

111. Derivatisierung von PQQ und PQQ-Triester für den Nachweis von PQQ¹⁾

von Pierre Martin* und Tammo Winkler

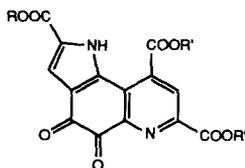
Zentrale Forschungslaboratorien, Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel

(24.III.93)

Formation of Derivatives of PQQ and PQQ-Triester for the Detection of PQQ

PQQ is an organic redox/cofactor found in a class of enzymes called quinoproteins. It has been reported that materials like milk, egg yolk, vinegar, beer, serum, urine, and biological tissues contain little amounts of **PQQ**. To facilitate studies on **PQQ**, a simple detection of **PQQ** could be extremely useful. For this purpose, we describe in this paper some adducts of **PQQ** or **PQQ**-triester with 1,2-diamines, 2,4-dihydroxyaniline, pyrrole, indole as well as an oxidation product of **PQQ**. UV and fluorimetric detections of these colored products show that this method is relatively sensitive. The reaction of **PQQ**-triester with $(\text{MeO})_3\text{P}$ to the phosphole adduct **13** is of great importance: the use of ^{32}P -labeled trialkyl phosphites will make this reaction an extremely sensitive method to detect **PQQ**.

Einleitung. – **PQQ** (Pyrrolo Quinoline Quinone, 4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1*H*-pyrrolo[2,3-*f*]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure; **1**), auch unter dem Namen Methoxatin bekannt, ist ein organischer Redox-Cofaktor in sogenannten Chinoproteinen [1] (vor allem in bakteriellen Dehydrogenasen wie Methanoldehydrogenase, Glukosedehydrogenase, *etc.*). Die Ansichten über das Vorkommen von **PQQ**-haltigen Enzymen in Pflanzen und Säugern sind kontrovers [2] [3]. Ebenfalls gehen die Meinungen über das Vorkommen und die Konzentration von **PQQ** in verschiedenen biologischen Mustern (wie Milch, Citrusfrüchten, Eier, Bier, Essig, Serum, Urin, Geweben, *etc.*) stark auseinander [4] [5]. **PQQ** ist ferner ein Wachstumsfaktor für verschiedene Bakterien [6] und soll eine Rolle im 'cross-linking' von Elastin und Collagen sowie in der Regulation des intrazellulären Spiegels von Spermin und Spermidin im Säuger spielen [7]. Ist **PQQ** ein neu entdecktes Vitamin [8] [9]; ein Hautverjüngungsmittel [10]?



1 (PQQ) R = R' = H

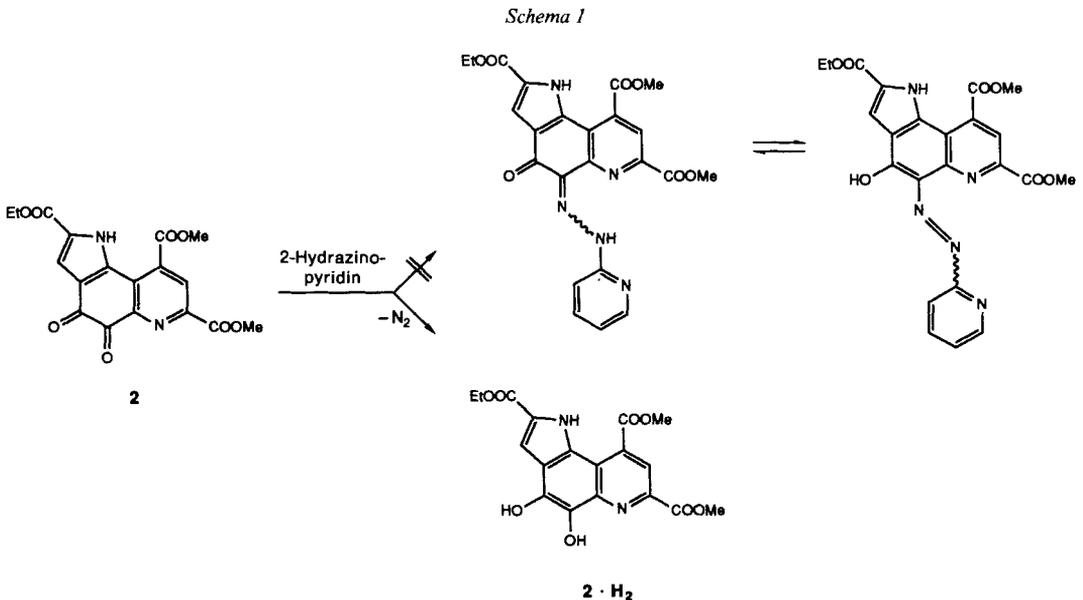
2 R = Et, R' = Me

¹⁾ Der Inhalt der vorliegenden Publikation war Teil einer Präsentation am '2nd International Symposium on PQQ and Quinoproteins', Nov. 19–22, 1991, Yamaguchi, Japan.

