

109. Zur Herstellung von PQQ in kg-Mengen

von Pierre Martin*, Eginhard Steiner, Kurt Auer und Tammo Winkler

Zentrale Forschungslaboratorien, Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel

(12. III. 93)

Preparation of PQQ in the kg Scale

The improvement of the PQQ synthesis according to the method of *Corey* and *Tramontano* allows the preparation of the triester of this cofactor in the kg scale with an overall yield of 13% (average 78% per step), without a bottleneck in the sequence and with crystalline, analytically pure intermediates. The new purification of free PQQ from conc. H₂SO₄ is remarkable with respect to the application as well as to the stability of this natural product.

Einleitung. – PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone, 4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1*H*-pyrrolo[2,3-*f*]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure; **11**) ist ein organischer Redox-Cofaktor in verschiedenen bakteriellen Dehydrogenasen (sog. Chinoproteine) [1]. PQQ stimuliert das Wachstum von Bakterien [2] und soll auch beim Säuger Vitamin-Eigenschaften besitzen [3]. Ferner hemmt PQQ die Aldose-Reduktase [4] und 'Reverse'-Transkriptasen (inkl. HIV-1) [5].

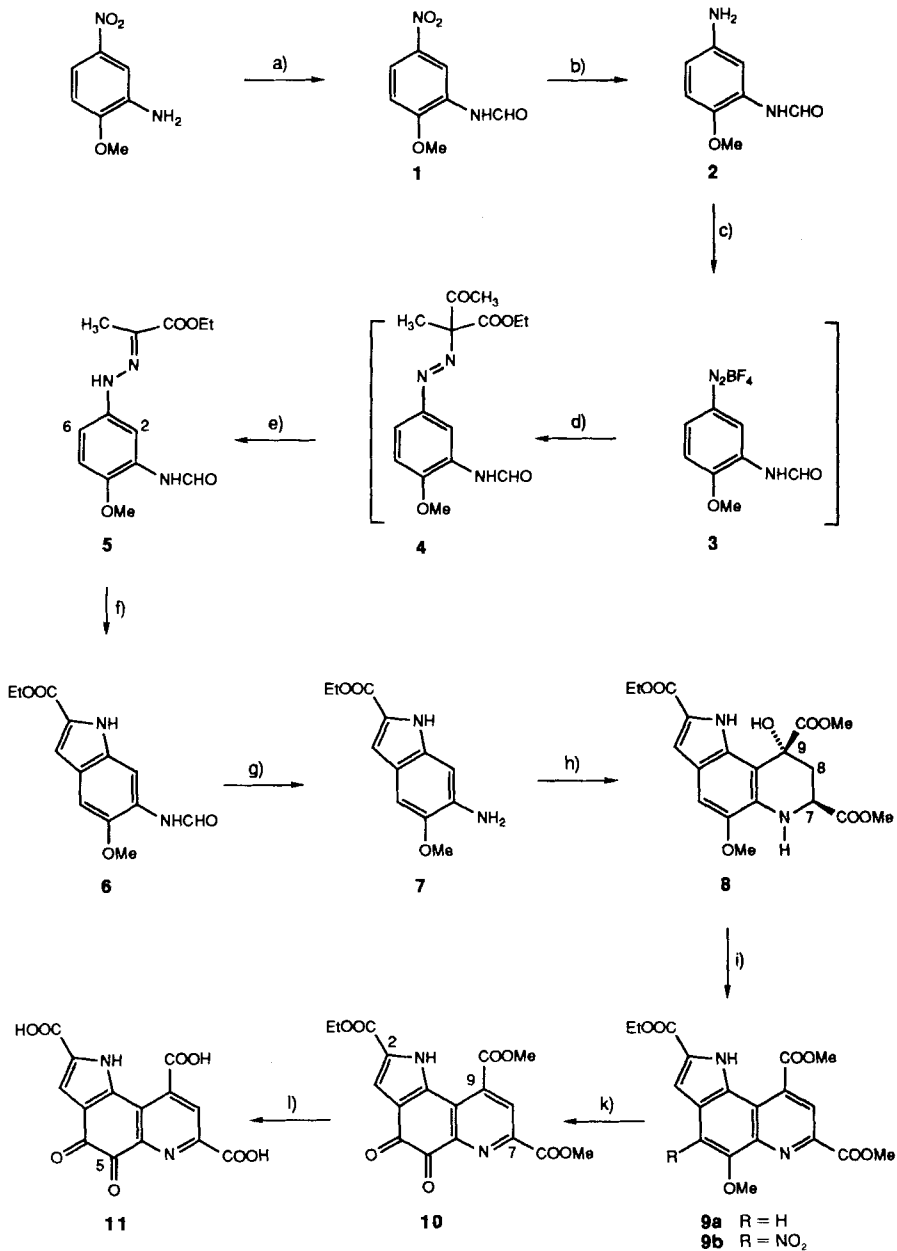
PQQ ist ein zur Zeit schwer zugänglicher bzw. extrem teurer Naturstoff. Für die Derivatisierung von PQQ, für die Fixierung von PQQ an Polymeren (als Katalysator für Redox-Reaktionen und für die Affinitätschromatographie von Chinoproteinen) sowie für den Einbau von PQQ in Elektroden (Biosensoren) sind grössere Mengen dieses Cofaktors nötig.

