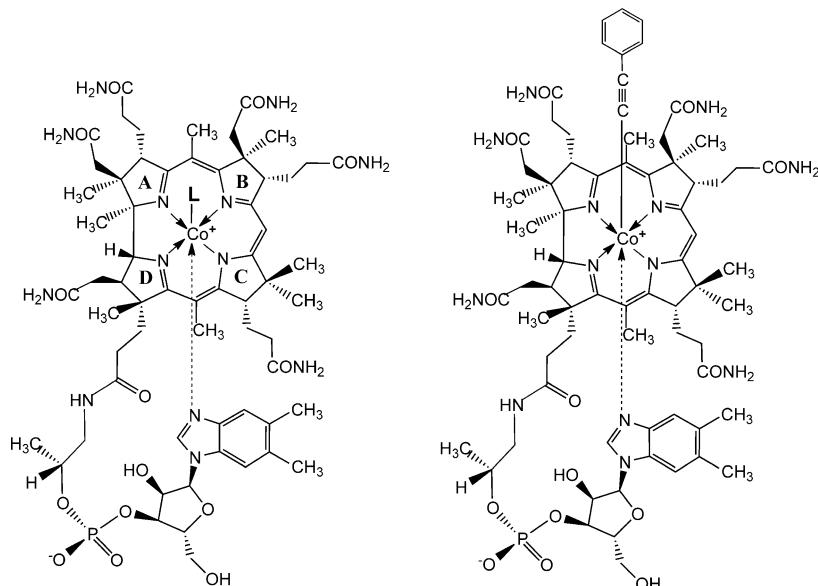


Phenylethynylcobalamin: ein radikalsynthetisch hergestelltes, lichtstables und hitzeresistentes metallorganisches B_{12} -Derivat**

Markus Ruetz, Robert Salchner, Klaus Wurst, Sergey Fedosov und Bernhard Kräutler*

Professor Helmut Schwarz zum 70. Geburtstag gewidmet

Die biologisch wichtigen Rollen der B_{12} -Cofaktoren Coenzym B_{12} (**1**, 5'-Desoxyadenosylcobalamin) und Methylcobalamin (**2**) sind mit ihrer metallorganischen Chemie und Redoxchemie verbunden.^[1,2] Enzym-gesteuerte metallorganische Reaktionen, die Homolyse der schwachen Co-C-Bindung von Coenzym B_{12} (**1**) und eine Nucleophil-induzierte heterolytische Abstraktion der Cobalt gebundenen Methylgruppe von Methylcobalamin (**2**), sowie Prozesse im (formal) umgekehrten Sinne, stellen die bekannten wichtigsten Schritte in B_{12} -abhängigen Enzymen dar.^[3–6] Um mögliche biologische Funktionen der B_{12} -Cofaktoren, wie **1** und **2**, zu erforschen, wurde erheblicher Aufwand in Untersuchungen der chemischen Eigenschaften von metallorganischen B_{12} -Derivaten gesteckt.^[1,7] Ein Merkmal von metallorganischen B_{12} -Derivaten ist ihre effiziente und selektive homolytische Spaltung der Co-C-Bindung durch Thermolyse oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht.^[8,9] Metallorganische Arylcobalamine weichen von dieser Regel zum Teil ab und weisen Thermolyse beständige Co-C_{sp²}-Bindungen auf. Sie repräsentieren eine neue Linie konzipierter B_{12} -Antimetaboliten und sind potenzielle Antivitamine B_{12} .^[10] In diesem Zusammenhang können auch metallorganische Alkinyl- B_{12} -Derivate mit einer Co-C_{sp}-Bindung von besonderem Interesse sein. Es gibt einen überraschenden Mangel an relevanten Informationen über Alkinylcorrine,^[1,7] und aus den älteren Arbeiten über Alkinylcobalamine^[11–13] sind nur weitgehend