Verschiedene Methoden wurden für den Nachweis von **PQQ** entwickelt. Man glaubt sich in die alten Zeiten der frühen ‘Berichte’ versetzt, wenn man die jeweiligen Gegendarstellungen der verschiedenen Arbeitsgruppen liest (vgl. insbesondere [2] [3] [11]). Veröffentlichlich sind die folgenden Nachweismethoden für **PQQ**: HPLC mit Fluoreszenz-Detektion nach Reduktion von **PQQ** zum Dihydrodiol (**PQQH₂**) und anschließender Spaltung mit Periodat unter Öffnung des Chinons [12]; GC/MS-Detektion nach vollständiger Methylierung und gleichzeitiger Ring-Öffnung des Chinons mit (Phenyl)(trimethyl)-ammonium-hydroxid bei 150° [3a]; HPLC mit elektrochemischer Detektion [13]; colorimetrische Bestimmung mittels Redox-Zyklus (Oxidation von Glycin durch **PQQ**, Reoxidation von **PQQH₂** in Gegenwart von Nitroblautetrazol unter Formazan-Bildung [14], Hydrazon-Bildung mit nachträglichem HPLC/UV-Nachweis [15]); enzymatisch (z. B. mit dem Apoenzym der Glucosedehydrogenase [5] [16]) und mit einem Immuno-Assay mit polyklonalem Antikörper gegen **PQQ** [17].

Ohne hier auf die einzelnen Vor- und Nachteile einzugehen, ist eine gute neue Nachweis-Methode von **PQQ** bis in den unteren ppb-Bereich²⁾ (und möglichst darunter) nach wie vor nötig. Wir versuchten mittels einfacher Reagenzien Addukte mit **PQQ** (bzw. **PQQ**-Triester, der einfacher zu handhaben ist und dessen Addukte die gleichen spektroskopischen Eigenschaften wie diejenigen von **PQQ** aufweisen) zu bilden, die charakteristische UV- bzw. Fluoreszenz-Spektren aufweisen, stabil sein und möglichst quantitativ gebildet werden sollten.

Hydrazon-Bildung. – Normale Hydrazine (Dimethylhydrazin, Phenylhydrazine, Pyridylhydrazine, *etc.*) bilden entgegen Angaben in der Literatur (z. B. [18]) mit **PQQ**

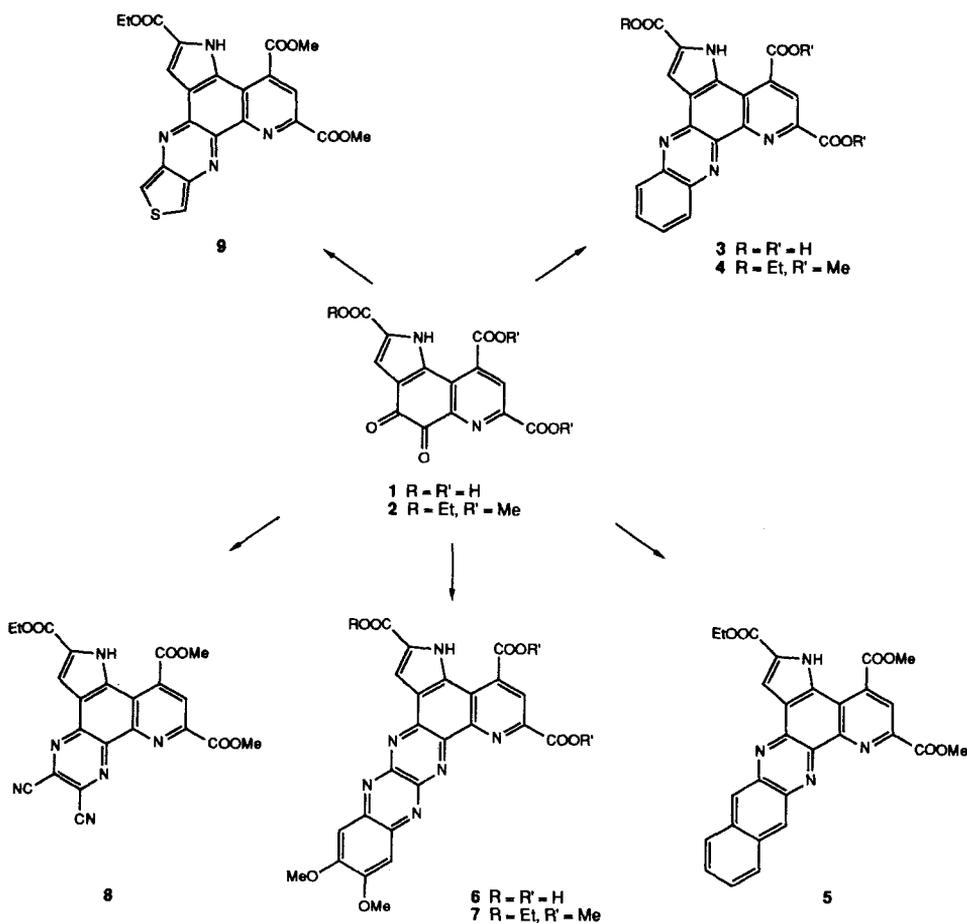


²⁾ Wir ziehen die im Lebensmittelgesetz und im Ökobereich übliche Einheit ppm, ppb *etc.* als Konzentrationsangabe im *Spurenbereich* der Angabe in nmol, pmol, *etc.* vor.