Wie in [6] dargestellt wird, eignet sich unsere neue Synthese für PQQ nicht für die Erweiterung in einen halbtechnischen Massstab. Da die PQQ-Synthese nach *Corey* und *Tramontano* [7] nach unseren Erfahrungen im 50-mg-Bereich gut realisierbar war, entschlossen wir uns, diese Sequenz auf die Erweiterung in den kg-Bereich hin zu überprüfen. Dazu mussten in den Schlüsselschritten starke Modifizierungen vorgenommen werden, welche eine erneute Beschreibung der Herstellung dieses interessanten Naturstoffes rechtfertigt.

Synthesen. – Die *N*-Formylierung von 2-Methoxy-5-nitroanilin mit HCOOH/Ac₂O bei Raumtemperatur kann hoch konzentriert (15 kg/25 l) durchgeführt werden und liefert nach dem Ausrühren mit H₂O gut filtrierbares, analysenreines **1** (als Rotamerengemisch) in 92% Ausbeute (*Schema*). Die katalytische Reduktion der NO₂-Gruppe mit Pd/C muss der Schwerlöslichkeit von **1** wegen in DMF durchgeführt werden, andernfalls sinken die Ausbeuten drastisch ab. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels und Digerieren des Rückstandes mit MeOH erhält man reines **2** (80%).

Der erste Schlüsselschritt dieser PQQ-Synthese ist die *Japp-Klingemann*-Reaktion der Diazo-Verbindung **3** (Kupplung mit 2-Methylacetessigester und anschliessender

Schema



a) Ac₂O, HCOOH, 35°. b) H₂, Pd/C, DMF, 35°, 2 bar. c) 1. EtOH, HCl, NaNO₂; 2. HBF₄, EtOH. d) Ethyl-2-methylacetoacetat, NaOAc, EtOH. e) pH 6,5-pH 5,2. f) HCOOH, 80°. g) HCl, Aceton, 80°. h) 2-Oxoglutaconsäure-dimethylester, CH₂Cl₂. i) Cu(OAc)₂, CH₂Cl₂, HCl_g/Luft. k) Cer(IV)-ammonium-nitrat, H₂O, MeCN. l) 1. LiOH, H₂O, THF; 2. H₂SO₄.

Keto-Spaltung in alkalischem Milieu). Die Eintopf-Reaktion ergibt bereits bei 10-g-Ansätzen gummiartige, kaum rührbare Reaktionsgemische, in denen das gewünschte Hydrazon **5** als (*E/Z*)-Gemisch mit jeweils 2 Rotameren (*N*-Formyl-Gruppe) vorliegt, was eine aufwendige chromatographische Reinigung nötig machte. Eine wesentliche Verbesserung kann dadurch erreicht werden, dass das Diazonium-Salz **3** mit HBF_4 in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ gefällt wird, und sowohl die anschliessende Kupplung als auch die Keto-Spaltung in neutralem bis schwach saurem Bereich (pH anfänglich 6,5, am Schluss 5,2) durchgeführt wird. Dabei fällt nur das rote (*E*)-Isomere **5** in reiner Form aus, was die Reinigung wesentlich erleichtert. Nach dem Aufschlännen in EtOH erhält man in 70% Ausbeute analysenreines **5**. Sowohl im alkalischen als auch im stark sauren Milieu liegt das Hydrazon **5** als (*E/Z*)-Gemisch vor, aus dem das goldgelbe, H-verbrückte (*Z*)-Isomere isoliert werden kann (vgl. *Exper. Teil*).