Schema 1. Links: Allgemeine Strukturformeln von wichtigen Cobalaminen: Coenzym B_{12} (**1**, 5'-Desoxyadenosylcobalamin, L=5'-Desoxyadenosyl), Methylcobalamin (**2**, L=Methyl), Cob(II)alamin (**4**, L= e^-), Vitamin B_{12} (**5**, Cyanocobalamin, L=CN) und Aquocobalaminchlorid (**6**, L= H_2O^+ [Chlorid]); rechts: Strukturformel von Co_β -2-Phenylethynylcobalamin (**3**).

vorläufige analytische und strukturelle Informationen verfügbar. Metallorganische B_{12} -Derivate mit einem direkt Cobalt gebundenen Alkinyl-Liganden haben außergewöhnliche Struktureigenschaften und chemische Reaktivitäten, wie wir hier für Co_β -2-Phenylethynylcobalamin (**3**; Schema 1) berichten.

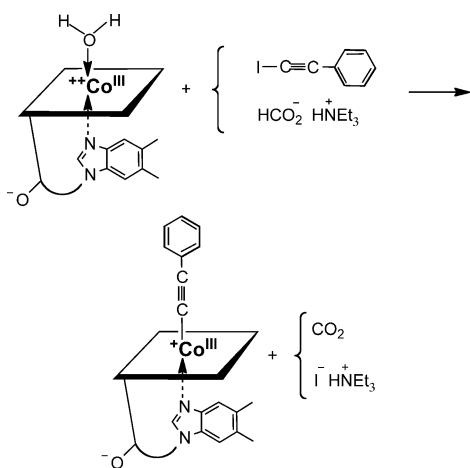
Co_β -2-Phenylethynylcobalamin (**3**) wurde in einer Ein topfreaktion in Sauerstoff-freier wässriger Lösung hergestellt, beginnend mit Aquocobalaminchlorid (**6**), 2-Phenylethynyl iodid und Triethylammoniumformiat (Schema 2). Die Formiat reduktion von **6** lieferte Cob(II)alamin (**4**; siehe Lit. [10]), das mit 2-Phenylethynyl iodid über eine mutmaßliche radikalische Reaktion reagierte. Wir schlagen vor, dass die Bildung von **3** durch Rekombination eines 2-Phenylethynylradikals mit in situ generiertem **4** erfolgt (Schema 3). Das Organocobalamin **3** wurde in 68 % Ausbeute nach Kristallisation des rohen roten Isolats aus wässrigem Aceton erhalten.

Das UV/Vis-Spektrum von **3** (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1) zeigte ein Base-on-Cobalamin und war ähnlich dem von Vitamin B_{12} (**5**). Allerdings unterschied sich das Spektrum von **3** deutlich von den Spektren der me-

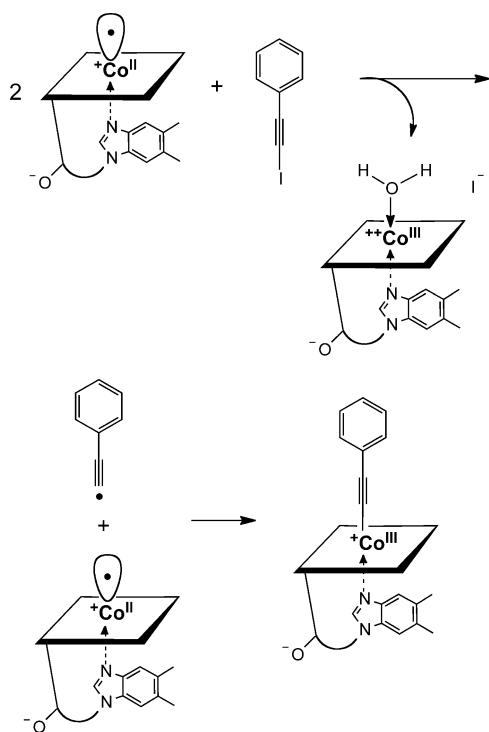
[*] Dr. M. Ruetz, Mag. R. Salchner, Prof. Dr. B. Kräutler
Institut für Organische Chemie und Center for Molecular Biosciences (CMBI), Universität Innsbruck
Innrain 80/82, 6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

Dr. K. Wurst
Institut für Allgemeine, Anorganische und Theoretische Chemie
Universität Innsbruck (Österreich)
Dr. S. Fedosov
Department of Engineering Science
Aarhus University (Dänemark)

[**] Wir danken T. Müller für die Aufnahme von FAB-Massenspektren.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201305206> zu finden.