bzw. PQQ-Triester keine Hydrazone. So wird beispielsweise PQQ-Triester **2** mit 2-Hydrazinopyridin in hoher Ausbeute zum entsprechenden Hydrochinon (welches in festem Zustand stabil ist, in offenstehenden Lösungen jedoch rasch zum Chinon rückoxidiert) reduziert (vgl. *Schema 1*). Nur Hydrazine mit elektronenanziehenden Gruppen vermögen mit PQQ bzw. PQQ-Triester Hydrazone zu bilden [15]. Nachteilig für die Bestimmung von PQQ über die Hydrason-Bildung wirken sich die (*Z/E*)-Geometrie sowie die Isomerenbildung zu Azo-Formen aus. Deshalb sollten symmetrische oder eindeutig definierte Derivate angestrebt werden, z. B. Pyrazin-Derivate mit 1,2-Diaminen oder Oxazin-Derivate mit 2-Aminophenolen.

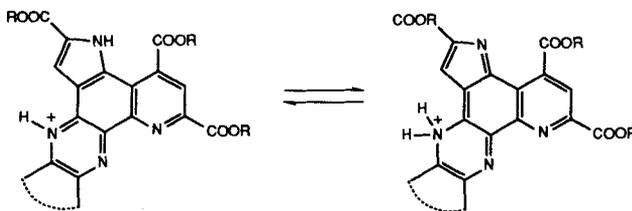
Pyrazin-Bildung. – PQQ bzw. PQQ-Triester wurde mit verschiedenen 1,2-Diaminen in hohen Ausbeuten zu den stabilen, gelb oder gelb-orange gefärbten Pyrazin-Derivaten **3–9** umgesetzt, und ihre (UV/Fluoreszenz)-Spektren wurden auf ihre analytische Tauglichkeit hin vermessen (*Schema 2* und *Tab. 1* und *2* im *Exper. Teil*).

Schema 2



Die Unterschiede in den UV-Spektren zwischen den Pyrazinen von **PQQ** zu den Pyrazinen von **PQQ**-Triester sind erwartungsgemäss klein (vgl. **3** mit **4** oder **6** mit **7**). In saurem Milieu (CF_3COOH -Lösungen) ist bei allen Derivaten eine bathochrome Verschiebung des ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergangs von 14 bis 138 nm zu beobachten. Wahrscheinlich wird das N-Atom, das sich an C(4) des **PQQ**-Grundgerüsts befindet, protoniert, was die Bildung einer Aminochinondiimin-Struktur (vgl. *Schema 3*) erlaubt. Mit der Protonierung des Pyrrol-N-Atoms würde hingegen das chromophore System seinen Donator verlieren, was mit dem beobachteten bathochromen Effekt nicht zu vereinbaren ist. Die

Schema 3



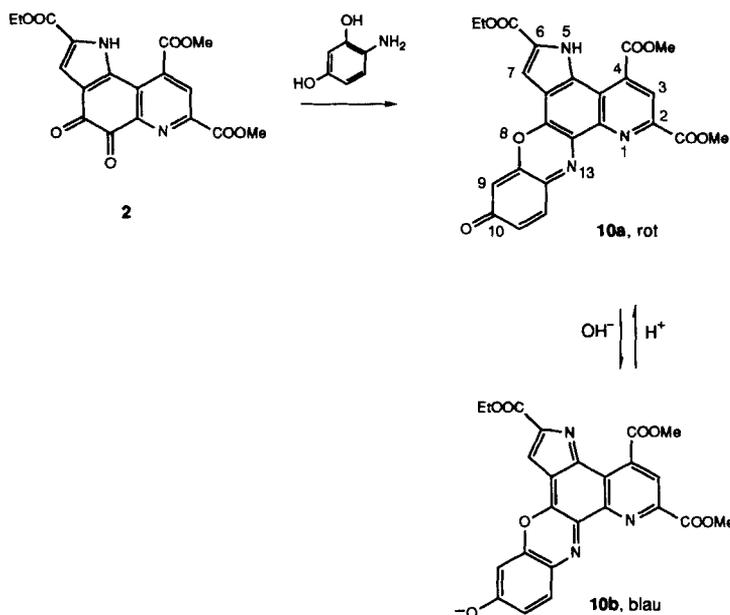
$^1\text{H-NMR}$ -Spektren in CF_3COOD belegen diese Aussage: das Proton an C(3) wird deutlich nach tieferem Feld hin verschoben. Die untere Nachweisgrenze mit UV/Fluoreszenz-Detektion von **PQQ** *via* der vorgestellten Pyrazin-Derivatisierung liegt im Bereich von 50–150 ppb. Damit ist der sichere Nachweis von **PQQ** in aufgereinigten potentiellen Chinoproteinen gegeben. Nach unseren Erfahrungen mit der elektrochemischen Detektion [19] von **PQQ** oder mit einem Bioassay [5], die beide eine Nachweisgrenze von **PQQ** bis zu 3 ppb gestatten, reicht die hier vorgestellte Methode nicht aus, **PQQ** in biologischen Mustern nachzuweisen³⁾.