Die anschliessende Indol-Synthese nach *Fischer* wird als 1M-Suspension in HCOOH durchgeführt. Nach Verdünnen mit EtOH kann das gewünschte der beiden gebildeten Indole in 62% Ausbeute rein abfiltriert werden. Das zu **6** isomere Indol (Ringschluss an C(2)) bleibt in der Mutterlauge zurück und kann daraus chromatographisch abgetrennt werden (vgl. *Exper. Teil*). Die Deformylierung von **6** wird, wie in [7] beschrieben, in kochendem Aceton/konz. HCl durchgeführt. Nach Neutralisation mit NaOH und längerem Ausrühren auf H_2O wird in 85% das reine, freie Amino-indol **7** erhalten.

Die Umsetzung von **7** und überschüssigem 2-Oxoglutaconsäure-dimethylester in CH_2Cl_2 in der Art einer *Döbner-von Miller*-Reaktion wurde derart geführt, dass das gebildete Annelierungsprodukt **8** ständig ausfällt. Nach dem Nachwaschen mit Petroläther erhielten wir in 73% Ausbeute analysenreines **8**, in dem die beiden COOMe-Gruppen *cis* zueinander stehen¹⁾. Für die anschliessende Aromatisierung (H_2O -Abspaltung und Oxidation) wird **8** in CH_2Cl_2 gelöst und in Gegenwart von $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ mit einem Strom von gasförmigem HCl und viel Luft behandelt. Dabei fällt das gebildete Pyrrolo-chinolin **9a** aus. Ebenfalls ungelöste Cu-Salze werden mit NaHCO_3 -Lösung ausgewaschen. Nach Aufschlännen in kaltem Et_2O gewinnt man **9a** als gelbe, analysenreine Kristalle (95% Ausbeute). Das intermediär gebildete (nach H_2O -Abspaltung) 8,9-Dihydrochinolin-Derivat konnte nicht beobachtet werden²⁾.

Die Oxidation von **9a** mit Cer(IV)-ammonium-nitrat in kaltem $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ erfolgt rasch; neben dem Chinon **10** (70% Ausbeute) wird dabei auch zu ca. 10% das 4-Nitro-Derivat **9b** gebildet³⁾, das sich seiner Schwerlöslichkeit wegen leicht abtrennen lässt. Die wässrigen Cer-haltigen Phasen werden nach dem Aufkonzentrieren elektrochemisch oxidiert und die anfallenden Ce^{IV} -Salze zur Wiederverwendung in die obige Oxidation eingesetzt. Der Triester von **PQQ** (**10**) ist in fester Form stabil und bei Raumtemperatur über Jahre lagerfähig. Es empfiehlt sich, **PQQ** in dieser Form aufzubewahren und daraus die Tricarbonsäure jeweils frisch herzustellen.

Wird der in THF suspendierte Triester **10** mit $\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}$ versetzt, so tritt augenblicklich eine schwarze Lösung ein. Erfolgt die Aufarbeitung (Ansäuern) unmittelbar nach der

¹⁾ Beide COOMe-Gruppen stehen äquatorial, da einerseits $^3J(\text{H}-\text{C}(7), \text{H}-\text{C}(8)) = 10$ und 5 Hz und andererseits das Carbonyl-C-Atom des Esters an C(9) nach selektiver Entkopplung von den CH_3O -Protonen als *Singulett* im ^{13}C -NMR-Spektrum beobachtet wird, also keine *trans*-Kopplung zum axialen $\text{H}-\text{C}(8)$ aufweist.

²⁾ Wird **9a** über Pd/C hydriert, wird das entsprechende 6,9-Dihydro-Derivat erhalten.

³⁾ Die Nitrierung kann durch Einsatz von Cer(IV)-ammonium-sulfat vermieden werden.

Zugabe von LiOH, so wird die 2-Ethoxycarbonyl-7,9-dicarbonsäure gefasst⁴). Die Verseifung des letzten Esters (Ester-Gruppe an C(2)) benötigt mit LiOH bei Raumtemperatur 18 bis 24 h. Die Tricarbonsäure **11** (PQQ) wird nach unseren Erfahrungen am besten durch Ansäuern mit HCl in Gegenwart von Metall-Salzen als PQQ-Komplexe⁵) aus obigem Reaktionsgemisch ausgefällt.

Die so erhaltenen Komplexe werden in konz. H₂SO₄ (!) gelöst (bzw. freigesetzt). Durch Eintropfen dieser Lösung in H₂O wird mikrokristallines, nicht hydratisiertes, metallfreies PQQ von tief roter Farbe⁶) erhalten (im Mikroskop: undurchsichtige Nadeln).