Schema 2. Herstellung von $\text{Co}_\beta\text{-2-Phenylethinylcobalamin}$ (**3**) aus Aquocobalaminchlorid (**6**) und 2-Phenylethinyliodid (siehe Schema 3 für einen vorgeschlagenen Mechanismus und Hintergrundinformationen für weitere experimentelle Details).



Schema 3. Vorgeschlagener Mechanismus der Bildung von **3**. Eine hypothetische Ein-Elektronenreduktion von 2-Phenylethinyliodid durch das Co^{II} -Corrin **4** ergibt ein 2-Phenylethinyllradikal, das effizient durch **4** abgefangen wird.

tallorganischen B_{12} -Cofaktoren **1** und **2**. In einem MALDI-TOF-Massenspektrum von **3** wurden ein Pseudomolekülion bei $m/z = 1430.7$ sowie ein Basispeak bei $m/z = 1329.6$ (Verlust des metallorganischen Phenylethinylliganden) beobachtet. Die Bande bei 2117 cm^{-1} im IR-Spektrum von **3** (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S3) wurde dem Cobalt-gebundenen Alkinyl-Liganden zugeordnet. Homonukleare $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -spektroskopische Untersuchungen stützten eine Bindung des Phenylethi-

nyl-Liganden an der „oberen“ β -Seite des Corrin-gebundenen Co^{III} -Zentrums und identifizierten die Struktur von **3** als Base-on- $\text{Co}_\beta\text{-2-Phenylethinylcobalamin}$. Die Signale der Kerne der metallorganischen Gruppe, mit Ausnahme des Cobalt-gebundenen Kohlenstoffatoms, konnten zugeordnet werden (siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S1 und Abbildung S4). Das gemeinsame Signal der beiden orthoständigen Wasserstoffatome (Dublett bei 6.85 ppm) des 2-Phenylethinylliganden zeigte die effektive Äquivalenz dieser Protonen aufgrund (rascher) Rotation des Phenylrings an.

Aus wässrigem Aceton wurden orthorhombische Kristalle von **3** für eine Röntgenstrukturanalyse gezüchtet. Die Struktur von **3** konnte auf 0.84 \AA verfeinert werden und offenbart ein Base-on-Cobalamin mit einem „oberen“ 2-Phenylethinylliganden (Abbildung 1).^[28] Die innere Koordinationssphäre (Bindungslängen und Geometrie) des Cobaltzentrums von **3** ist ähnlich der von Vitamin B_{12} (**5**).^[14-16] Die axiale $\text{Co}-\text{C}_\beta$ -Bindung hat eine Länge von nur $1.861(3) \text{ \AA}$, und die $\text{Co}-\text{N}_\alpha$ -Bindung zur Dimethylbenzimidazol(DMB)-Base ist $2.084(2) \text{ \AA}$ lang (gegenüber 1.858 bzw. 2.011 \AA in **5**).^[14,16] Die Bindungslängen in der äquatorialen Ebene sind