Oxazin-Bildung. – 2-Aminophenole mit einer 5-ständigen elektronenliefernden Gruppe ergeben mit **PQQ** bzw. **PQQ**-Triester Addukte mit intensiver Farbe, die stark pH-abhängig ist. So erhält man z. B. mit 2,4-Dihydroxyanilin und **PQQ**-Triester das rotgefärbte (482 nm, $\epsilon = 16800$) Addukt **10** (*Schema 4*) in 85% Ausbeute, dessen Farbe im alkalischen Bereich (pH 10) nach Blau (644 nm, $\epsilon = 11000$) umschlägt. Die zusätzlich vorhandene Fluoreszenz (in CHCl_3 : $E_{x_{\text{max}}} = 308$; $E_{m_{\text{max}}} = 615$) macht diesen Indikator zu einem interessanten **PQQ**-Derivat. Die pH-Abhängigkeit erbringt eine zusätzliche Spezifität gegen Oxazine anderer chinoider Systeme. Infolge der kleinen Quantenausbeute (unter 0,1%) ist die Verbindung aber für eine analytische Bestimmung von **PQQ** im untersten ppb-Bereich unbrauchbar.

Oxidation von PQQ. – Oxidationsprodukte von **PQQ** bzw. **PQQ**-Triester unter Ring-Öffnung des Chinons wurden in der Literatur beschrieben [12] [3a]. Die angeblich vorhandene Fluoreszenz dieser Oxidationsprodukte (mit z. T. unabgeklärter Struktur) soll für die Detektion von **PQQ** geeignet sein.

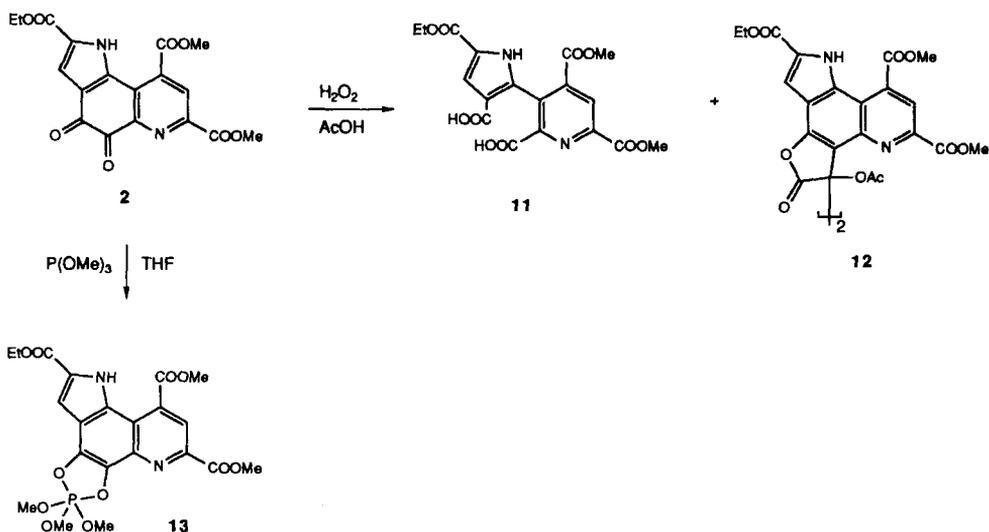
³⁾ Mit dem Enzym-Assay nach [5] enthält z. B. Weinessig 20 ppb, mit unserem elektrochemischen Nachweis [19] 15 ppb **PQQ**.

Schema 4



PQQ-Triester kann mit H₂O₂ in Eisessig in das Pyrrolo-pyridin **11** (Schema 5) übergeführt werden. Sowohl die reine Disäure als auch deren Veresterungsprodukt zeigen jedoch keine Fluoreszenz, im Gegensatz zu Reaktionsgemischen der Oxidation. Die beobachtete Fluoreszenz ist auf Dimere (z. B. **12**) zurückzuführen, die in Spuren gebildet

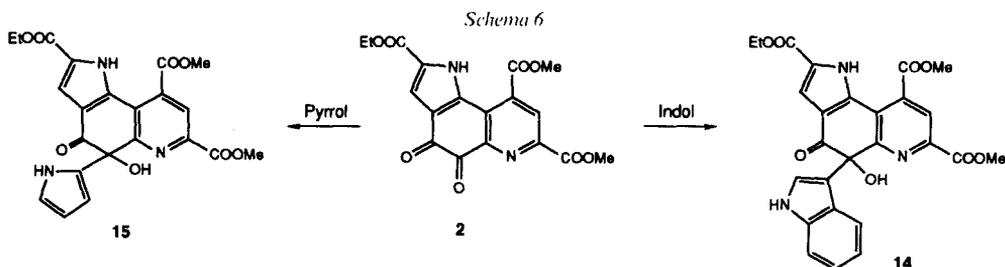
Schema 5



wurden. **12** kann in besseren Ausbeuten erhalten werden, wenn **PQQ**-Triester mit Ac_2O in Gegenwart von NaOAc aufgekocht wird (vgl. *Exper. Teil*).