Zusammenfassung. – Mit der vorliegenden Optimierung der PQQ-Synthese nach Corey und Tramontano [7] sind erstmals grössere Mengen an synthetischem PQQ (bzw. PQQ-Triester) zugänglich gemacht worden, welche für die breite Derivatisierung dieses Naturstoffes sowie für dessen Fixierung an Polymere (für Biosensoren, Affinitätschromatographie, Redox-Katalyse usw.) nötig sind. Die Totalausbeute von 13% (entsprechend 77% Ausbeute pro Stufe), das kristalline, analysenreine Anfallen aller Zwischenprodukte (ohne chromatographische Reinigung) und die einfachen Reagenzien und Reaktionsbedingungen sollten die Herstellung von PQQ-Triester auch im halbertechnischen Massstab ermöglichen.

Die neue Reinigung von PQQ aus konz. H₂SO₄ ist sowohl für die Praxis als auch im Hinblick auf die Stabilität dieses 'frühbiotischen' Cofaktors bemerkenswert⁷).

Herrn Dr. J. Bersier danken wir für die elektrochemische Rückoxidation von Ce^{II}-Salz-Lösungen.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Vgl. [9].

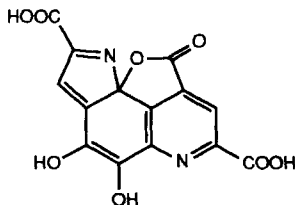
2-Methoxy-5-nitroformanilid (**1**). In einem 30-l-Email-Kessel mit Sole-Kühlung werden 12,5 l Ac₂O vorgelegt. Unter Köhlen werden 12,5 l HCOOH (98–100%, *p. A.*) derart zulaufen gelassen, dass die Temp. 35° nicht übersteigt (*ca.* 1 h). Anschliessend werden portionenweise 15,0 kg (89,2 mol) 2-Methoxy-5-nitroanilin derart eingetragen, dass die Innentemp. 35° nicht übersteigt (*ca.* 2,75 h). Die dicke, jedoch noch rührbare Suspension wird 20 h bei RT. weitergerührt, dann abgenutscht. Das gut abgepresste Filtergut wird in 100 l H₂O eingetragen und 18 h ausgerührt. Nach erneuter Filtration wird mit *ca.* 150 l H₂O neutral gewaschen und der Rückstand i. V. bei 70–80° getrocknet: 16,19 kg (92,5%) analysenreines **1**. Schmp. 192–195° ([7]: 197–198°). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) des

⁴) Der 2,9-Diester von PQQ kann nur *via* saure Hydrolyse von **10** erhalten werden.

⁵) Als besonders geeignet erwies sich der schwerlösliche Cäsium-Komplex (vgl. *Exper. Teil*).

⁶) An C(5) hydratisiertes PQQ besitzt eine backsteinrote Farbe (im Mikroskop durchsichtige Plättchen).

⁷) Nach [8] soll PQQ im sauren Milieu als 5Ring-Lacton (zwischen 9-Carbonsäure und C(1a), d. h. Addition der 9-Carbonsäure an die *p*-Chinonimin-Form des PQQ's vorliegen. Das ¹³C-NMR von PQQ in konz. D₂SO₄ zeigt jedoch kein sp³-hybridisiertes C-Atom (vgl. *Exper. Teil*).



Hauptrotameren: 4,06 (*s*, CH₃); 6,97 (*d*, *J* = 10, H–C(3)); 7,83 (*br. s*, NH); 8,05 (*dd*, *J* = 3, 10, H–C(4)); 8,52 (*d*, *J* = 3, H–C(6)); 9,28 (*d*, *J* = 3, CH=O).

5-Amino-2-methoxyformanilid (2). In einem 50-l-Druckautoklaven werden 4,171 kg (21,26 mol) 1 in 27,7 l DMF über 190 g Pd/C (5%) bei 2 bar und 35° hydriert. Nach 3 h kommt die Hydrierung zum Stillstand (H₂-Aufnahme: 98%). Das Hydrier-Gemisch wird abfiltriert und der Kat. 2mal mit 2 l DMF ausgewaschen. Das Filtrat wird i.V. eingedampft. Der braune Rückstand wird mit 2 l kaltem MeOH (0–5°) digeriert. Nach dem Abnutschen wird der Filterkuchen mit 2 l Et₂O gewaschen und bei 50° i.V. getrocknet: 2,854 kg (80,5%) analysenreines 2. Schmp. 145–146° ([7]: 146–148°). ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 3,70 (*s*, CH₃); 4,70 (*br. s*, NH₂); 6,28 (*dd*, *J* = 3, 10, H–C(4)); 6,74 (*d*, *J* = 10, H–C(3)); 7,58 (*d*, *J* = 3, H–C(6)); 8,26, 9,42 (*2d*, *J* = 2, CH=O, NH).