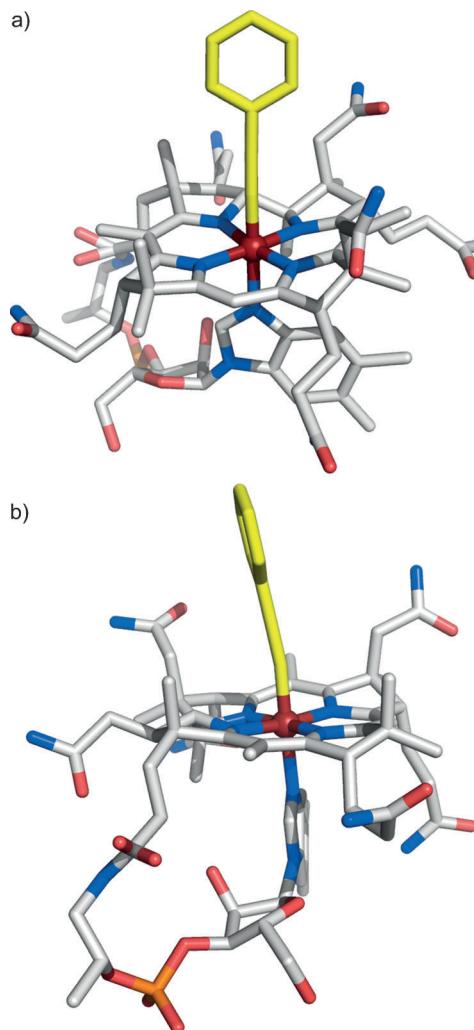


Abbildung 1. Kristallstruktur von Phenylethinylcobalamin (**3**) in zwei Projektionen (a,b); C grau, N blau, O rot, P orange, Co dunkelrot. Die C-Atome des 2-Phenylethinylliganden sind gelb gefärbt.

1.881(2) Å (Co-N1), 1.921(2) Å (Co-N2), 1.914(2) Å (Co-N3) und 1.890(2) Å (Co-N4). Der „Faltungswinkel“ des Corrinliganden von **3** beträgt 15.26(10)°, und das Cobaltatom liegt leicht außerhalb der Ebene der vier Corrin-Stickstoffatome und ist um 0.031(1) Å in Richtung des α-DMB-Liganden hin verschoben, zwei Strukturmerkmale ähnlich denjenigen von **5**. Die Orientierung der Phenylgruppe (im Kristall) ist „Nord-Süd“, und die Ebene der Phenylgruppe ist um einen Winkel von 15.36(10)° bezüglich des DMB-Liganden verdreht. Der Winkel zwischen der Dreifachbindung und der Bindung zum aromatischen Kohlenstoffatom beträgt fast 180° (C1L-C2L-C3L 179.2(4)°), während der Co-C1L-C2L-Winkel (172.1(3)°) leicht gebeugt ist. Die Dreifachbindung C1L-C2L ist länger (1.209(5) Å) als in organischen Alkinen (Mittelwert von 1.18 Å^[17,18]). Die Bindung C2L-C3L (von der Alkineinheit zur Phenylgruppe) hat eine Länge von 1.444(5) Å und liegt im typischen Bereich der sp²-sp-Bindungen (Mittelwert von 1.43 Å^[17]).

Wie erwartet ist der Alkinyl-Ligand von **3** über eine kurze Co-C_{sp}-Bindung gebunden. Diese ist mit 1.861(3) Å etwas kürzer als in einem Alkinyl-Co^{III}-Modellkomplex.^[19] Die Länge der Co-C_β-Bindung in **3** unterschreitet auch den Bereich, der für alle andere bekannten metallorganischen B₁₂-Derivate gefunden wurde.^[14,15] Ebenso ist auch die trans-axiale Co-N_α-Bindung von **3** (2.084(2) Å) kürzer als in anderen metallorganischen B₁₂-Derivaten (Abbildung 2). Die korrelierte Verkürzung (oder Verlängerung) der beiden axialen Bindungen ist ein qualitatives Merkmal von Organocorrinoiden und wurde als inverser „struktureller“ trans-Effekt beschrieben.^[14,15]

Wie in Abbildung 2 gezeigt ist, korrelieren die Längen der Co-C-Bindungen von Modellorganocobalaminen qualitativ mit der Hybridisierung des direkt gebundenen Kohlenstoffatoms.