Reaktion von PQQ-Triester mit $(\text{MeO})_3\text{P}$. – Die Umsetzung von **PQQ**-triester mit $(\text{MeO})_3\text{P}$ in THF ergibt in guten Ausbeuten das orange, cyclische Trimethoxydioxaphosphol **13** (*Schema 5*), das im UV Fluoreszenz zeigt ($Ex_{\text{max}} = 306$, $Em_{\text{max}} = 552$). Die Substanz ist bemerkenswert stabil gegen H_2O ; erst mit HCl (6N) gelingt die Ring-Öffnung zum Phosphorsäure-triester. Die Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markiertem Trialkyl-phosphit würde die erwähnte Reaktion damit zu einer extrem empfindlichen Nachweis-Methode für **PQQ**⁴⁾ machen.

Addukte mit Indol und Pyrrol. – Die Umsetzung von Indol und Pyrrol mit **PQQ**-Triester ergibt grün gefärbte Additionsprodukte der Struktur **14** bzw. **15** (*Schema 6*), die im stark alkalischen Milieu instabil sind. Beide Derivate zeigen unter der UV-Lampe Fluoreszenz (**14** $Ex_{\text{max}} = 454$ nm, $Em_{\text{max}} = 497$ nm; **15** $Ex_{\text{max}} = 370$ nm, $Em_{\text{max}} = 426$ nm). Die Quantenausbeute liegt unter 0,1%, so dass diese Art der Derivatisierung keine analytische Bestimmung von **PQQ** im untersten ppb-Bereich zulässt.



Die in [20] erwähnte grüne Farbe der Exkremente von Mäusen, die mit **PQQ** 'gefüttert' wurden, könnte auf Additionsverbindungen des hier beschriebenen Typs zurückzuführen sein.

Furan, Benzofuran und Thiophen zeigen keine Reaktion mit **PQQ** bzw. **PQQ**-Triester.

Zusammenfassung. – Die hier vorgestellten einfach zugänglichen und stabilen Derivate von **PQQ** bzw. **PQQ**-Triester, insbesondere die Pyrazin-Derivate **3–9** und das Oxazin **10** eignen sich in vielen Fällen für die Detektion von **PQQ** (z. B. Identifizierung eines Enzyms als **PQQ**-haltiges Enzym). Immer sollten zwei oder mehr Derivate hergestellt werden oder zusätzlich Methoden wie HPLC mit elektrochemischer Detektion oder ein Bioassay (z. B. mit Glucosedehydrogenase) mit einbezogen werden, um eine Verwechslung mit anderen Chinonen möglichst zu vermeiden.

Für den Spuren-Nachweis von **PQQ** in Lebensmitteln und in biologischen Mustern (Blut, Gewebe, Organe, etc.) mittels (UV/Fluoreszenz)-Detektion sind die hier beschriebenen Derivate **3–10**, **14** und **15** aufgrund der zu schwachen Quantenausbeuten unbrauchbar. Hingegen dürfte die Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markierten Trialkyl-phosphiten

⁴⁾ **PQQ** muss vorgängig verestert werden, da **PQQ** selbst unspezifisch mit $(\text{MeO})_3\text{P}$ reagiert.

zu den stabilen **PQQ**-Dioxaphosphol-Derivaten (z. B. **13**) in Zukunft einer der empfindlichsten Nachweis-Methoden für **PQQ** werden.

Herrn Dr. *F. Thommen* und Frau Dr. *E. Schmidt* sei für die Aufnahme der (UV/Fluoreszenz)-Spektren, den Herren Drs. *J. und J. P. Bersier* (Elektroanalytik) für die elektrochemische Detektion von **PQQ** und Herrn Dr. *M. Streiff* (Zentrale Forschungslaboratorien) für die Bereitstellung von Bioassays gedankt. Herrn Dr. *Oreste Ghisalba* sei für sein stetes Interesse und die vielen Diskussionen um **PQQ** herzlich gedankt.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [21]. Zusätzlich: *Perkin-Elmer-Lambda-9*-UV/VIS-Spektrometer, *Perkin-Elmer-MPF-66*-Fluorimeter. **PQQ** (**1**) und **PQQ**-Triester (**2**) wurden nach [22] hergestellt.

Reduktion von PQQ-Triester (2) mit 2-Hydrazinopyridin. Zu einer Suspension von 3,0 g (7,8 mmol) **2** in 35 ml DMF werden bei RT. 0,85 g (7,8 mmol) 2-Hydrazinopyridin in 5 ml DMF getropft (exotherm, Schaumbildung). Nach 3 h Weiterühren wird die dicke Suspension abgenutscht und der Rückstand mit DMF und wenig CH_2Cl_2 nachgewaschen; 2,84 g (94%) 4,5-dihydroxy-1H-pyrrolo[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (**2**·H₂). Schmp. 232–233°. IR (KBr): 3480, 3400 (NH, OH); 1720 (CO). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,46 (t, J = 7,5, CH₃); 4,09 (s, CH₃); 4,17 (s, CH₃); 4,47 (q, J = 7,5, CH₂); 7,54 (d, J = 2, H–C(3)); 8,79 (s, H–C(8)); 12,35 (br. s, H–N(1)). MS: 388 (M⁺).