2-{[3-(Formylamino)-4-methoxyphenyl]hydrazono}propansäure-ethylester (5). In einem offenen Becher-Glas werden unter Kühlen 1,8 l HCl (32%) vorgelegt und 997 g (6 mol) 2 derart eingetragen, dass –20° nicht überschritten werden (Zugabezeit *ca.* 1 h). Die Becher-Wand wird mit 220 ml EtOH gespült und es wird 30 min bei –20° weitergerührt, bevor 1,16 l NaNO₂-Lsg. (40%) derart zugetropft werden, dass die Temp. von –20° bis –15° eingehalten werden kann (Tropfzeit *ca.* 3 h). Die dicke Suspension wird mit 3,15 l EtOH verdünnt und 30 min weitergerührt. Dann wird 1 l HBF₄ (50%) in 3 Portionen zugegeben (Innentemp. bis –3°) und unter weiterem Rühren (30 min) nach und nach mit 2 l EtOH verdünnt. Die Innentemp. lässt man in dieser Zeit langsam auf 7° kommen. Die goldgelbe Suspension wird abfiltriert und mit 4 Portionen à 500 ml eiskaltem EtOH gewaschen. Der noch feuchte Filterkuchen wird mit 5,5 l EtOH in einem 20-l-Planschliff-Kolben bei –5° vorgelegt und dazu wird ein vorbereitetes, auf 3° gekühltes Gemisch aus 852 g (6 mol) Ethyl-2-methylacetoacetat, 1632 g NaOAc und 4,8 l H₂O innert 3 min zulaufen gelassen. Die gelbe Suspension (pH 6,5) wird 66 h bei RT. weitergerührt, wobei der pH langsam auf pH 5,2 absinkt und das anfängliche Volumen von 12 l auf 7 l abnimmt, was durch ein konstantes Überblasen mit N₂ erreicht wird. Die jetzt gut filtrierbare Suspension wird abgenutscht, dann der Reihe nach mit 2 l 10% EtOH und mit 15 l H₂O gewaschen. Nach dem Auspressen des Filterkuchens wird dieser mit 2 l eiskaltem EtOH aufgeschlämmt und erneut filtriert. Der Rückstand wird i.V. bei 70° getrocknet: 1,165 kg (69,5%) 5 als ziegelrote Kristalle. Schmp. 146°. ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 1,26 (*t*, *J* = 7,5, CH₃); 2,03 (*s*, CH₃); 3,78 (*s*, CH₃); 4,16 (*q*, *J* = 7,5, CH₂); 6,98 (*br. s*, H–C(5), H–C(2)); 8,24 (*br. s*, H–C(6)); 8,34 (*br. s*, CH=O); 9,60 (*br. s*, NH); 9,78 (*br. s*, NH). MS: 279 (*M*⁺).

Das goldgelbe, zu 5 isomere Hydrason⁸) (Rotamerenverhältnis 35:65), Schmp. 158–159°, zeigt im ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) die folgenden typischen Signale (Rotamerenverhältnis *r/r'* = 65:35): 1,39 (*t*, CH₃); 1,41 (*t*, CH₃); 2,15 (*s*, CH₃); 2,17 (*s*, CH₃); 3,83 (*s*, CH₃); 3,85 (*s*, CH₃); 4,28 (*q*, CH₂); 4,30 (*q*, CH₂); 6,83 (*m*, H–C(5), H–C'(5), H–C'(6)); 6,95 (*dd*, *J* = 3, 9, H–C(6)); 7,19 (*d*, *J* = 3, H–C'(2)); 7,50 (*d*, *J* = 11,5, N'HCH=O); 7,62 (*br. s*, NHCH=O); 8,21 (*d*, *J* = 3, H–C(2)); 8,48 (*d*, *J* = 2, CH=O); 8,80 (*d*, *J* = 11,5, C'H=O); 11,97 (*br. s*, NH); 12,04 (*br. s*, N'H). MS: 279 (*M*⁺).