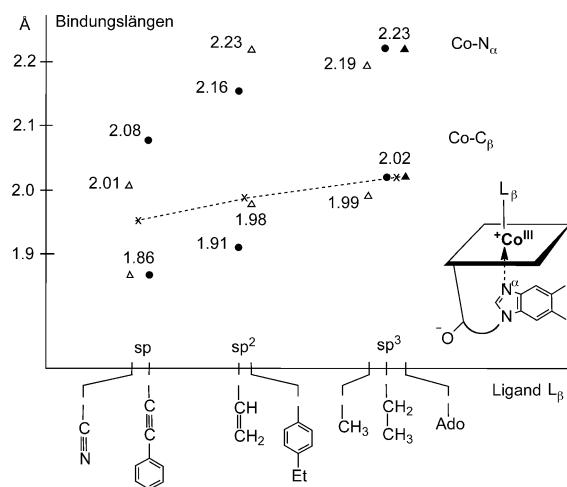


Abbildung 2. Axiale Bindungslängen von ausgewählten metallorganischen B₁₂-Derivaten (siehe Text). Die C_β-Co-Bindungslänge von Organocobalaminen korreliert tendenziell mit dem s-Charakter des Cobalt-gebundenen Kohlenstoffatoms, z. B. C_{sp}-Co < C_{sp²}-Co < C_{sp³}-Co. Allerdings sind die metallorganischen Bindungen von Ethinylcobalamin **3**, Vinylcobalamin und Vitamin B₁₂ (**5**) kürzer als auf der Basis der Summe der entsprechenden kovalenten Einfachbindungen und eines (oktaedrischen) Co^{III}-Zentrums erwartet (siehe „x“-Markierung auf der gepunkteten Linie^[20]). Ado = 5'-Desoxyadenosyl.

atoms.^[18] Tatsächlich entspricht die Länge der Co-C_β-Bindungen in Coenzym B₁₂ (**1**), Methylcobalamin (**2**)^[14,15] und Ethylcobalamin^[21] in etwa der Summe der Kovalenzradien eines C_{sp³}- (r=0.76 Å) und eines Low-Spin-Co^{III}-Ions (r=1.26 Å)^[20] – doch ist in **3** die Co-C_β-Bindung (1.861 Å) um etwa 0.09 Å auffallend kürzer als die Summe der Kovalenzradien eines C_{sp}- (r=0.69 Å) und des Co^{III}-Ions (Abbildung 2). Die Länge der Co-C_β-Bindung von 4-Ethylphenylcobalamin (1.98 Å)^[10] entspricht in etwa der Summe der Kovalenzradien eines C_{sp}- (r=0.73 Å) und des Co^{III}-Ions, während diese in Vinylcobalamin wesentlich kürzer ist (um etwa 0.08 Å).^[22] Die Strukturdaten weisen somit auf eine höhere effektive Bindungsordnung der Co-C_β-Bindungen zum ungesättigten Kohlenstoffatom von Ethinylcobalamin **3** (und Vinylcobalamin) hin. Eine ähnliche Situation würde auch für Vitamin B₁₂ (**5**) gelten^[16] (Abbildung 2).

Der Acetylidligand des 2-Phenylethinylcobalamins **3** übt einen thermodynamischen *trans*-Effekt aus, der in etwa vergleichbar mit dem des Cyanoliganden in **5** ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde mit Ethinylcobalamin^[11] und Ethynylaquocobinamid^[23] gemacht. Der *trans*-Effekt der Alkinyl-Liganden fällt außerhalb des Bereichs bekannter Alkyl- und Aryl-Liganden in entsprechenden Organocobalaminen.^[13] So war die Protonierung der DMB-Einheit von **3** auch bei pH 1.6 unbedeutend, was auf eine fest Cobalt-gebundene DMB-Base schließen lässt. Allerdings trat bei diesem pH-Wert leicht eine proteolytische Ablösung des Phenylethinylliganden auf ($t_{1/2} \approx 15$ min bei Raumtemperatur), wodurch Aquocobalamin (**6**) und Phenylacetylen entstanden (siehe Hintergrundinformationen, Abbildungen S6 und S8). Bei pH 2–5 verringerte sich die Geschwindigkeit der Zersetzung von **3** bei Raumtemperatur linear mit der Säurekonzentration. Extrapolation der Zersetzungsgeschwindigkeit zeigte, dass **3** bei pH 7 und Raumtemperatur relativ stabil ist ($t_{1/2} \approx 350$ Tage; siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S7). Im Unterschied zur hier beobachteten acidolytischen Abspaltung des metallorganischen Liganden von **3** zersetzte sich Ethinylcobalamin in saurer wässriger Lösung offenbar über eine Säure-induzierte Addition von Wasser an den Ethinyl-Liganden zu Acetylcobalamin.^[11] In beiden Fällen erfährt die metallorganische Gruppe vermutlich eine Protonierung eines der sp-hybridisierten C-Atome mit intermediärer Bildung eines stabilisierten, Metall-koordinierten Vinylkations. Das Ethinylcobalamin wird demnach am terminalen C-Atom protoniert, während 2-Phenylethinylcobalamin (**3**) am Cobalt-gebundenen Kohlenstoffatom protoniert zu werden scheint.