Umsetzung von PQQ (1) bzw. PQQ-Triester 2 mit 1,2-Diaminen: Allgemeine Vorschrift. In die vorgelegte Suspension von 7,8 mmol **PQQ** (**1**) bzw. **PQQ**-Triester **2** in 60 ml DMF werden 7,8 mmol 1,2-Diamin in 10 ml

Tab. 1. Ausbeuten, längstwellige Absorptionsmaxima von **3–9** in CHCl_3 und/oder CF_3COOH sowie Extinktions/Emissionsmaxima in CHCl_3

	Ausbeute [%]	$\lambda_{\text{max.}}$ (ε)		$Ex_{\text{max.}}$ CHCl_3	$Em_{\text{max.}}$ CHCl_3
		CHCl_3	CF_3COOH		
3	96	351 (19120)	–	–	–
4	88	366 (25720)	380 (21400)	387	490
5	98	396 (27800)	450 (30000)	395	581
6	95	–	519 (7840)	–	–
7	89	377 (30200)	515 (34420)	403	413
8	88	354 (23000)	377 (18440)	356	529
9	63	373 (25040)	390 (20480)	386	553

Tab. 2. ¹H-NMR-Spektren von **1–9**

	H–C(3) (d, J = 2–3)	H–C(8) (s)	H–N(1) (br. s)	COOMe (s)	COOEt (t, q, J = 7–8)	Übrige
1 ^{a)}	7,20	8,58	13,2			
1 ^{c)}	7,84	9,33				
2 ^{a)}	7,28	8,58	12,5	3,96, 4,06	1,36, 4,37	
2 ^{b)}	7,48	8,90	12,9	4,08, 4,17	1,43, 4,42	
2 ^{c)}	7,70	9,10		4,16, 4,28	1,60, 4,60	
3 ^{a)}	7,70	8,84				7,93 (m, 2H); 8,20 (dd); 8,38 (dd)
4 ^{b)}	8,18	9,13	12,8	4,16, 4,33	1,50, 4,50	7,92 (m, 2H); 8,38 (dd); 8,66 (dd)
5 ^{c)}	8,58	9,20		4,39, 4,42	1,66, 4,75	8,06 (m, 2H); 8,43 (dd); 8,51 (dd); 9,61 (s); 9,65 (s)
6 ^{a)}	7,17	8,15				6,98 (s, 2H)
7 ^{c)}	8,44 ^{d)}	8,52 ^{d)}		4,43, 4,53	1,66, 4,75	7,91 (s); 8,08 (s)
8 ^{b)}	8,08	9,25	13,15	4,20, 4,28	1,51, 4,53	
9 ^{b)}	7,97	8,97	12,65	4,16, 4,22	1,49, 4,48	8,14 (d, J = 3); 8,52 (d, J = 3)

^{a)} In (D₆)DMSO. ^{b)} In CDCl₃. ^{c)} In CF₃COOD. ^{d)} Können vertauscht sein.

DMF gelöst, bei RT. zugetropft und anschliessend zwischen 30 min und 3 h gerührt (DC-Kontrolle). Dabei tritt kurzfristig Lsg. ein, bevor erneut eine gelbe oder gelb-orange Suspension gebildet wird. Der Niederschlag wird filtriert und mit DMF und Et₂O nachgewaschen und i. HV. bei 60° getrocknet. Mit Ausnahme von **9** (Schmp. 210° (Zers.)) schmelzen alle Addukte über 250°. Ausbeuten und spektrale Daten: Tab. 1 und 2.

Umsetzung von PQQ-Triester 2 mit 2,4-Dihydroxyanilin. In die Vorlage von 3,0 g (7,8 mmol) PQQ-Triester in 50 ml DMF werden portionenweise 1,26 g (7,8 mmol) 2,4-Dihydroxyanilin·HCl gegeben. Nach 23 h Weiterführen wird der Niederschlag abfiltriert, mit DMF und Et₂O gewaschen und i. HV. bei 50° getrocknet: 3,37 g (91%) tiefrotten 10-Oxo-5-H-pyrido[2,3-a]pyrrolo[2,3-c]phenoxazin-2,4,6-tricarbonensäure-(6-ethyl)(2,4-dimethyl)ester (**10**). Schmp. > 250°. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,50 (t, J = 7,5, CH₃); 4,14, 4,23 (2s, je CH₃); 4,50 (q, J = 7,5, CH₂); 6,54 (s, H-C(9)); 6,97 (d, J = 11), 7,81 (d, J = 11) (H-C(11), H-C(12)); 7,72 (s, H-C(7)); 9,03 (s, H-C(3)); 13,3 (br. s, NH). MS: 475 (M⁺).