6-(Formylamino)-5-methoxyindol-2-carbonsäure-ethylester (6). In einem 65-l-Email-Kessel werden 17,6 l HCOOH vorgelegt und 4,924 kg (17,6 mol) 5 eingetragen. Die Suspension wird 14 h bei 80° gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT. werden 8,8 l EtOH zulaufen gelassen, 30 min nachgerührt und dann auf 0° abgekühlt. Nach 2 h wird abgenutscht und der abgepresste Filterkuchen mit total 8 l eiskaltem EtOH nachgewaschen. Der Rückstand wird i.V. bei 85° getrocknet: 2,869 kg (62,2%) analysenreines 6. Schmp. 227–229°. ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 1,34 (*t*, *J* = 7,5, CH₃); 3,87 (*s*, CH₃); 4,28 (*q*, *J* = 7,5, CH₂); 7,04 (*d*, *J* = 1,5, H–C(3)); 7,16 (*s*, H–C(4)); 8,42 (*d*, *J* = 2, CH=O); 8,48 (*s*, H–C(7)); 9,74 (*br. s*, NH); 11,72 (*br. s*, NH). MS: 262 (*M*⁺).

Aus der Mutterlauge kann mit 3% Ausbeute das isomere Indol, *4-(Formylamino)-5-methoxyindol-2-carbonsäure-ethylester*, Schmp. 232–233°, chromatographisch (Kieselgel CH₂Cl₂/AcOEt 4:1) abgetrennt werden, welches die folgenden Signale im ¹H-NMR aufweist (250 MHz, (D₆)DMSO): 3,79 (*s*, CH₃); 7,22 (*AB*, *J* = 10, H–C(6), H–C(7)); 8,32 (*d*, *J* = 1,5, H–C(3)); 8,48 (*d*, *J* = 12, CH=O); 9,66 (*d*, *J* = 12, NH); 11,75 (*br. s*, NH). MS: 262 (*M*⁺).

6-Amino-5-methoxyindol-2-carbonsäure-ethylester (7). Im 60-l-Email-Kessel werden 40 l Aceton und 4 l HCl (18%) vorgelegt. Dazu werden 1,568 kg (6,7 mol) 6 zugegeben. Die Suspension wird 4 h unter Rühren unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen auf 0° wird der Niederschlag abgenutscht und im offenen 20-l-Gefäß mit 9 l NaOH (1,5*N*) 30 min verrührt. Nach erneuter Filtration wird der Filterkuchen mit 12 l Eiswasser neutral gewaschen und i.V. bei 60° getrocknet: 1,325 kg (84,5%) analysenreines 7. Schmp. 165°. ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃ + 2 Tropfen (D₆)DMSO): 1,33 (*t*, *J* = 7, CH₃); 3,83 (*s*, CH₃); 4,13 (*br. s*, NH₂); 4,34 (*q*, *J* = 7, CH₂); 6,70, 6,83 (*2s*, H–C(4), H–C(7)); 6,92 (*d*, *J* = 2, H–C(3)); 10,2 (*br. s*, NH). MS: 234 (*M*⁺).

⁸) In sauren Lösungen gehen die Isomeren rasch ineinander über.

cis-6,7,8,9-Tetrahydro-9-hydroxy-5-methoxy-1H-pyrrolol[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (**8**). Im 30-l-Email-Kessel werden 1,614 kg (6,89 mol) **7** in 10 l CH₂Cl₂ suspendiert und unter Rühren 1,304 kg (7,6 mol) 2-Oxoglutaconsäure-dimethylester, gelöst in 6 l CH₂Cl₂, zulaufen gelassen. Das Gemisch wird 8 h bei RT. gerührt und anschliessend auf ¼ des Volumens eingedampft. Die beige Suspension wird auf 15° abgekühlt und abgenutscht. Der Rückstand wird mit 1,5 l Petrolether/CH₂Cl₂ 5:1 gewaschen und i.V. bei 50° getrocknet: 2,042 kg (73%) analysenreines **8**. Schmp. 183–184°. ¹H-NMR (300 MHz, (D₆)DMSO): 1,33 (*t*, *J* = 7, CH₃); 2,43 (*AB* von *ABX*, *J* = 5, 10, 14, 2 H–C(8)); 3,55 (*s*, CH₃); 3,70 (*s*, CH₃); 3,83 (*s*, CH₃); 4,12 (*X* von *ABX*, *J* = 1,5, 5, 10, H–C(7)); 4,22 (*q*, *J* = 7, CH₂); 5,68 (*d*, *J* = 1,5, NH); 6,60 (*s*, OH); 6,98 (*d*, *J* = 2,5, H–C(3)); 7,03 (*s*, H–C(4)); 9,30 (*d*, *J* = 2,5, H–N(3)). ¹³C-NMR ((D₆)DMSO): 174,9 (*q*, C(9)CO); 172,4 (*m*, C(7)CO); 161,0 (*t*, C(2)CO); 143,7 (*quint.*, C(5)); 134,2 (*dd*, C(6)); 130,9 (*td*, C(9b)); 123,6 (*dd*, C(2)); 117,9 (*dd*, C(3a)); 108,9 (*ddd*, C(3)); 103,0 (*C*(9a)); 101,4 (*d*, C(4)); 70,9 (*C*(9)); 60,1 (CH₂O); 55,8 (CH₃O); 52,6, 52,1 (je CH₃O, Ester); 50,3 (*dt*, C(7)); 36,9 (*td*, C(8)); 14,4 (CH₃). MS: 406 (*M*⁺).

