{H}_2$ , 6-H, 9- $\text{H}_2$ ), 6.65/6.71–7.55/7.65 (AA'BB'-System, 4H, *p*-Phenylen), 7.76, 8.60 (s, 1H, 5-Formyl-Konformere I und II). – UV (0.1 N NaOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 283.0 nm (28760). – MS (NI-FAB):  $m/z$  = 472 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^+$ .



- [1] 66. Mitteilung: J. M. Brown, H. Brunner, W. Leitner, M. Rose, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, 331.  
 [2] R. L. Blakley in *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines* (Eds.: A. Neuberger, E. L. Tatum), Bd. 13, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, **1969**.  
 [3] J. D. Cichowicz, S. George, B. Shane, *Biochemistry* **1987**, 26, 522.  
 [4] J. D. Cook, J. D. Cichowicz, S. George, A. Lawler, B. Shane, *Biochemistry* **1987**, 26, 530.  
 [5] G. H. Hitchings, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 903; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 879.  
 [6] D. R. Seeger, D. B. Cosulich, J. M. Smith, M. E. Hultquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 1753.  
 [7] J. M. Blaney, C. Hansch, C. Silipo, A. Vittoria, *Chem. Rev.* **1984**, 84, 333.  
 [8] L. H. Matherly, C. K. Barlowe, V. M. Phillips, I. D. Goldman, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 710.  
 [9] B. A. Kamen, R. A. Nylen, J. R. Bertino, *Brit. J. Haematol.* **1981**, 49, 355.  
 [10] B. A. Kamen, J. E. Molder, L. E. Kun, B. L. Fish, B. J. Ring, *Cancer Res.* **1984**, 44, 5092.  
 [11] U. Loenn, S. Loenn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 138, 54.  
 [12] G. Jansen, *Cancer Res.* **1989**, 49, 1959.  
 [13] C. J. Temple, J. D. Rose, W. R. Laster, J. A. Montgomery, *Cancer Treat. Rep.* **1981**, 65, 1117.

- [14] A. Goldin, E. M. Greenspan, E. B. Schoenbach, *J. Nat. Cancer Inst.* **1952**, 12, 987.  
 [15] A. Goldin, N. Mantel, S. W. Greenhouse, *Cancer Res.* **1953**, 13, 843.  
 [16] F. M. Sirotak, F. A. Schmid, J. I. DeGraw, *Cancer Res.* **1989**, 49, 2890.  
 [17] S. Kewar, A. Sloboda (American Cyanamid Co.), U. S. Patent, US 4746662, **1989**; *Chem. Abstr.* **1989**, 110, P 513 305a.  
 [18] W. Pfeleiderer in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Eds.: A. J. Boulton, A. McKillop), Bd. 3 (2B), Pergamon Press, Oxford, **1984**, S. 305.  
 [19] M. May, T. J. Barger, M. Lansford, J. M. Ravel, G. L. Sutherland, W. Shive, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 3067.  
 [20] B. Roth, M. E. Hultquist, M. J. Fahrenbach, E. L. R. Stokstad, D. B. Cosulich, H. P. Broquist, R. P. Parker, J. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3247.  
 [21] A. Bobst, M. Viscontini, *Helv. Chim. Acta* **1966**, 49, 875.  
 [22] L. Rees, C. J. Suckling, H. C. S. Wood, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 470.  
 [23] L. Rees, C. J. Suckling, H. C. S. Wood (University of Strathclyde), U. K. Pat. Appl. 8 621 268, Eur. Pat. Appl. EP 0 266 042, **1986**, *Chem. Abstr.* **1988**, 109, P 93 606j.  
 [24] G. K. Smith, P. A. Benkovic, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1981**, 20, 4034.  
 [25] R. P. Leary, Y. Gaumont, R. L. Kisliuk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, 56, 484.  
 [26] V. F. Scott, K. O. Donaldson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, 14, 523.  
 [27] J. A. Straw, J. M. Corey, D. Szapary, *Cancer Res.* **1981**, 41, 3936.  
 [28] J. A. Straw, W. T. Wynn, D. Szapary, *Cancer Res.* **1984**, 44, 3114.  
 [29] R. Bertrand, J. Jolivet, *J. Nat. Cancer Inst.* **1989**, 81, 1175.  
 [30] J. Feeney, B. Birdsall, J. P. Albrand, G. C. K. Roberts, A. S. Burgen, P. A. Charlton, S. W. Young, *Biochemistry* **1981**, 20, 1837.  
 [31] C. K. Mathews, F. M. Huennekens, *J. Biol. Chem.* **1969**, 235, 3304.  
 [32] D. B. Cosulich, B. Roth, M. E. Hultquist, R. P. Parker, J. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3552.  
 [33] D. B. Cosulich, J. M. Smith, H. P. Broquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4215.  
 [34] D. B. Cosulich, J. M. Smith, H. P. Broquist (American Cyanamid Co.), U. S. Patent A 2 688 018, **1954**; *Chem. Abstr.* **1955**, 49, P 11 727 d.  
 [35] H. R. Mueller, M. Ulmann, J. Conti, G. Muerdel (Eprova A.-G.), PTC Int. Appl. WO 8808 844, **1988**; *Chem. Abstr.* **1989**, 111, P 102 722 q.  
 [36] L. Rees, *Tetrahedron* **1986**, 42, 117.  
 [37] T. Uwajima, T. Oshiro, T. Eguchi, Y. Kuge, A. Horiguchi, A. Igarashi, K. Mochida, M. Iwakura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 171, 684.  
 [38] T. Eguchi, T. Oshiro, Y. Kuge, K. Mochida, T. Uwajima (Kyowa Hakko Kogyo Co.), Eur. Pat. Appl. EP 350 934, **1990**; JP Appl. 88/216 045, **1988**; *Chem. Abstr.* **1990**, 112, P 234 008 s.  
 [39] S. Anatoulas, M. Viscontini in *Unconjugated Pterines and Related Biogenic Amines* (Ed.: H. C. Curtius), de Gruyter Verlag, Berlin, **1987**, S. 7.  
 [40] P. H. Boyle, M. F. Kelly, *Tetrahedron* **1988**, 44, 5179.  
 [41] P. H. Boyle, M. T. Keating, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 375.  
 [42] W. Pfeleiderer, R. Mengel, *Chem. Ber.* **1971**, 104, 2293.  
 [43] B. L. O'Dell, J. M. Vandenberg, E. S. Bloom, J. J. Piffner, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 250.  
 [44] D. B. Cosulich, D. R. Seeger, M. J. Fahrenbach, D. Roth, J. H. Mowat, J. M. Smith, M. E. Hultquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2254.  
 [45] C. Temple, R. D. Elliot, J. D. Rose, J. A. Montgomery, *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 731.  
 [46] C. Huber, Dissertation, Universität Regensburg, **1991**.  
 [47] H. Brunner, E. Bielmeier, *J. Organomet. Chem.* **1990**, 384, 223.  
 [48] M. D. Fryzuk, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 5491.  
 [49] H. B. Kagan, T. P. Dang, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6429.  
 [50] H. Brunner, W. Pieronczyk, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 655; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, 18, 620.  
 [51] K. Achiwa, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 8265.  
 [52] H. Takaya, K. Mashima, K. Koyano, M. Yagi, H. Kumobayashi, T. Taketomi, S. Akutagawa, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 629.



- <sup>[53]</sup> R. Selke, H. Pracejus, *J. Mol. Catal.* **1986**, 37, 213.  
<sup>[54]</sup> H. Brunner, H.-J. Lautenschlager, *Synthesis* **1989**, 706.  
<sup>[55]</sup> J. Bakos, I. Toth, B. Heil, L. Marko, *J. Organomet. Chem.* **1985**, 279, 23.  
<sup>[56]</sup> H. Brunner, H. Leyerer, *J. Organomet. Chem.* **1987**, 334, 369.  
<sup>[57]</sup> J. D. Morrison, W. F. Masler, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 270.

[63/92]

## CAS-Registry-Nummern

**1**: 59-30-3 / **2a**: 71963-69-4 / **2b**: 111482-05-4 / **2d**: 142131-69-9 /  
**2e**: 65981-90-0 / **2f**: 80433-71-2 / **3a**: 74708-38-6 / **3b**: 111612-  
17-0 / **3d**: 142186-43-4 / **3e**: 115940-57-3 / **3f**: 115940-48-2 / (–)-  
DIOP: 32305-98-9 / (+)-NORPHOS: 71042-54-1 / [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub>:  
12092-47-6 / (–)-Chlorameisensäure-menthylester: 14602-86-9 / 10-(Men-  
thyloxycarbonyl)folsäure: 142131-70-2 / *N*-(4-[Menthylloxycarbo-  
nyl]amino)benzoyl}-L-glutaminsäure: 142131-71-3