Oxidation von PQQ-Triester 2 mit H₂O₂. Zu einer orangen Suspension von 3,0 g (7,8 mmol) PQQ-Triester **2** in 30 ml AcOH werden 0,885 g (7,8 mmol) 30% H₂O₂ in 4 ml AcOH getropft. Anschliessend wird das Gemisch auf 60° erwärmt. Nach anfänglichem Lösen unter roter Farbe fällt ein hellgelber Niederschlag aus. Nach total 4,5 h Rühren wird abfiltriert. Der Rückstand wird mit H₂O gewaschen und i. HV. bei 60° getrocknet: 2,41 g (74%) schwach gelbe 4,6-Bis(methoxycarbonyl)-3-[4'-carboxy-2'-(ethoxycarbonyl)pyrrol-2'-yl]pyridin-2-carbonsäure (**11**). Schmp. 190–191°. UV (DMSO): 269 (16760). ¹H-NMR (300 MHz, (D₆)DMSO): 1,30 (t, J = 8, CH₃); 3,70, 3,97 (2s, je CH₃); 4,27 (q, J = 8, CH₂); 7,08 (d, J = 3, H-C(4')); 8,47 (s, H-C(5)); 12,6 (s, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, (D₆)DMSO): 166,2 164,9 (2s, je COOH); 164,4 (m, COOCH₃); 160,7 (COOCH₂); 153,2, 147,7 (2s, C(2), C(6)); 141,6 (s, C(4)); 134,7 (d, C(2')); 129,9 (d, C(5')); 125,3 (d, C(5)); 123,2 (dd, C(3)); 116,9 (d, C(4')); 116,4 (dd, C(3')); 60,6 (CH₂O); 53,4 (CH₃O); 14,6 (CH₃CH₂). MS (FD): 420.

Das wässr. Filtrat (inkl. Waschwasser) wird mit AcOEt extrahiert. Nach Trocknen (MgSO₄) und Eindampfen wird der Extrakt chromatographiert (Kieselgel, Toluol/Et₂O 1:1): 13 mg **12**.

Das Dimere **12** kann mit 25% Ausbeute isoliert werden, wenn 5,2 mmol PQQ-Triester mit 5,2 mmol NaOAc in 30 ml Ac₂O 6 h bei 100° gehalten werden. IR (CDCl₃): 3290 (NH), 1830 (CO), 1750 (CO), 1715 (CO). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,45 (t, J = 7,5, CH₃); 2,16 (s, CH₃); 3,37 (s, CH₃); 4,16 (s, CH₃); 4,47 (q, J = 7,5, CH₂); 7,18 (s, H-C(3)); 8,48 (s, H-C(8)); 12,6 (br. s, NH). ¹³C-NMR (CDCl₃): 169,9 (q, COCH₃); 168,6 (qd, C(9')); 168,3 (s, CO, Lacton); 164,6 (qd, C(7')); 160,7 (t, C(2')); 151,7 (t, C(4)); 145,6, 144,9 (2s, H-C(5a), H-C(7)); 132,3 (s, H-C(9)); 131,7 (dd, J = 7, 2, C(1a)); 129,0 (dd, J = 6, 3, C(2)); 121,5 (d, H-C(8)); 114,2 (dd, C(3a)); 113,9 (d, C(9a)); 107,7 (s, C(5)); 105,8 (dd, C(3)); 82,4 (s, C-OAc); 61,6 (CH₂O); 54,2, 52,8 (je CH₃O); 20,0 (CH₃CO); 14,3 (CH₃CH₂). MS (FAB): 939 [(M + H)⁺].

Umsetzung von PQQ-Triester 2 mit (MeO)₃P. Zur orangen Suspension von 3,0 g (7,8 mmol) **2** in 30 ml THF wird eine Lsg. von 0,99 g (7,8 mmol) (MeO)₃P in 4 ml THF getropft (leicht exotherm). Nach 10 min Weiterführen wird die Suspension unrührbar. Nach Zugabe von 10 ml THF wird 2 h weitergerührt. Das Gemisch wird abfiltriert, mit THF, dann mit Et₂O gewaschen und i. HV. bei 40° getrocknet: 3,34 g (84%) orangen 5,5,5-Trimethoxy-1,3,2-dioxaphosphol[4,5-h]pyrrolo[2,3-f]chinolin-2,8,10-tricarbonensäure-(2-ethyl)(8,10-dimethyl)ester (**13**). Schmp. 165/66°. UV (CHCl₃): 312 (28300). Fluoreszenz: *E*_xmax = 306; *E*_mmax = 552. IR (CHCl₃): 1720 (CO). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,47 (t, J = 7, CH₃); 3,85 (d, J = 13, 3 POCH₃); 4,08 (s, COOCH₃); 4,17 (s, COOCH₃); 4,46 (q, J = 7, CH₂O); 7,52 (d, J = 2, H-C(3)); 8,72 (s, H-C(9)); 12,55 (br. s, NH). MS: 510 (M⁺).

Umsetzung von PQQ-Triester 2 mit Indol. Zu einer roten Suspension von 3,86 g (10 mmol) PQQ-Triester **2** in 100 ml DMF werden 1,18 g (10 mmol) Indol und 0,1 g TsOH gegeben. Das Gemisch wird 16 h bei RT. gerührt. Die jetzt grüne Lsg. wird auf H₂O (ca. 1 l) gegossen. Nach 2 h Rühren wird der gebildete Niederschlag abfiltriert, mit H₂O nachgewaschen und i. HV. getrocknet. Nach Digerieren in Et₂O erhält man 2,39 g (48%) 4,5-Dihydro-5-hydroxy-5-(indol-3-yl)pyrrolo[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonensäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (**14**) als grünes Pulver. Schmp. 235–237°. UV (CHCl₃): 261 (24100), 381 (15700), 480 (1900). UV (CF₃COOH): 287 (40500), 437 (16100), 527 (10100), 725 (3100). Fluoreszenz (CHCl₃): *E*_xmax = 369,8; *E*_mmax = 426. Fluoreszenz (CF₃COOH): *E*_xmax = 454, *E*_mmax = 497. ¹H-NMR (300 MHz, (D₆)DMSO): 1,22 (t, J = 7,5, CH₃); 3,90 (s, CH₃); 4,05 (s, CH₃); 4,30 (q, J = 7,5, CH₂); 6,04 (s, OH); 6,53 (d, 3, H-C(2')); 6,90 (m, H-C(5')); 7,02 (m, H-C(6')); 7,08 (d, J = 2, H-C(3)); 7,26 (d, J = 8, H-C(7')); 7,90 (d, J = 8, H-C(4')); 8,50 (s, H-C(8)); 10,4 (br. d, J = 3, H-N(1)); 12,5 (br. s, H-N(1)). MS: 485 [(M - H₂O)⁺].