5-Methoxy-1H-pyrrolol[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (**9a**). In einem 75-l-Email-Kessel werden 1,479 kg (3,64 mol) **8** in 63 l CH₂Cl₂ vorgelegt und unter Rühren 797,1 g Cu(OAc)₂·H₂O zugegeben. Unter starkem Rühren wird während 2 h ein Gas-Gemisch bestehend aus HCl-Gas/Luft 2:1 durchgeblasen (nach 1 h beginnen gelbe Kristalle auszufallen). In einer offenen 150-l-Rührstande werden 30 l einer ges. NaHCO₃-Lsg. vorgelegt und das Gemisch innert 15 min zugegeben. Gegen Ende der Zugabe fallen Cu-Salze aus, die abfiltriert werden. Nach Trennung der beiden Phasen wird die wässr. Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit H₂O gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird mit 6 l Et₂O 1 h ausgerührt, auf 10° abgekühlt, filtriert und mit 4 l eisgekühltem Et₂O nachgewaschen. Nach dem Trocknen i.V. bei 50° erhält man 1,33 kg (94,5%) **9a** als gelbe, analysenreine Kristalle. Schmp. 209–210°. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1,48 (*t*, *J* = 7,5, CH₃); 4,12 (*s*, CH₃); 4,15 (*s*, CH₃); 4,20 (*s*, CH₃); 4,47 (*q*, *J* = 7,5, CH₂); 7,30 (*d*, *J* = 2, H–C(3)); 7,35 (*s*, H–C(4)); 8,96 (*s*, H–C(8)); 12,25 (*br. s.*, NH). MS: 386 (*M*⁺), 371, 325.

4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolol[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (**10**). In einem 35-l-Email-Kessel mit Sole-Kühlung werden 500 g (1,3 mol) **9a** in 25 l MeCN vorgelegt. Unter Kühlen werden bei –5° 3,510 kg (6,5 mol) Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ in 5 l H₂O zugetropft (Tropfzeit 30 min). Dabei geht die anfänglich gelbe Suspension in eine orange Lsg. über. Nach 30 min Weiterrühren bei –3° wird die Lsg. unter schnellem Rühren in einer offenen 150-l-Rührstande auf 50 l H₂O gegossen. Nach 30 min Nachrühren wird der gebildete gelbe Niederschlag abfiltriert (53 g). Das Filtrat wird in Portionen mit insgesamt 35 l CH₂Cl₂ extrahiert. Die Extrakte werden getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 576 g orange-rote Kristalle, welche in 800 ml Toluol/AcOEt 1:1 h ausgerührt werden. Nach erneuter Filtration werden die erhaltenen orangen Kristalle (383 g) in 15 l CH₂Cl₂ aufgeschlämmt, dann über eine Hyflo-Schicht abgenutscht. Das Filtrat wird mit 200 g Kieselgel versetzt und 1 h ausgerührt. Nach Filtration wird eingedampft: 347,0 g (69%) **10** als orange, analysenreine Kristalle. Schmp. 236–237°. ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 1,36 (*t*, *J* = 7,5, CH₃); 3,96 (*s*, CH₃); 4,05 (*s*, CH₃); 4,38 (*q*, *J* = 7,5, CH₂); 7,58 (*d*, *J* = 1,5, H–C(3)); 8,58 (*s*, H–C(8)); 12,5 (*br. s.*, NH). MS: 388, 386 (*M*⁺), 358, 300, 254.

Der gelbe Niederschlag (53 g), welcher beim Eingiessen des Reaktionsgemisches auf H₂O entstand, wurde mit H₂O nachgewaschen und bei 50° i.V. getrocknet: 29,2 g (9%) **9b** als gelbes Pulver. Schmp. 212–213°. ¹H-NMR (300 MHz, (D₆)DMSO): 1,40 (*t*, *J* = 7,5, CH₃); 4,05 (*s*, CH₃); 4,13 (*s*, CH₃); 4,26 (*s*, CH₃); 4,41 (*q*, *J* = 7,5, CH₂); 7,38 (*d*, *J* = 2, H–C(3)); 8,80 (*s*, H–C(8)); 12,60 (*br. s.*, NH). MS: 431 (*M*⁺), 401, 355, 295.

4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolol[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure (PQQ, **11**). Zur vorgelegten Suspension von 30,0 g (77,7 mmol) **10** in 300 ml THF werden 16,2 g (386 mmol) LiOH·H₂O in 720 ml H₂O getropft (Tropfdauer 45 min). Die schwarze Lsg. wird 20,5 h bei RT. weitergerührt und dann mit 13 ml HCl (konz.) sauer gestellt. Nach Zugabe von 2 g NaCl fällt aus der roten Lsg. ein Niederschlag aus, der abfiltriert und mit kaltem H₂O und mit MeCN gewaschen wird: 8,67 g rote Kristalle.

Die wässr. Mutterlauge wird mit 6 g CsCl verrührt. Die entstehende Suspension wird abfiltriert und mit MeCN nachgewaschen: 18,57 g rote Kristalle.

Die beiden Kristallisate werden zusammen in 410 ml H₂SO₄ (konz.) eingetragen und über eine Glasfritte in 1,75 l Eiswasser getropft. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit Eiswasser nachgewaschen und bei 60° i.V. getrocknet: 16,1 g (63%) tiefrotes, analysenreines **11**. Schmp. > 250°. ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 7,21 (*d*, *J* = 2, H–C(3)); 8,60 (*s*, H–C(8)); 13,25 (*br. s.*, NH). ¹³C-NMR (D₂SO₄)⁹⁾: 171,8, 171,4 (2*s*, C(4), C(5)); 164,4 (*s*, C(2)–COOH); 164,3 (*d*, C(9)–COOH); 158,6 (*d*, C(7)–COOH); 143,6, 139,8, 138,0 (3*s*, C(5a), C(7), C(9)); 136,6 (*d*, C(8)); 134,9 (*d*¹⁰, C(1a)); 131,5 (*d*, C(9a)); 128,6 (*d*¹⁰, C(2)); 125,3 (*d*¹⁰, C(3a)); 122,4 (*d*¹⁰, C(3)). MS (FD): 330 (*M*⁺).

⁹⁾ Referenz: externes Dioxan. ¹³C-NMR-Spektrum von **11** in (D₆)DMSO (vgl. z. B. [10]).

¹⁰⁾ Multiplizität im protonengekoppelten Spektrum; *s* nach Deuterierung von H–C(3).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. A. Duine, J. A. Jongejan, *Vitam. Horm.* **1989**, *45*, 223.
- [2] M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsukita, O. Adachi, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 699.
- [3] a) J. Killgore, C. Schmidt, L. Duick, N.R. Chapman, D. Trinkler, K. Reiser, M. Melko, D. Hyde, R. B. Rucker, *Science* **1989**, *245*, 850; b) C. Schmidt, F. Steinberg, R. B. Rucker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1991**, *197*, 19.
- [4] T. Urakami, M. Oda, C. Itoh, H. Kobayashi, T. Nagai, K. Sugamura, to *Mitsubishi Gas Chemical Comp.*, Eur. Pat. 429 333A1, 8.11.90.
- [5] Y. Narutomi, M. Katsumata, Y. Osawa, S. Uchikuga, to *Sogo Pharmaceutical Comp.*, Eur. Pat. 262 345, 6.8.87.
- [6] P. Martin, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 988.
- [7] E. J. Corey, A. J. Tramontano, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5599.
- [8] P. M. Gallop, E. Henson, M. A. Paz, S. L. Greenspan, R. Flückiger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *163*, 755.
- [9] P. Martin, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1554.
- [10] D. R. Houck, C. J. Unkefer, 'Proceedings of the First International Symposium on PQQ and Quinoproteins, Delft, 1988', Eds. J. A. Jongejan und J. A. Duine, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, 1989, S. 256.