Wie erwartet zeigte **3** eine hohe intrinsische Resistenz gegen eine thermolytische Spaltung der Co-C-Bindung: Eine Lösung von **3** in absolutem DMSO konnte unter Inertgas bei 100°C fünf Tage ohne nennenswerte Zersetzung erhitzt werden (siehe Hintergrundinformation für Details). Eine Sauerstoff-gesättigte Lösung von **3** in [D₆]DMSO zersetzte sich langsam bei 100°C ($t_{1/2} > 72$ h), wobei **6** und andere Cobaltcorrine entstanden (siehe Hintergrundinformationen, Abbildungen S11 und S12). Bei 120°C schließlich zersetzte sich **3** in [D₆]DMSO (mit einer Halbwertszeit von ca. 30 h) zu einem Gemisch aus Cobaltcorrinen und etwas Phenylacetylen. Die Zersetzungprodukte, die bei dieser Temperatur ge-

bildet wurden, wiesen auf eine Spaltung der Co-C-Bindung hin.

In einem weiteren charakteristischen Unterschied zu anderen Organocobalaminen blieb eine belüftete und von Tageslicht 75 h lang belichtete wässrige Lösung von **3** unverändert und zeigte keine signifikanten Änderungen im UV/Vis-Spektrum (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S15). Diese Beobachtung ist in Einklang mit früheren Befunden für Ethinylcobalamin^[13] sowie mit der bemerkenswerten Photostabilität von Vitamin B₁₂ (**5**)^[24].

Zur Erforschung der möglichen Verwendung von Co_β-2-Phenylethinylcobalamin (**3**) in metabolischen Studien mit Säugetieren wurde die Bindung von **3** an die essenziellen humanen B₁₂-Transportproteine Intrinsischer Faktor (IF) und Transcobalamin (TC) in einem etablierten Konkurrenzassay mit einem fluoreszierenden B₁₂-Konjugat untersucht.^[10,25] Wie anhand der bekannten Daten aus Kristallstrukturen der beiden B₁₂-Bindeproteine (Übersicht in Lit. [7]) angenommen, hatten diese für das metallorganische B₁₂-Derivat **3** eine ähnlich hohe Affinität wie für Vitamin B₁₂ (**5**): **3** band mit ähnlicher Bindungsrate an IF ($k_{on} = 93 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und TC ($k_{on} = 129 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), und **3** dissoziierte auch mit k_{off} -Raten ($1.5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) ähnlich wie **5** (siehe Hintergrundinformationen, Abbildungen S16 und S17). Daher ist es wahrscheinlich, dass **3** von Menschen und Säugetieren ähnlich effizient wie Vitamin B₁₂ und andere natürliche Cobalamine aufgenommen wird.

Co_β-2-Phenylethinylcobalamin (**3**) ist ein metallorganisches B₁₂-Derivat, das über eine kurze und außergewöhnlich starke Co-C_{sp}-Bindung verfügt. Als Folge davon ist **3** bemerkenswert resistent gegen die thermolytische Spaltung der metallorganischen Bindung. Dieses Alkinylcobalamin ist auch auffallend inert gegenüber sichtbarem Licht, zeigt sich jedoch anfällig für Säure-induzierte Zersetzung. Die Entwicklung verwandter, substituierter Alkinylcobalamine mit voraussichtlich höherer Stabilität gegenüber der Proteolyse ist daher von Interesse. Tatsächlich nutzt die hier entwickelte Methode zur Synthese von **3** die einzigartige Radikalfängerkapazität von Cob(II)alamin (**4**)^[10,26] und verspricht, ein allgemeiner Weg für die effiziente Herstellung einer Reihe von Alkinylcobalaminen zu sein.