Umsetzung von PQQ-Triester 2 mit Pyrrol. Die rote Suspension von 3,86 g (10 mmol) **2**, 0,7 ml (10 mmol) Pyrrol, 100 ml DMF und 0,1 g TsOH wird 14 h bei RT. gerührt. Die grüne Lsg. wird auf 1 l H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird mit Et₂O digeriert: 2,20 g (49%) 4,5-Dihydro-5-hydroxy-5-(pyrrol-2-yl)pyrrolo[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonensäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (**15**) als grünes Pulver. Schmp. > 250°. UV (CHCl₃): 256 (19000), 327 (10700), 382

(15500). Fluoreszenz (CHCl₃): $E_{x_{max}} = 369,8$; $E_{m_{max}} = 426$. ¹H-NMR (300 MHz, (D₆)DMSO): 1,32 (*t*, *J* = 7,5, CH₃); 3,93 (*s*, CH₃); 4,04 (*s*, CH₃); 4,34 (*q*, *J* = 7,5, CH₂); 5,23 (*m*, H–C(3′)); 5,72 (*m*, H–C(4′)); 6,17 (*s*, OH); 6,59 (*m*, H–C(5′)); 7,16 (*d*, *J* = 2, H–C(3)); 8,48 (*s*, H–C(8)); 10,6 (*br. s*, NH); 12,5 (*br. s*, NH). MS: 453 (*M*⁺).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. A. Duine, J. A. Jongejan, *Vitam. Horm.* **1989**, *45*, 223.
[2] R. A. Van der Meer, A. C. Mulder, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *FEBS Lett.* **1989**, *254*, 99.
[3] a) T. Kumazawa, H. Seno, T. Urakami, O. Suzuki, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *283*, 533; b) M. A. Paz, R. Flückiger, A. Boak, H. M. Kagan, P. M. Gallop, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 689.
[4] P. M. Gallop, M. A. Paz, R. Flückiger, *Chemtracts-Biochem. Molec. Biol.* **1990**, *1*, 357.
[5] R. A. Van der Meer, B. W. Groen, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *FEBS Lett.* **1990**, *261*, 131.
[6] M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsuskita, O. Adachi, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 699.
[7] a) C. Schmidt, F. Steinberg, R. B. Rucker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1991**, *197*, 19; b) H. M. Hanauske-Abel, G. Tschauk, V. Günzler, E. Bader, P. Gallop, *FEBS Lett.* **1987**, *214*, 236.
[8] J. Killgore, C. Schmidt, L. Duich, N. R. Chapman, D. Trinker, K. Reiser, M. Melko, D. Hyde, R. B. Rucker, *Science* **1989**, *245*, 850.
[9] *Roche Magazin* **1991**, *36*, 33.
[10] *Prima* **1990**, *5*, 177.
[11] J. A. Duine, P. M. Gallop, *TIBS Lett.* **1990**, *15*, 96.
[12] J. A. Duine, J. Frank, J. A. Jongejan, *Analyt. Biochem.* **1983**, *133*, 239.
[13] a) P. R. Bergethon, *Analyt. Biochem.* **1990**, *186*, 324; b) M. Otani, C. Umezawa, K. Sano, *J. Chromatogr.* **1989**, *483*, 448.
[14] M. A. Paz, P. M. Gallop, B. M. Torrelino, B. Flückiger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *154*, 1330.
[15] C. L. Lobenstein-Verbeek, J. A. Jongejan, J. Frank, J. A. Duine, *FEBS Lett.* **1984**, *170*, 305.
[16] M. Ameyama, K. Matsuskita, K. Ohno, Y. Shinagawa, O. Adachi, *FEBS Lett.* **1981**, *130*, 179.
[17] G. Citro, A. Verdina, R. Galati, G. Floris, S. Sabatini, A. Finazzi-Agro, *FEBS Lett.* **1989**, *247*, 201.
[18] R. A. Van der Meer, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *FEBS Lett.* **1987**, *221*, 299.
[19] J. P. Bersier, J. Bersier, P. Martin, Publikation in Vorbereitung.
[20] A. Watanabe, N. Hobara, T. Oshawa, T. Higashi, T. Tsuji, *Hiroshima J. Med. Sci.* **1989**, *38*, 49.
[21] P. Martin, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1554.
[22] P. Martin, T. Winkler, E. Steiner, K. Auer, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1667.