Das Alkinylcobalamin **3** wird durch die B₁₂-Aufnahme- und B₁₂-Transportproteine gut gebunden. Im Unterschied zu Vitamin B₁₂, aber wie kürzlich für das lichtempfindliche 4-Ethylphenylcobalamin gezeigt,^[10] könnten auch inerte metallorganische Ethinylcobalamine (wie **3**) der Spaltung zu Cob(II)alamin (**4**) durch das Enzym CblC^[27] widerstehen. Die weitere metabolische Umwandlung zu den biologisch relevanten B₁₂-Cofaktoren wäre dann ebenfalls blockiert. Geeignete Ethinylcobalamine könnten also alternative lichtbeständige B₁₂-Antimetaboliten sein. Solche Verbindungen sollen jetzt entwickelt werden, um in Labortieren als lichtstabile „Antivitamine B₁₂“ und Verursacher eines induzierten „funktionellen“ B₁₂-Mangels getestet zu werden.

Eingegangen am 17. Juni 2013
Online veröffentlicht am 12. September 2013

Stichwörter: Alkine · Biometallorganische Chemie · Photochemie · Thermochemie · Vitamin B12

- [1] K. L. Brown, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2075.
- [2] K. Gruber, B. Puffer, B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4346.
- [3] R. Banerjee, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2083.
- [4] E. N. G. Marsh, C. L. Drennan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 499.
- [5] B. T. Golding, W. Buckel, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 1, Wiley, Hoboken, **2008**, S. 159.
- [6] R. G. Matthews, M. Koutmos, S. Datta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 658.
- [7] B. Kräutler, B. Puffer in *Handbook of Porphyrin Science*, Vol. 25 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific, Singapur, **2012**, S. 133.
- [8] J. Halpern, *Science* **1985**, *227*, 869.
- [9] R. G. Finke in *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 383.
- [10] M. Ruetz, C. Gherasim, S. N. Fedosov, K. Gruber, R. Banerjee, B. Kräutler, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2668; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2606.
- [11] G. C. Hayward, H. A. O. Hill, J. M. Pratt, N. J. Vanston, R. J. Williams, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6485.
- [12] E. L. Smith, A. W. Johnson, P. W. Muggleton, L. Mervyn, N. Shaw, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *112*, 565.
- [13] J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂*, Academic Press, New York, **1972**.
- [14] L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, J. Würges, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1332.
- [15] C. Kratky, B. Kräutler in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 9.
- [16] B. Kräutler, R. Konrat, E. Stupperich, G. Färber, K. Gruber, C. Kratky, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4128.
- [17] M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry*, 6. Aufl., Wiley-Interscience, Hoboken, **2007**.
- [18] L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, 3. Aufl., Cornell University Press, Cornell, **1960**.
- [19] B. Giese, M. Zehnder, M. Neuburger, F. Trach, *J. Organomet. Chem.* **1991**, *412*, 415.
- [20] B. Cordero, V. Gomez, A. E. Platero-Prats, M. Reves, J. Echavarria, E. Cremades, F. Barragan, S. Alvarez, *Dalton Trans.* **2008**, 2832.
- [21] L. Hannibal, C. A. Smith, J. A. Smith, A. Axhem, A. Miller, S. Wang, N. E. Brasch, D. W. Jacobsen, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 6615.
- [22] K. M. McCauley, D. A. Pratt, S. R. Wilson, J. Shey, T. J. Burkey, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1126.
- [23] D. A. Baldwin, E. A. Betterton, J. M. Pratt, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1983**, 225.
- [24] J. J. Shiang, A. G. Cole, R. J. Sension, K. Hang, Y. X. Weng, J. S. Trommel, L. G. Marzilli, T. Q. Lian, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 801.
- [25] S. N. Fedosov, C. B. Grissom, N. U. Fedosova, S. K. Moestrup, E. Nexo, T. E. Petersen, *FEBS J.* **2006**, *273*, 4742.
- [26] B. Kräutler, B. Puffer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9965; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9791.
- [27] R. Banerjee, C. Gherasim, D. Padovani, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 484.
- [28] CCDC 939826 (**3**; ohne Strukturfaktoren) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich..