

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchung und Aufklärung von Reaktionsnetzwerken
im Zusammenhang mit dem Ursprung des Lebens
und Implementierung der Hadamard-Transformation-Kapillarzonen-
elektrophorese auf kommerziellen Instrumenten**

Sebastian Pallmann

aus

Rostock, Deutschland

2018

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Oliver Trapp betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Waldbronn,04.12.2018..

.....Sebastian Pallmann.....

Dissertation eingereicht am 26.10.2018

1. Gutachter: *Prof. Dr. Oliver Trapp*

2. Gutachter: *Prof. Dr. Thomas Carell*

Mündliche Prüfung am 04.12.2018

*„Gedanken ohne Inhalt sind leer,
Anschauungen ohne Begriffe sind blind.“*

Emanuel Kant

Zusammenfassung

In der wissenschaftlichen Forschung wird mit der Frage nach dem Ursprung des Lebens ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet beschrieben, welches im Zusammenschluss von Physik, Astronomie, Chemie, Biologie und Geologie die Entstehung unbelebter, molekularer Bausteine für das Leben und die Mechanismen ihres Wechselspiels hin zur Bildung belebter Strukturen untersucht. Dies umfasst unter anderem die Synthese kleiner, organischer Moleküle und die Entwicklung chemischer Reaktionsnetzwerke, aber auch die Entwicklung neuer Analytikmethoden zur Identifizierung und Charakterisierung komplexer präbiotischer und biologischer Proben. In der hier vorliegenden Dissertationsschrift wurden zum einen Reaktionsnetzwerke zur Erzeugung von reaktiven Phosphorspezies und zur Darstellung von Monosacchariden vor dem Hintergrund von meteoritischen Einschlägen untersucht und zum anderen eine Methode zur Verbesserung der Sensitivität in der Analyse von ionischen Biomolekülen in wässrigen Matrices mittels Hadamard-Transform-Kapillarelektrophorese etabliert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden im Zusammenhang mit der Aufklärung von Reaktionsnetzwerken drei Projekte bearbeitet. (1) Stereodynamische Biphenyl-Liganden stellen ideale Modellsysteme für die Untersuchung von selbstamplifizierenden, autokatalytischen Systemen dar, deren Wirkmechanismen zum Verständnis für die Entwicklung der Homochiralität beitragen. Im ersten Projekt wird daher die Charakterisierung einer neuen Klasse von im Rückgrat modifizierbaren *Newcastle University*-BIPHEP(O)s vorgestellt, die mit Bindungsstellen zur Erkennung und Wechselwirkung von Substrat/Produkt-Molekülen versehen sind. Für die synthetisierten Liganden konnten Untersuchungen zur Bildung von diastereomeren Addukten sowie *on-column* Deracemisierung durchgeführt und mittels enantioselektiver dynamischer HPLC Rotationsbarrieren bestimmt werden. Die gefundenen Eigenschaften haben einen Beitrag zur Entwicklung spezifischer, stereodynamischer Liganden nach Design zum Einsatz in selbstamplifizierenden Autokatalysen geleistet. (2) In einem zweiten Projekt wurde das meteoritische Material Schreibersit, Fe_3P , dessen Verfügbarkeit durch Einschläge von astronomischen Himmelskörpern und Reaktivität in wässrigen Umgebungen als plausibel betrachtet wird, hinsichtlich der erzeugbaren Phosphoroxo-Spezies, deren Phosphorylierungsfähigkeit und Reaktivität gegenüber kleinen, biologisch relevanten Molekülen getestet. Dazu wurde eine kapillarelektrophoretische Methode zur unverfälschten Bestimmung der in Lösung vorliegenden Phosphoroxo-Spezies etabliert und die Bildung von Phosphit, Diphosphit und Phosphat über die Zeit für verschiedene Reaktionsbedingungen verfolgt. Wenngleich keine signifikante Phosphorylierungsfähigkeit des korrodierenden Materials festgestellt werden konnte, wurde die katalytische Bildung von Monosacchariden bei Anwesenheit von Formaldehyd,

Zusammenfassung

Glykolaldehyd und/oder Glyceraldehyd beobachtet. Diese unter dem Namen der Formose-Reaktion bekannte Darstellung von Zuckern wurde durch die Basifizierung des wässrigen Milieus und die Freisetzung von Eisen-Ionen durch das Schreibersit katalysiert. Diese Erkenntnisse implizieren einen möglichen gemeinsamen Ursprung von Zuckern und Phosphaten in einem Kometenteich-Szenario. (3) Ausgehend von der beobachteten Zuckersynthese durch Schreibersit wurde im dritten Projekt die Realisierbarkeit von Formose-artigen Aldolreaktionen unter nicht-wässrigen und mechanochemischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde gefunden, dass Glykolaldehyd und/oder Glyceraldehyd unter Anwesenheit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ein komplexes Monosaccharid-Netzwerk aufbauen, in welchem C4 und C6-Zucker angereichert werden. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Bildung von Monosacchariden als Bausteine und/oder Energiequelle für frühes Leben nicht nur auf wässrige Milieus begrenzt ist, sondern auch durch mechanische Krafteinwirkung wie lithosphärische Aktivität beschleunigt werden können.

Im zweiten Teil der Dissertation wird die Entwicklung einer auf Hardware-Modifikationen verzichtende Methode zur Implementierung eines Multiplexing-Ansatzes basierend auf Hadamard-Transformation in der Kapillarzonenelektrophorese dargestellt. Dabei werden die auftretenden Herausforderungen einer Umsetzung mittels Vial-Austausches und Stromunterbrechungen zur Übersetzung der pseudo-zufälligen binären Modulationssequenzen beschrieben und Lösungsstrategien diskutiert. Dazu werden simulative und experimentelle Studien präsentiert, die zeigen, dass wesentliche Einschränkungen aufgrund von Instabilitäten des elektroosmotischen Flusses durch Wahl kurzer Modulationszeiten, Detektoreinstellungen und Unterteilung langer Sequenzen in mehrere Kurze kleinerer Ordnung, die sequentiell gemessen werden, gelöst werden können. So wurden Sequenzen mit bis zu 255 Elementen/Injektionen für ein Nukleotid-Standard-Mix realisiert, die Signalverbesserungen in der Größenordnung zwischen 6.9 und 5.2 erzielt haben. Die Anwendbarkeit dieser neuen Methode, die auf kommerziell erhältlichen Systemen mittels zusätzlicher Software umsetzbar ist, wurde ferner an einem Muttermilchersatzpräparat gezeigt. Der etablierte Ansatz zur Unterteilung langer Sequenzen in kurze wurde darüber hinaus auf die Flüssigkeitschromatographie übertragen und hat dort die Realisierung von 12-bit Sequenzen mit Signal-zu-Rausch-Verstärkungen von bis zu einem Faktor von 30 ermöglicht. Signalverbesserungen in der HPLC und CE leisten einen wesentlichen Beitrag zur Identifizierung und Charakterisierung von komplexen Reaktionsgemischen.

Abstract

In scientific research, the *origin(s) of life* question is an interdisciplinary field studying the formation of inanimate, molecular building blocks of life and their mechanisms of interactions leading to the creation of living structures. This includes, for instance, the synthesis of small, organic molecules and the emergence of chemical reaction networks, but also the development of new analytical methods for the identification and characterization of complex prebiotic and biologic samples. In the here presented thesis, reaction networks for the formation of reactive phosphorus oxo species and monosaccharides were investigated, and a method for improving the sensitivity of the analysis of ionic biomolecules in aqueous matrices by means of Hadamard-transform capillary zone electrophoresis was established.

Regarding the elucidation of reaction networks, three projects are discussed in the first half of the thesis. (1) Stereodynamic biphenyl ligands are ideal model systems for the study of self-amplifying, autocatalytic systems with their mechanisms providing understanding for the manifestation of homochirality. In the first project, the characterization of a new class of *Newcastle University*-BIPHEP(O)s is presented that are modifiable in the back with sites for recognition of and interaction with substrate/product molecules. For the synthesized ligands, investigations regarding the formation of diastereomeric adducts as well as on-column deracemization were conducted, and the rotational barriers were determined employing enantioselective dynamic HPLC. The characteristics found contribute to the development of specific stereodynamic ligands by design in self-amplifying autocatalysis. (2) In a second project, the meteoritic material Schreibersite, Fe_3P , whose availability by impacts of celestial bodies and reactivity in aqueous media is considered plausible, was studied with regard to released phosphorous oxo species, their ability towards phosphorylation and their general reactivity towards small, biologically relevant molecules. In order to do so, a method based on capillary electrophoresis for unbiased identification of phosphorus oxo anions was established, and the emergence of phosphite, diphosphite and phosphate was monitored over time for different reaction conditions. Though no significant phosphorylation of the corroding material was detectable, the catalytic formation of monosaccharides in the presence of formaldehyde, glycolaldehyde and/or glyceraldehyde was observed. This synthesis of sugars known as the formose reaction was catalyzed by the basified aqueous environment and released iron ions. The results imply a possible mutual origin of sugars and phosphates in a comet pond scenario. (3) In a third project, based on the observed sugar synthesis by schreibersite catalysis, the feasibility of formose-like aldol reactions was studied under nonaqueous and mechanochemical conditions. It was found that in the presence of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ glycolaldehyde and/or glyceraldehyde give rise to a complex network of monosaccharides in which C4 and C6 sugars accumulate. The results

Abstract

visualize that the formation of monosaccharides as building blocks and/or energy source for early life is not limited to aqueous conditions but is also accelerated by mechanochemical force as through lithospheric activity.

In the second part of the thesis, the development of a method for implementing multiplexing into capillary zone electrophoresis based on Hadamard-transform and without the need of hardware modifications is presented. Challenges when performing vial exchanges and voltage suspensions for translation of pseudo random binary sequences have been identified, and solutions are discussed. In addition, simulative and experimental studies are highlighted describing crucial limitations due to electroosmotic flow instabilities. Those confinements can be resolved by (i) choosing short modulation times, (ii) setting detector configurations and (iii) subdividing longer sequences in shorter ones of low order that are run successively. This way, sequences of 255 elements/injections for a nucleotide mix were realized allowing for a signal enhancement of a factor between 6.9 and 5.2. The applicability of this new method—suitable on commercial equipment by use of a software—was, further, shown for a breastmilk substitute powder. The approach of subdividing sequences was, moreover, transferred onto HPLC equipment and allowed the realization of 12-bit sequences with an increase of the signal-to-noise ratio by nearly a factor of 30. Sensitivity enhancements in HPLC and CE contribute significantly towards the identification and characterization of complex reaction mixtures.

Wissenschaftliche Beiträge

Diese Dissertation wurde in Teilen bereits publiziert und auf Konferenzen in Form von Vorträgen und Postern vorgestellt.

Publikationen

- [5] S. Lamour*, S. Pallmann*, O. Trapp, *Prebiotic Sugar Formation Under Nonaqueous Conditions and Mechanochemical Acceleration in the Formose Reaction Network*, in preparation.
- [4] A. F. Siegle, S. Pallmann, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, 1575, 34-39, *Significant sensitivity enhancement in Hadamard transform HPLC by application of long modulation sequences constructed from lower order sequences.*
- [3] S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Šteflová, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, 90, 8445-8453, *Direct Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis without Instrumental Modifications.*
- [2] S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, 20, 055003, *Schreibersite: an effective catalyst in the formose reaction network.*
- [1] G. Storch, S. Pallmann, F. Rominger, O. Trapp, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, 12, 1453-1458, *Stereodynamic tetrahydrobiisoindole "NU-BIPHEP(O)"s: functionalization, rotational barriers and non-covalent interactions.*

* geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

- [5] S. Pallmann, O. Trapp, *The Origin(s) of Life and the Challenges in Analytics*, Lab Manager Day, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, **11.09.2018**.
- [4] S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Šteflová, O. Trapp, *Realization of Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis on a Standard and Unmodified CE*

Instrumentation, 28. Doktorandenseminar Hohenroda, Hohenroda, Deutschland, **07-09.01.2018**.

- [3] S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Šteflová, O. Trapp, *Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis (HT-CZE) – Benefits and Limitations of a Multiplexing Technique on an Unmodified Standard CE System*, CE- & FFE-Forum, Fraunhofer Institute for Chemical Technology ICT, Berghausen (Karlsruhe), Deutschland, **05/06.10.2017**.
- [2] S. Pallmann, O. Trapp, *Scouting Chemical Networks*, HIFOL Colloquia, Max Planck Institute for Astronomy, Heidelberg, Deutschland, **26.07.2017**.
- [1] S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Šteflová, O. Trapp, *Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis (HT-CZE) – Benefits and Limitations of a Multiplexing Technique on an Unmodified Standard CE System*, Kohlrausch Seminar, Prag, Tschechien, **15-17.06.2017**.

Posterbeiträge

- [5] S. Lamour, S. Pallmann, O. Trapp, *Prebiotic Sugar Formation under Mechanochemical Conditions*, Molecular Origins of Life, CAS Conference 2018, München, Deutschland, **11/12.10.2018**.
- [4] M. Haas, S. Lamour, S. Pallmann, O. Trapp, *Separation of complex monosaccharide mixtures and its application to the analysis of a formose network catalyzed by corroded Schreibersite*, Molecular Origins of Life, CAS Conference 2018, München, Deutschland, **11/12.10.2018**.
- [3] S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Šteflová, O. Trapp, *Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis (HT-CZE) – Benefits and Limitations of a Multiplexing Technique on an Unmodified CE System*, HPLC, Prag, Tschechien, **17-22.06.2017**.
- [2] S. Pallmann, J. Šteflová, O. Trapp, *Analysis of Inorganic Phosphorus Oxyanions by Capillary Zone Electrophoresis*, CECE, Brünn, Tschechien, **17-19.10.2016**.
- [1] S. Pallmann, G. Storch, O. Trapp, *Stereodynamic Characterization of Tetrahydro-Biisoindole „NU-BIPHEP(O)s“*, Chirality, Heidelberg, Deutschland, **24-27.07.2016**.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| 1. Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 3. Kenntnisstand | 5 |
| 3.1. <i>Der Ursprung des Lebens</i> | 5 |
| 3.1.1. Chemische Evolution | 6 |
| 3.1.2. Phosphorylierungen | 10 |
| 3.1.3. Monosaccharidsynthese | 15 |
| 3.1.4. Homochiralität | 19 |
| 3.2. <i>Multiplexing basierend auf Hadamard-Transformation</i> | 24 |
| 3.2.1. Multiplexing mittels Hadamard-Transformation | 25 |
| 3.2.2. Multiplexing in Chromatographie und Kapillarelektrophorese | 30 |
| 4. Aufgabenstellung | 37 |
| 5. Veröffentlichte Arbeiten | 41 |
| 5.1. <i>Stereodynamische Tetrahydrobiisindol „NU-BIPHEP(O)“s: Funktionalisierung, Rotationsbarrieren und nicht-kovalente Wechselwirkungen</i> | 41 |
| 5.2. <i>Schreibersit: ein effektiver Katalysator im Formose Netzwerk</i> | 65 |
| 5.3. <i>Direkte Hadamard-Transformations-Kapillarzonenelektrophorese ohne instrumentelle Modifikationen</i> | 91 |
| 5.4. <i>Signifikante Verbesserung in der Empfindlichkeit in der Hadamard-Transformations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durch Anwendung langer Modulationssequenzen, die aus Sequenzen kleinerer Ordnung konstruiert sind</i> | 117 |
| 6. Unveröffentlichte Arbeiten | 129 |
| 6.1. <i>Präbiotische Zuckerbildung unter wasserfreien Bedingungen und mechanochemische Beschleunigung im Formose Netzwerk</i> | 129 |
| 7. Zusammenfassung | 145 |
| 8. Danksagung | 153 |
| 9. Literaturverzeichnis | 155 |

1. Abkürzungsverzeichnis

1.1. Abkürzungen

| Abkürzung | Deutsche Bedeutung |
|---------------------------|---|
| BGE | Hintergrundpuffer |
| BTEX | Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol-Isomere |
| C2, C3, C4, ... | Monosaccharide der Kettenlänge 2, 3, 4, ... |
| CE | Kapillarelektrophorese |
| CZE | Kapillarzonenelektrophorese |
| DNA/RNA | (Desoxy)ribonukleinsäure |
| ee | Enantiomerenüberschuss |
| EOF | Elektroosmotischer Fluss |
| G (G_{HT}) | Signalverstärkung (durch Hadamard-Transformation) |
| GC | Gaschromatographie |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HT | Hadamard-Transformation |
| IC-ESI-MS | Ionenchromatographie mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie |
| IR | Infrarot |
| LIF | Laser-induzierte Fluoreszenz |
| LUCA | Letzter universeller gemeinsamer Vorfahre |
| MISER | Multiple Injektionen in einem singulären, experimentellen Lauf |
| MS | Massenspektrometrie |
| NMR | Kernspinresonanz |
| NU-BIPHEP | Newcastle University 2,2'-Bis(diphenylphosphino)biphenyl |
| PRBS | Pseudo-zufällige binäre Sequenz |
| RT | Raumtemperatur |
| SNR | Signal-zu-Rausch-Verhältnis |
| UV | Ultraviolett |
| VIS | Sichtbares Licht |

1.2. Formelzeichen und Einheiten

| Formelzeichen und Einheiten | Deutsche Entsprechung |
|---|---|
| $\Delta G_{298\text{ K}}^{\ddagger}$ [kJ/mol] | Freie Standard Gibbs-Energie |
| a.u. | Willkürliche Einheiten |
| AU | Absorptionseinheiten |
| c [mol] | Konzentration |
| Δt | Modulationsintervall |
| H | Hadamard-Matrix |
| I | Einheitsmatrix |
| m | Ordnung des Polynoms und typische Kenngröße für die Länge einer PRBS |
| n | Ordnung der Matrix |
| N | Anzahl an Elementen |
| | Magnitude des Rauschens |
| pH | Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität |
| pK_a/pK_b | Säure/Basekonstante |
| σ | Standardabweichung |
| S | Simplex Matrix |
| | Signalintensität |
| x | Einzelinformation |
| X | Überlagertes Multiplexing-Signal |

2. Einleitung

Vor dem historischen Hintergrund der Veröffentlichung von Charles Darwins revolutionärer Entwicklungstheorie in dem Buch *On the Origin of Species*¹ 1859¹ formulierte sich in der Folge einer sich wegbereitenden Loslösung von gesellschaftlichen und religiösen Doktrinen die Fragestellung nach dem evolutionären Ausgangspunkt der Organismen, dem *Ursprung des Lebens*. Charles Darwin selbst mutmaßte in einem Brief an J. D. Hooker dabei so: „But if [...] we could conceive in some warm little pond with all sorts of ammonia and phosphoric salts, - light, heat, electricity [...] that a protein compound was chemically formed, ready to undergo still more complex changes, [...] such matter would be instantly devoured [...] which would not have been the case before living creatures were formed.“² Der Anfang dieser sogenannten „warmer, kleiner Teich“-Theorie, in der Darwin den Ursprung des Lebens in einem stickstoff- und phosphorreichen Gewässer unter Einfluss von Licht, Temperatur und elektrischer Entladung skizziert, war Wegbereiter für zahlreiche, folgende Beiträge, von denen beispielhaft hier auf die Pionierarbeiten von Oparin,³⁻⁵ Haldane,^{6,7} Miller^{8,9} und Urey^{10,11} sowie Wächtershäuser¹²⁻¹⁶ und Orgel¹⁷⁻²¹ verwiesen sein soll.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich die Fragestellung nach der Entwicklung des Lebens zu einem interdisziplinären Forschungsgebiet etabliert, welches eine Vielzahl an Theorien und Modellen hervorgebracht hat, die in ihrer Vielfalt so unterschiedlich und zahlreich sind wie die molekularen Bestandteile, aus denen das Leben zusammengesetzt ist. Zu diskutierten Szenarien für den Ursprung/die Ursprünge des Lebens zählen neben dem *warmen, kleinen Teich*² *hydrothermale Schlote*,²²⁻²⁵ *vulkanische Umgebungen*,^{26,27} *austrocknende Lagunen*,²⁸⁻³⁰ *die Ursuppe*,^{31,32} *eutektische Lösungen*^{33,34} und *mit Wasser gefüllte Kometenkrater*.³⁵⁻³⁷ Die Verschiedenheit dieser Theorien hat ihre Ursache in der Ungewissheit über vorherrschende Reaktionsbedingungen, unter denen das Leben auf der Erde entstanden sein könnte.³⁸⁻⁴¹ Parameter wie Temperatur, Druck, Lösemittel, pH-Wert, umgebende oberflächenaktive Materialien, Konzentration an Ausgangsstoffen und Strahlungsintensität sind über eine große Spannweite denkbar und unter Berücksichtigung von Tages-Nacht- sowie Jahreszeitenzyklen, Gezeiten und Wetter- sowie Klimaveränderungen nicht als konstant anzunehmen. Insbesondere diese Unbeständigkeit der Reaktionsbedingungen ist in diesem Zusammenhang wohlmöglich bestimmende Voraussetzung für die Entstehung des Lebens, da durch sie chemische Reaktionsnetzwerke stetig aus ihrem Gleichgewicht getrieben und so neue Reaktionswege eröffnet werden, die zu einer wachsenden Komplexität beitragen.

¹ Vollständiger Titel der Veröffentlichung: *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*.

Einleitung

Begründet in der Mehrdimensionalität der Fragestellung umfasst die Forschung nach dem Ursprung des Lebens eine Vielzahl an Fachbereichen, die im Wesentlichen Astrophysik und Geochemie, analytische und organische Chemie, Biochemie sowie synthetischen Biologie und Evolutionsbiologie beinhaltet. Zu den zentralen Fragestellungen zählen:

- Bildung von organischem Material im Weltall, insbesondere in Gas- und Staubnebeln sowie auf und in astronomischen Himmelskörpern
- Entstehung von kleinen, organischen Molekülen durch atmo-, hydro- und lithosphärische Prozesse auf der Erde
- Bildung und Funktionsweise von Reaktionsnetzwerken unter verschiedenen und wechselnden Umweltbedingungen
- Identifizierung von Biokatalysatoren
- Untersuchung von selektiven und robusten Reaktionswegen hin zu biologisch relevanten Molekülen wie Coenzymen, Nukleotiden, Chromophoren, Amphiphilen, Zuckern, Aminosäuren und Phosphaten
- Synthese von funktionalen Biopolymeren wie RNA, DNA, Proteinen und Polysacchariden
- Aufklärung von Wirkungsprinzipien wie Amplifizierung, Autokatalyse, Symmetriebruch und Selbstassemblierung
- Entstehung von zellähnlichen Strukturen und sich selbsterhaltenden Netzwerken, z.B. Lipid-Doppelmembranen, Metabolismen, enzymatischer Evolution, Signalübertragungsketten und genetischer Information
- Übergang von chemischer zu Darwin'scher Evolution
- Manifestierung der ersten Protozellen
- Entwicklung neuer analytischer Methoden zur Bestimmung, Auflösung und Charakterisierung von molekularen Reaktionsnetzwerken.

Diese Dissertation soll einen Beitrag leisten in der Identifizierung und der Aufklärung von Reaktionsnetzwerken im Hinblick auf die abiotische Synthese von Zuckern und phosphorhaltigen organischen Molekülen. In diesem Kontext steht daneben die Verbesserung der Sensitivität in der Analyse von ionischen Biomolekülen in wässrigen Matrices durch die Etablierung der Hadamard-Transform-Kapillaronenelektrophorese im Fokus.

3. Kenntnisstand

Im Folgenden sollen relevante Hintergrundinformationen für die in dieser Dissertation bearbeiteten Fragestellungen vorgestellt werden. Dazu wird in einem ersten Teil der Stand der Forschung in Bezug auf den Ursprung des Lebens zusammengefasst, wobei im Speziellen der Fokus auf der abiotische Synthese von Kohlenhydratmonomeren, der geochemischen Verfügbarkeit von reaktiven Phosphorspezies sowie auf Prinzipien zur Chiralitätsamplifizierung liegt. In einem zweiten Teil werden Grundlagen und Anwendungen zum auf Hadamard-Transformation basierten Multiplexing eingeführt, mit welchem Sensitivitätssteigerungen in Spektroskopie und Trenntechniken wie Flüssigkeitschromatographie und Kapillarelektrophorese erreicht werden können.

3.1. Der Ursprung des Lebens

Unter der Wortgruppe „Ursprung des Lebens“ – oder gegebenenfalls besser „Ursprünge des Lebens“ – wird im wissenschaftlichen Umfeld ein interdisziplinäres Forschungsgebiet verstanden, welches sich mit den astronomischen, chemischen, biophysikalischen und geologischen Voraussetzungen für die Entstehung von Leben im Sonnensystem und auf Exoplaneten sowie dessen Entwicklung auf verschiedensten chemischen Stufen befasst. Trotz des schon hundertjährigen Alters dieser Forschungsrichtung bestehen für fundamentale Begrifflichkeiten wie „Leben“ und „plausible präbiotische Bedingungen“ keine einheitlichen Definitionen oder allgemein gültige Anschauungen.⁴²⁻⁴⁷ Während in der Biologie Leben durch spezifische Eigenschaften wie (a) Stoff- und Energiewechsel, (b) Bewegung, (c) Reizbarkeit und Selbstregulation, (d) Wachstum und Individualentwicklung, (e) Fortpflanzung und Vermehrung sowie (f) Evolution charakterisiert wird,^{48,49} wird im astrochemischen Zusammenhang Leben zu einem „sich selbsterhaltenden System mit der Fähigkeit zur Darwin’schen Evolution“ abstrahiert.⁴⁵ Der Unterschied beider Begriffsbestimmungen lässt sich am Beispiel von Viren illustrieren.^{50,51} Viren sind mit Nukleinsäuren gefüllte Proteinkapseln, die keinen eigenen Metabolismus (a) und selbstständiges Wachstum (d) zeigen und daher aus biologischer Sicht nicht als Leben klassifiziert werden. Sie fallen aber unter die astrochemische Definition, da sie sich systemisch erhalten und genetisch weiterentwickeln können. Diese Unterscheidung wird mitunter als spitzfindig empfunden, veranschaulicht aber im Besonderen, dass die Entstehung des (biologischen) Lebens als das Ergebnis einer sequentiellen Entwicklung von Eigenschaften verstanden werden kann; mit Viren als Analogon einer vermeintlichen Zwischenstufe hin zu zellulärem Leben. Da Eigenschaften durch Moleküle unterschiedlichster Komplexität und deren Interaktion miteinander vermittelt werden, impliziert dies eine vor-Darwin’sche Evolution

von molekularen Strukturen und Verbindungen. In diesem Zusammenhang wurde daher der Begriff „chemische Evolution“ geprägt.

3.1.1. Chemische Evolution

Basierend auf der Darwin'schen Evolutionstheorie¹ liegen der Entwicklung von Lebewesen verschiedene Wirkmechanismen zugrunde: Replikation, Mutation, Variation, Selektion sowie Zuchtwahl und Isolation. In dem Gefüge eines Selektionsdruck auf Grundlage von sich verändernden Lebensbedingungen setzen sich solche Individuen durch, die innerhalb der Population durch zufällige Mutationen die beste Anpassung zeigen. Diese Adaption wird an folgende Generationen vererbt und führt über eine längere Zeitspanne unterstützt durch territoriale Abgrenzung zur Ausbildung neuer Arten. Dabei nehmen Komplexität und Höhenentwicklung der Organismen im Regelfall zu. Molekulare Grundlage der Evolutionstheorie ist das genetische Erbmaterial, DNA und RNA, sowie die Reproduktions- und Reparaturmechanismen der ebenselben, Proteine.⁵² In logischer Konsequenz stellt sich die Frage, ob auch die Entstehung komplexer funktionaler Polymere wie DNA/RNA und Proteine als Stufe hin zu biologischem Leben vergleichbaren, aber chemischen Prinzipien unterworfen ist, die folglich unter chemischer Evolution zusammengefasst werden können.^{53,54} **Tabelle 1** soll einen funktionalen Überblick über mögliche Analogien zwischen Darwin'scher und chemischer Evolution geben.

Tabelle 1. Vergleich zwischen Darwin'scher und chemischer Evolution.

| | Darwin'sche Evolution | Chemische Evolution |
|------------------------|--|---|
| System | Population an Individuen | Satz an Reaktionsnetzwerken |
| Eigen-schaften | Nukleotid codierte Proteine | Geschwindigkeitskonstanten und thermodynamische Potentiale |
| Replikation | Zellteilung | Ausbreitung/Verschmelzung mit umliegenden Reaktionsnetzwerken |
| Mutation | Zufällige Veränderungen in Nukleotidsequenz | Eintrag und Präzipitation von Molekülen im Netzwerk |
| Variation | Individuen mit unterschiedlichen Eigenschaften | Konzentration und Zusammensetzung in Sätzen von Reaktionsnetzwerken |
| Selektion | Anpassung und Zuchtwahl | Robustheit |
| Selektionsdruck | Sich ändernde Umwelteinflüsse | |
| Isolation | Sich ändernde geologische Morphologie | |

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Theorien der Darwin'schen und chemischen Evolution besteht vor allem darin, dass letztere noch nicht in allgemein anerkannter

Form beschrieben und bestätigt wurde. Derzeit handelt es sich bei dem Begriff der chemischen Evolution eher um ein gedankliches Experiment, mit dessen Hilfe gerichtete Entwicklung innerhalb eines Reaktionsnetzwerkes verbildlicht werden soll. Die wesentliche Idee besteht darin, dass auch für komplexe Reaktionen innerhalb eines geochemischen Reaktionsgefäßes Prinzipien wie Mutation durch beispielsweise Synthese oder Präzipitation und Anpassung durch Änderung von Reaktionswegen (Kinetik und Thermodynamik) gültig sein können. Selektion wird in diesem Zusammenhang vornehmlich mit physikochemischen Eigenschaften wie Hydrolyse- und Photolyse-Empfindlichkeit sowie Löslichkeit- und Adsorptionsfähigkeit verbunden. Solche Betrachtungen wurden aber bisher noch nicht in detaillierter Weise auf potentielle Reaktionsnetzwerke übertragen. Theoretische Überlegungen wurden unter anderem für die Bildung und Selektion von hypothetischen Oligomeren beschrieben.⁵³

Ein verallgemeinerter, potentieller Ablauf von Ereignissen auf dem Weg zur Entstehung des ersten Lebens auf der Erde, dem sogenannten letzten, universellen, gemeinsamen Vorfahren „LUCA“ (*last universal common ancestor*),⁵⁵ ist in **Abbildung 1** wiedergegeben.

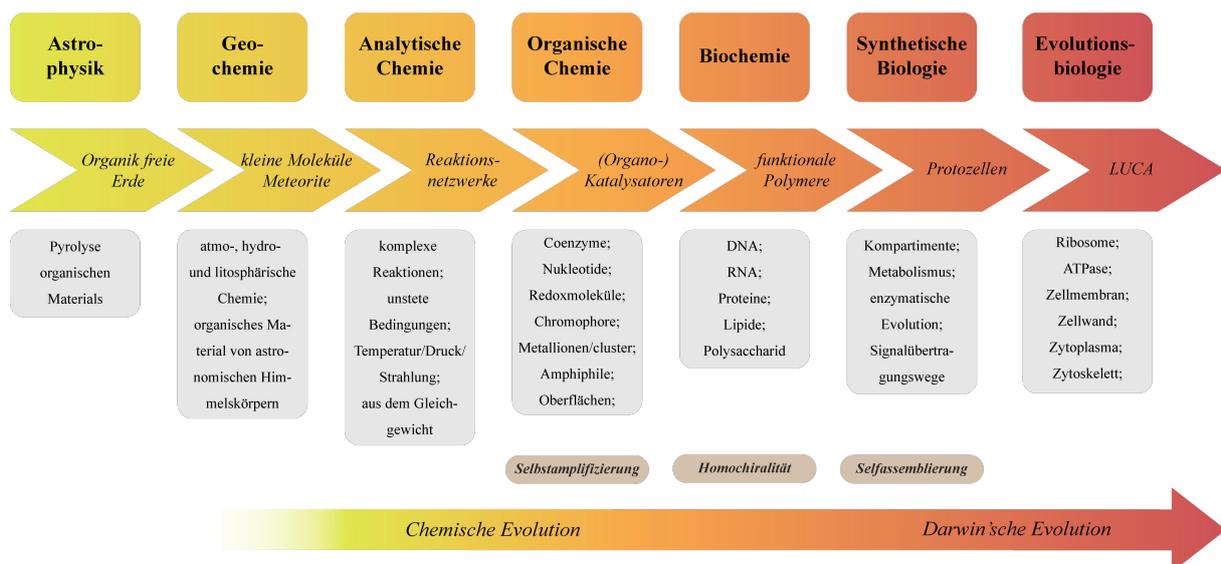


Abbildung 1. Eine mögliche Abfolge von Ereignissen auf dem Weg zum letzten, universellen, gemeinsamen Vorfahren „LUCA“. Zusätzlich sind die beteiligten wissenschaftlichen Disziplinen und charakteristische Moleküle angegeben. Abbildung übersetzt aus S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/aabb99>.⁵⁶ Copyright durch die Creative Commons Attribution License 3.0.

Dabei wird davon ausgegangen, dass bei der Entstehung der Erde alle vorhandenen organischen Moleküle pyrolysiert worden sind.^{57,58} Erst in der Folge mit Abkühlung der Erdoberfläche und dem Ausgasen der Erdkruste sind durch atmo-, hydro- und lithosphärische Prozesse einfache Moleküle gebildet worden, die als Grundlage für die Entstehung von

Reaktionsnetzwerken dienen konnten. Zusätzlich wird angenommen, dass insbesondere während des *Großen Bombardements*, einer Zeitepoche in der frühen Phase der Erde, in welcher durch die Verschiebung der Planetenbahnen Einschläge von Asteroiden und Meteoriten signifikant erhöht war,⁵⁹ der Eintrag von organischem Material durch astronomische Himmelskörper einen wesentlichen Anteil an dem präbiotischen Inventar ausgemacht hat. Schätzungen zum Beitrag von Meteoritenmaterial sind Model-abhängig. Eine Größenordnung von 10^{22} kg ist eine aktuelle und anerkannte Lehrmeinung.⁶⁰ Der Nachweis organischen Materials auf solchen Himmelskörpern ist durch Untersuchungen von Meteoriten⁶¹⁻⁶⁵ und durch die Analyse des Kometen 67P/Tschurjumow-Gerassimenko^{66,67} belegt. Dabei konnten einfache Verbindungen wie beispielhaft Cyanwasserstoff, Methylamin, Acetonitril, Acetaldehyd, Formamid und Glykolaldehyd nachgewiesen werden wie auch komplexere Verbindungen so zum Beispiel Aminosäuren und Kohlenwasserstoffe. Für unter anderem diese Moleküle wird angenommen, dass sie Reaktionsnetzwerke formen, in denen sich durch evolutionäre Mechanismen und unter sich ändernden Umweltbedingungen komplexere Moleküle bilden können, welche Redox-, Foto- und/oder Katalyseeigenschaften sowie Amphiphilie aufweisen. In solchen sich wandelnden und schließlich selbsterhaltenden Netzwerken werden letztlich funktionale Monomere und Polymere gebildet, die durch Selbstassemblierung und einsetzende Darwin'sche Evolution die ersten Protozellen generieren.^{57,58} Entlang dieses Weges stellen sich allerdings noch unzählige, offene Fragen. Eine wesentliche befasst sich mit den „plausiblen Reaktionsbedingungen“, unter denen experimentelle Versuche nachgestellt werden sollten.

Zu dieser Fragestellung ist in **Abbildung 2** schematisch die Erdgeschichte zusammen mit Meilensteinen in der Entwicklung des Lebens sowie Eiszeiten, Urkontinenten und charakteristischen Konzentrationen an Sauerstoff, Eisen und Schwefel dargestellt.⁶⁸⁻⁷⁰ Die frühesten nachweislich und wissenschaftlich anerkannten Fossilien von Leben auf der Erde sind sogenannte Stromatolithen,^{71,72} unter welchen Sedimentgesteine verstanden werden, die durch Ablagerungen von Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen entstehen. Diese Stromatolithen konnten auf ein Alter von 3,5 Milliarden Jahren geschätzt werden^{71,72} und platzieren LUCA damit in das geologische Zeitalter des Eoarchaikums zwischen 4.0 und 3.5 Milliarden Jahren. Dies bedeutet, dass das Leben bereits nach einer Milliarden Jahre nach Formierung der Sonne und der Erde entstanden ist. Eine sequentielle Bildung immer komplexerer Moleküle bis hin zu funktionellen Polymeren, wie sie in **Abbildung 1** gezeigt ist, fällt somit in die früheste Phase der Erde, dem Hadaikum, über welches hinsichtlich geochemischer Reaktionsbedingungen nur wenig bekannt ist.^{38-40,73} So lassen sich die Umweltbedingungen lediglich innerhalb großer Intervalle extrapolieren. Temperaturen zwischen Minusgraden und 200 °C sind denkbar.⁴¹ Dieses Spannungsfeld hat seine Ursache in dem Wechselspiel einer CO₂ reichen Atmosphäre und einer noch jungen, leistungsschwachen Sonne (*young sun paradox*). Mit Abnahme des Kohlenstoffdioxids in der Atmosphäre durch Bindung des Gases in Gesteinen und sich

bildenden Ozeanen nahm aller Wahrscheinlichkeit nach auch der Atmosphärendruck global von etwa 200 bar allmählich auf 1 bar ab.⁵⁸ Regional kann dies allerdings durch vulkanische Aktivität abweichen. Unterschiede ergeben sich zudem auch für mögliche Reaktionsorte, die durch das mineralogische Inventar verschiedener Szenarien geprägt wird.⁷⁴ Variabilität wird des Weiteren durch eine inkonsistente Strahlungsdichte (sich ändernde Atmosphärenzusammensetzung, Tages- und Nachtzyklen) bedingt. Letztlich stellt sich die Frage, ob nicht die unwirklichen Bedingungen des Hadaikum mit seinen sich stetig ändernden Umwelteinflüssen essentiell für die Entstehung des Lebens gewesen sind, da durch sie stetig Triebkraft in molekularen Reaktionsnetzwerken vorhanden war, welche die Systeme aus ihrem chemischen Gleichgewicht gelenkt hat. Die fehlende Gewissheit über die tatsächlichen Reaktionsbedingungen machen die Verwendung der Phrase „plausible präbiotische Bedingungen“ anschauungslos. Sie erklärt darüber hinaus die Vielzahl an postulierten Szenarien für die Entstehung des Lebens.

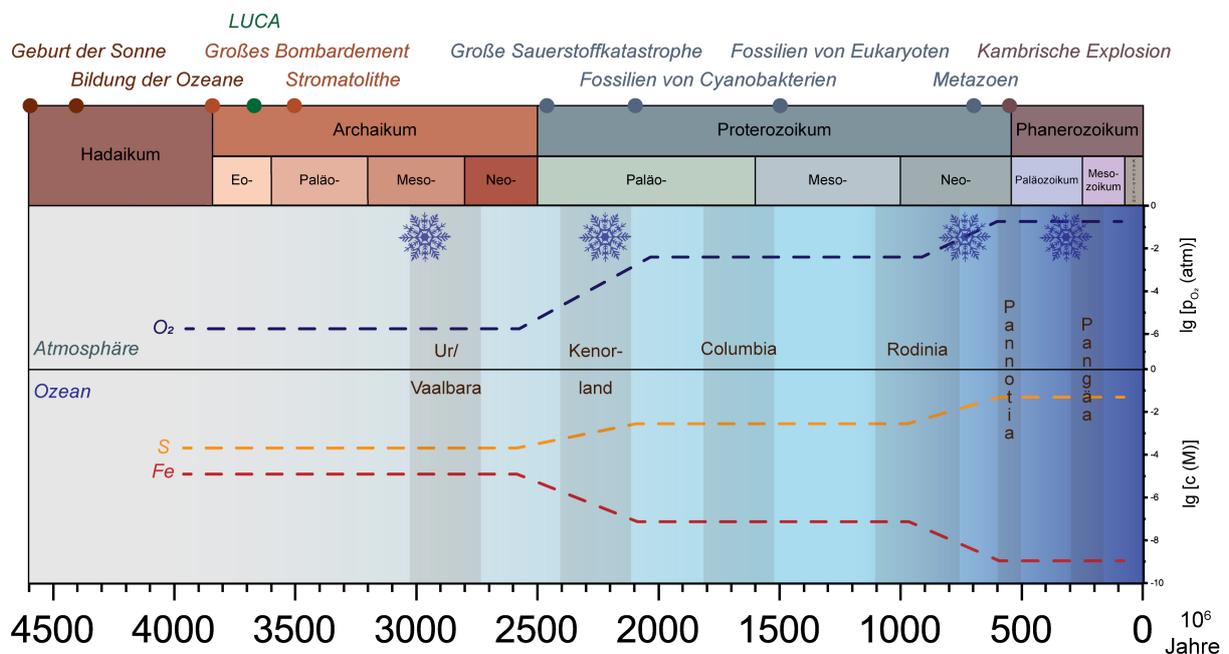


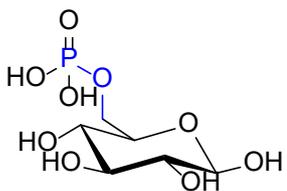
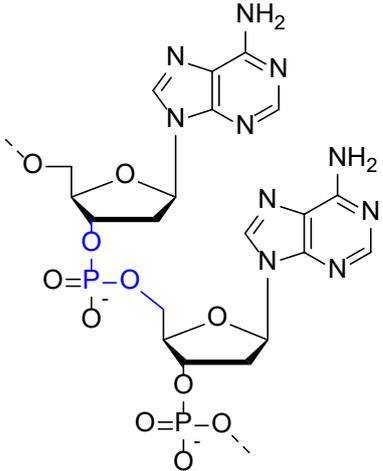
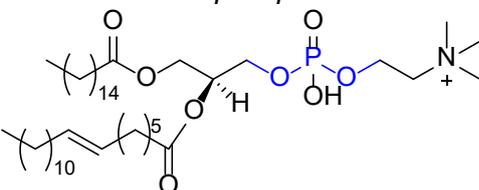
Abbildung 2. Erdgeschichte von der Entstehung der Sonne bis in die Neuzeit. Vermerkt sind zudem Meilensteine auf dem Weg zum modernen Leben, Eiszeiten und Urkontinente. Die Abbildung enthält außerdem Angaben zur ungefähren Konzentration von Sauerstoff in der Atmosphäre und von Schwefel sowie Eisen in den Ozeanen. Die Abbildung ist inspiriert von MaxPlanckForschung 3/15, S. 70-77⁶⁸ und enthält Daten von M. A. Saito, D. M. Sigman, F. M. M. Morel, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, 356, 308-318⁶⁹ und R. D. Nance, J. B. Murphy, M. Santosh, *Gondwana Research* **2014**, 25, 4-29.⁷⁰

3.1.2. Phosphorylierungen

Innerhalb der Forschung zum Ursprung des Lebens nimmt die Fragestellung nach dem Einbau von Phosphor beziehungsweise Phosphat einen eigenen Schwerpunkt ein. Dies begründet sich in der Herausforderung, Phosphor geochemisch verfügbar, gegebenenfalls löslich und reaktiv zu machen.

Für das Leben auf der Erde stellt Phosphor einen essentiellen Bestandteil dar, der in unterschiedlicher Weise und Konnektivität in molekularen Strukturen vorkommt und diverse Eigenschaften übernimmt. Eine Zusammenstellung der Phosphorverbindungen und deren Funktionen in Zellen ist in **Tabelle 2** gezeigt.

Tabelle 2. Überblick über phosphorhaltigen Verbindungen in zellulärem Leben auf der Erde.

| Verknüpfung | Verbindungs-kategorie | Beispiele | Eigenschaften/Funktion |
|-------------|-----------------------|--|---------------------------------------|
| O-P-O | Freies Phosphat | PO_4^{3-} | Membranpotential, Signalstoff, Puffer |
| O-P-O-C | Monoester | <p><i>Glucose-6-phosphat</i></p>  | Metabolismus (Glykolyse) |
| C-O-P-O-C | Diester | <p><i>DNA/RNA</i></p>  | Genetik |
| | | <p><i>Phospholipide</i></p>  | Kompartimentierung |

| | | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|
| P-O- C(=O) | Gemischtes Anhydrid | <i>Acetylphosphat</i> | Metabolismus (Propionsäuregärung) |
| | | <i>1,3-Bisphosphoglycerat</i> | Metabolismus (Glykolyse und Calvin-Zyklus) |
| P-O- C(=C) | Vinylester | <i>Phosphoenolbrenztraubensäure</i> | Metabolismus (Glykolyse, Gluconeogenese, Hatch-Slack-Zyklus) |
| P-N- C(=N)-N | Phosphono-carbami-midoyl | <i>Phosphokreatin</i> | Energiequelle (ATP Regenerierung) |
| P-O-P | Anhydrid | <i>Adenosintriphosphat</i> | Energie |
| P-C | Phosphonat | <i>2-Aminoethylphosphonat</i> | Metabolismus |

Allen in **Tabelle 2** gezeigten Strukturen ist gemein, dass Phosphor als Phosphat und Phosphonat auch bei bivalenter Konnektivität – wenn außerhalb sehr saurer Bedingungen ($pK_a = 2,16; 7,21; 12,67$ bzw. $1,30; 7,09$)⁷⁵ – ionisch vorliegt. Durch die eingeführte(n), negative(n) Ladung(en) vermittelt Phosphat/Phosphonat nicht nur Löslichkeit in wässrigem Milieu, sondern schützt auch vor Hydrolyse und begrenzt die Diffusionsfähigkeit aus einem Membran umhüllten Raum.⁷⁶ Trotz dieser essentiellen Eigenschaften für zum Beispiel die Stabilität und Lokalisierung von DNA und RNA in einer Zelle, ist bisher nicht geklärt, wie Phosphor innerhalb eines geochemischen Settings mobilisiert und zur Reaktion gebracht werden kann. Im Folgenden sollen beide Aspekte ausgeführt werden.

Ursächlich für die geringe Bioverfügbarkeit von Phosphor ist die geringe Löslichkeit der stabilsten Oxidationsstufe des Elementes. Während es keine volatile Phase von Phosphor unter den physikalischen Bedingungen der Erde gibt, tritt seine solide Phase vornehmlich in der

Oxidationsstufe 5 auf, die bei Anwesenheit zweiwertiger Kationen Löslichkeiten in der Größenordnung von 10^{-2} bis 10^{-8} mol/L zeigen.⁷⁷ Die geringe Löslichkeit bleibt dabei in einem pH-Bereich zwischen pH 3 und 14 im Wesentlichen erhalten.⁷⁶ Zusätzlich zu dieser geringen Verfügbarkeit von gelöstem Phosphat kommt die Lithophilie des Elements, aufgrund dessen 95 % des Gesamtmaterials im Kern während der Entstehung der Erde konzentriert wurde. Die Erdkruste selbst enthält nur 650 ppm Phosphor.^{76,78} Neben einer Reihe verschiedenster Phosphatminerale zählen zum mineralogischen Inventar der frühzeitlichen Erde auch Phosphide, die aufgrund ihrer geringen Oxidationsstufe andere physikochemische Eigenschaften zeigen als die Phosphate. Auf einen wesentlichen Vertreter, den Schreibersit, soll im späteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen werden. Phosphide werden durch Meteoriteneinschläge auf die Erde eingetragen oder können alternativ durch Reduktion von Phosphatmineralien bei unter 300 °C in hydrothermalen Schloten oder bei 500 - 1500 °C in kohlehaltigen Gesteinen gebildet werden.⁷⁹⁻⁸¹ Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass der wesentliche Anteil durch astronomische Himmelskörper in einer Größenordnung von 10^{17} und 10^{19} kg Phosphor eingetragen wurde.⁷⁹ Eine umfassende Liste über die Phosphor enthaltenden Minerale auf der Erde zur Zeit des Hadaikums ist in **Tabelle 3** zusammengestellt.

Tabelle 3. Mineralogisches Phosphor Inventar zur Zeit des Hadaikums auf der Erde.^{74,76}

| Klassifizierung | Mineral | Formel |
|-----------------|------------------|--|
| Phosphid | Nickelphosphid | Ni_3P |
| | Perryit | $(\text{Ni,Fe})_8(\text{Si,P})_3$ |
| | Schreibersit | $(\text{Fe,Ni,Cr})_3\text{P}$ |
| Phosphat | Beusit | $(\text{Mn}^{\text{II}},\text{Fe}^{\text{II}},\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ |
| | Bobbierit | $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ |
| | Childrenit | $\text{Fe}^{\text{II}}\text{AlPO}_4(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| | Chlorapatit | $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ |
| | Farringtonit | $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| | Fluorapatit | $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ |
| | Galileit | $\text{NaFe}^{\text{II}}(\text{PO}_4)_3$ |
| | Graftonit | $(\text{Fe}^{\text{II}},\text{Mn}^{\text{II}},\text{Ca})_3(\text{PO}_4)_3$ |
| | Hydroxylapatit | $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ |
| | Johnsomervilleit | $\text{Na}_{10}\text{Ca}_6\text{Mg}_{18}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{PO}_4)_{36}$ |
| | Lüneburgit | $\text{Mg}_3\text{B}_2(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ |
| | Merrillit | $\text{Ca}_9\text{NaMg}(\text{PO}_4)_7$ |
| | Monazit-(Ce) | CePO_4 |
| | Newberyit | $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ |
| | Sarcopsid | $\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4)_2$ |

| | |
|-------------|--|
| Stanfieldit | $\text{Ca}_4\text{Mg}_5(\text{PO}_4)_6$ |
| Struvit | $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |
| Triplit | $(\text{Mn}^{\text{II}}, \text{Fe}^{\text{II}})_2\text{PO}_4(\text{F}, \text{OH})$ |
| Vivianit | $\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| Wagnerit | $\text{Mg}_2\text{PO}_4\text{F}$ |
| Wavellit | $\text{Al}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ |
| Whitlockit | $\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6(\text{PO}_3\text{OH})$ |
| Xenotim | $(\text{Y}, \text{Yb})(\text{PO}_4)$ |

Die geringe Reaktivität von Phosphaten gegenüber organischen Komponenten wurde bereits 1989 im Zusammenhang mit der Forschung am Ursprung des Lebens durch Orgel mit dem „Phosphat-Problem“ beschrieben.⁸² Da es sich bei der Reaktion von Phosphat mit einem organischen Molekül mit Hydroxylfunktionalität um eine Kondensationsreaktion handelt, sind solche Reaktionen im wässrigen Milieu thermodynamisch ungünstig. Hinzu kommen die nur sehr geringen Konzentrationen an freiem Phosphat bedingt durch die bereits herausgestellte begrenzte Löslichkeit bei Anwesenheit von zweiwertigen Kationen. Um Phosphorylierungsreaktionen zu realisieren,⁸³ sind daher folgende Strategien notwendig:

- Mobilisierung von Phosphaten durch Chelatliganden für Di-Kationen^{76,84}
- Phosphat-Solubilisierung durch Mineraltransformationen⁸⁵ unter anderem mit Boraten⁸⁶
- Elektrophile Aktivierung durch Kondensierungsreagenzien wie Cyanoacetylen,⁸⁷ Cyanogen,^{17,88} Cyanamid^{17,89} und Cyanat¹⁷ durch Bildung von reaktiven Zwischenstufen⁹⁰
- Bildung von Polyphosphaten^{91,92} durch Kondensierungsreagenzien,⁹³⁻⁹⁶ Hitze²⁷ oder Reaktion mit Harnstoff^{97,98}
- Amin-Katalyse^{99,100}
- Korrosion von Phosphiden wie Schreibersit.^{79,81,101-107}

Eine zusammenfassende Darstellung dieser Ansätze ist in **Abbildung 3** gezeigt. Beispielfhaft seien im Folgenden einige Reaktionen aufgeführt. Die Phosphorylierung von 0.16 M Uridin-Lösung mit Hilfe der Kondensierungsreagenz Cyanoformamid liefert bei pH 8 und einer 1 M Phosphatlösung zwischen 1 und 4 % Uridin-5'-phosphat.^{17,87} Lösungsmittelfreies Erhitzen von Orthophosphat erzeugt Pyrophosphat und Triphosphat in 5 bis 50 % beziehungsweise 1 bis 30 % Ausbeute bei 160 °C und 2 Stunden Reaktionszeit.¹⁰⁸ Natriumtriphosphat und Adenosin bilden im Basischen unter Rückfluss ein Gemisch an Adenosin-2'/3'/5'-Phosphat mit 1 % Ausbeute.¹⁰⁸ Trimetaphosphat bildet unter basischen Bedingungen mit Adenosin ein Gemisch aus Adenosin-2'/3'-phosphat in 31 % Ausbeute.¹⁰⁹ Die Reaktion von Trimetaphosphat

Kenntnisstand

mit Ammoniak generiert Diamidophosphat, welches mit Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd Organophosphate mit über 90 % Ausbeute bildet.¹¹⁰

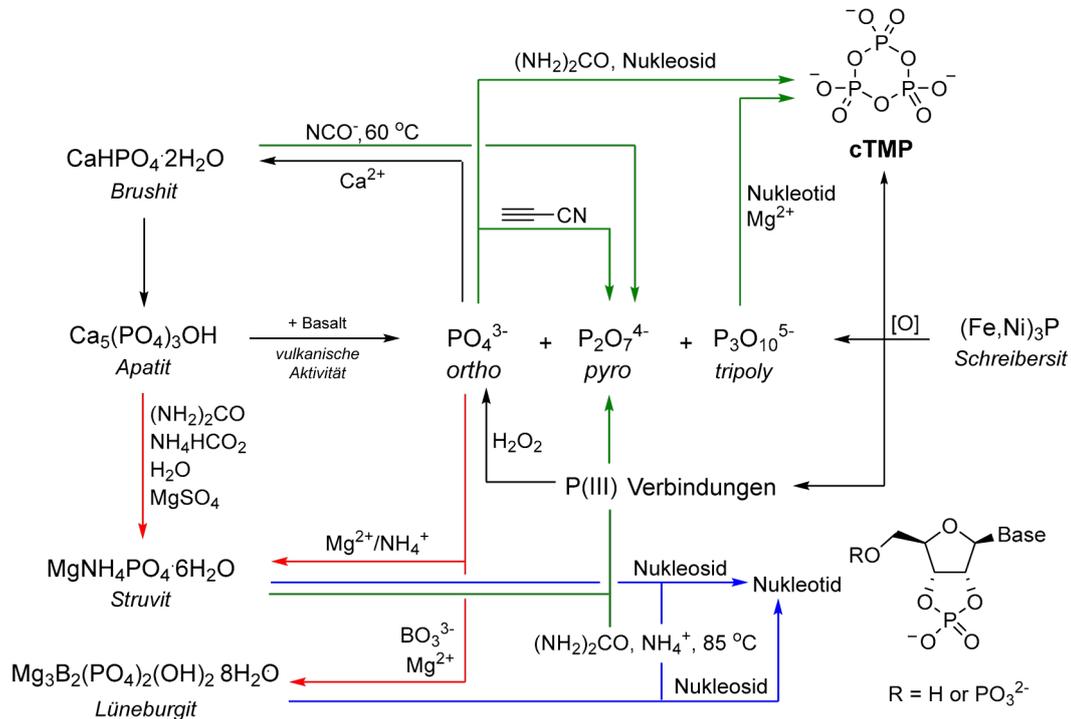


Abbildung 3. Überblick über publizierte Strategien zur präbiotischen Bildung von Orthophosphaten und aktivierten Phosphorverbindungen. Schwarze Pfeile sind Produktionswege für (kondensierte) Phosphate; grüne Pfeile symbolisieren Phosphatumwandlungen; rote Pfeile stehen für Phosphat-Mobilisierungen und blaue Pfeile kodieren für Harnstoff vermittelte Phosphorylierungen. Abbildung übersetzt nach C. Fernández-García, A. J. Coggins, M. W. Powner, *Life* **2017**, 7, 31.¹¹¹ Copyright durch die Creative Commons Attribution License 4.0.

Alternativ können reaktive Phosphoroxo-Spezies auch durch die Korrosion des Meteoriten-Mineral Schreibersit erzeugt haben.^{79,104,106} Dabei kommt es durch Einwirkung einer wässrigen Umgebung zur Oxidation des Materials auf Basis eines radikalischen Mechanismus.¹⁰⁴ Die sich bildenden Phosphoroxo-Radikale und -Anionen zeigen dabei eine erhöhte Reaktivität gegenüber organischen Molekülen. So wurde bereits gefunden, dass Schreibersit sowohl Glycerol als auch Nukleoside mit Ausbeuten von 2,5 und 5,7 % phosphorylieren kann.^{103,112} Über die sich in der Lösung anreichernden Phosphoroxo-Anionen herrscht in der Literatur ein widersprüchliches Bild. Während in einigen Publikationen neben Phosphit und Phosphat auch Hypophosphat und Pyrophosphat nachgewiesen werden konnten, ließen sich diese Befunde in anderen Veröffentlichungen unter Zuhilfenahme anderer Analysemethoden nicht bestätigen. Wesentliche Unterschiede treten vor allem zwischen NMR- und IC-ESI-MS-Untersuchungen auf.^{104,106,107,113} Einen Überblick über die gebildeten Phosphoroxo-Anionen

einer Schreibersit-Korrosion und die bestimmten experimentellen Konzentrationen unterschiedlicher Publikationen sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Tabelle 4. Übersicht über die Korrosionsprodukte des Schreibersits und experimentell bestimmte Konzentrationen aus unterschiedlichen Veröffentlichungen. Tabelle übersetzt nach S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/aabb99>. Copyright durch die Creative Commons Attribution License 3.0.

| Name | <i>Hypo-phospit</i> | <i>Phosphit</i> | <i>Diphosphit</i> | <i>Hypo-phosphat</i> | <i>Phosphat</i> | <i>Pyro-phosphat</i> | <i>Triphosphat</i> | <i>Trimetaphosphat</i> |
|-----------------------|--|----------------------------------|---|--|----------------------------------|--|---|--|
| Formel | [H ₂ O ₂ P] ⁻ | [HO ₃ P] ⁻ | [H ₂ O ₅ P ₂] ²⁻ | [O ₆ P ₂] ⁴⁻ | [O ₄ P] ³⁻ | [O ₇ P ₂] ⁴⁻ | [O ₁₀ P ₃] ⁵⁻ | [O ₉ P ₃] ³⁻ |
| Oxidationszahl | +I | +III | +III | +IV | +V | +V | +V | +V |
| Ladung/P | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 1.6 | 1 |
| A (μM) | - | 700 | - | 280 | 1100 | 150 | - | - |
| B (μM) | - | 100 | - | 18 | 130 | 23 | - | - |
| C (%) | 0 | 59 | - | 2 | 31 | 1 | - | - |
| D (%) | 61 | 26 | - | - | 5 | - | - | - |
| E (%) | 87 | 11 | - | - | - | - | - | - |
| F (μM) | - | 1100 | - | 360 | 430 | 450 | - | - |
| G | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein |

A: 1 g Fe₃P, 25 mL DI Wasser, Luft, 1 d; 293 K; Quantifizierung mittels NMR nach Zugabe von NaOH.¹⁰⁶

B: 1 g Fe₃P, 25 mL DI Wasser, Argon, 1 d; 293 K; Quantifizierung mittels NMR nach Zugabe von NaOH.¹⁰⁶

C: 0.5 g Fe₃P, 25 mL 0.1 M H₂SO₄; 7 d, 298 K; Quantifizierung mittels NMR nach Zugabe von Na₂S.¹¹³

D: 0.5 g Fe₃P, 10 mL H₂O; UV; 3 h, 77 K; Quantifizierung mittels NMR nach Zugabe von Na₂S.¹¹³

E: 19.1 g Meteorit, 20 mL EtOH : H₂O 1 : 1 v/v; UV, 15 h, 77 K; Quantifizierung mittels NMR nach Zugabe von Na₂S.¹¹³

F: 1 g, 25 mL DI Wasser, Luft, 1 d; 293 K; Quantifizierung mittels NMR nach Zugabe von NaOH.¹⁰⁴

G: 0.5 g Fe₃P, N₂, 1 Woche; 293 K and 343 K; Evaluierung mittels IC-ESI-MS.¹⁰⁷

3.1.3. Monosaccharidsynthese

Wie Phosphor-haltige Verbindungen nehmen auch Monosaccharide einen zentralen Stellenwert in biologischen Systemen auf der Erde ein. Sie sind essentielle Komponenten zellulären Lebens in Form von (Desoxy)ribose in DNA, RNA und Kofaktoren, Energieträgern in Stoffwechselwegen, Struktur erhaltenden Gerüsten in Zellwänden und -membranen und Signalvermittlern in modifizierten Proteinen und Lipiden.

Ein präbiotischer Weg hin zur Bildung von Kohlenhydraten wurde bereits 1861 durch Alexander Butlerow entdeckt,¹¹⁴ der durch Einwirkung von Base auf eine Lösung von Formaldehyd eine zuckerartige Masse erhielt. Die später durch Breslow¹¹⁵ auf molekularem Level interpretierte Reaktion wurde Formose-Reaktion genannt, eine Wortzusammensetzung aus **Formaldehyd** und **Aldose**, die auf die wesentliche Natur dieser Umsetzung hindeutet. Bei der

Formosereaktion handelt es sich um die Oligomerisierung von Formaldehyd in wässriger Lösung unter Anwesenheit eines basischen Katalysators, typischer Weise $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Sie resultiert in der Bildung eines komplexen Gemisches aus langkettigen und verzweigten Kohlenhydraten, Polyolen sowie Polyhydroxycarbonsäuren.^{116,117} Trotz bereits umfangreicher Studien und Untersuchungen zum Mechanismus der Reaktion ist dieser bis heute im Detail nicht aufgeklärt.

Die Formosereaktion untergliedert sich in drei Phasen: (I) Induktionsphase, (II) Zuckeraufbau und (III) Zuckerdegradation. Ein typischer Verlauf ist **Abbildung 4** wiedergegeben.

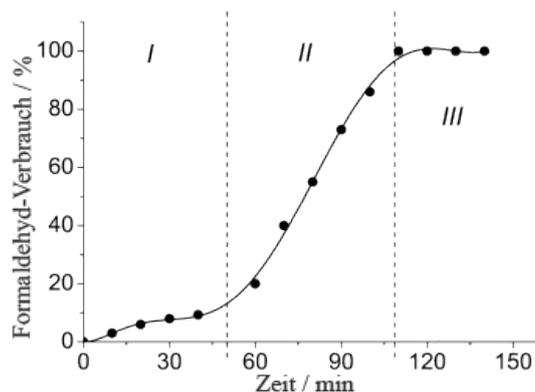


Abbildung 4. Typischer kinetischer Verlauf für den Verbrauch von Formaldehyd in einer Formosereaktion. Zugrunde liegende Reaktionsbedingungen sind: $c_0(\text{CH}_2\text{O}) = 0.140 \text{ M}$, $c(\text{Ca}(\text{OH})_2) = 0.027 \text{ M}$, $c_0(\text{Ribose}) = 0.002 \text{ M}$, $38 \text{ }^\circ\text{C}$, Argon-Atmosphäre. Übersetzt nach I. V. Delidovich, A. N. Simonov, O. P. Taran, V. N. Parmon, *ChemSusChem* **2014**, *7*, 1833-1846.¹¹⁶ Wiedergegeben mit Erlaubnis des Verlages. Copyright 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Induktionsphase: Während der Induktionsphase ist der Verbrauch von Formaldehyd im Wesentlichen auf die Cannizzaro Reaktion zurückzuführen.¹¹⁸ Dabei wird durch Komplexierung von zwei Einheiten Formaldehyd durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ der Hydrid-Transfer zwischen den beiden Einheiten ermöglicht, der zur Bildung von Methanol und Ameisensäure führt.¹¹⁹ Der Anteil dieser Disproportionierungsreaktion ist dabei direkt abhängig vom pK_b Wert der verwendeten Base.¹²⁰ Der ungewünschte Anteil an Reaktionsprodukten ist durch Einsatz von kleinen Alkoholen, Ethylenglykol und ähnlichen, zur Sättigung der Ligandensphäre um die Base befähigten Ethern möglich.¹²¹ Die klassische Formose-Reaktion geht erst in die Phase II über, wenn durch geglückte Umpolungsreaktion des Formaldehyds erste Glykolaldehyd-Moleküle gebildet werden. Dies kann zum Beispiel durch UV-Bestrahlung¹²²⁻¹²⁶ und/oder thermische Aktivierung von Glyoxylsäure mittels Bildung von Hydroxymethylen¹²⁷ realisiert werden. Andernfalls bedarf die erfolgreiche Formosereaktion einen Initiator mit der Fähigkeit zur Endiolisierung, der für das Formaldehyd einen nukleophilen Partner darstellt.^{128,129} Dafür kommen die Produkte der Formosereaktion wie Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd und auch höhere Zucker in Frage. Die

Beobachtung, dass der Zusatz von Produkten die Formosereaktion in ihrer Induktionsperiode beschleunigt, hat dazu geführt, dass dieser Reaktion gemeinhin eine autokatalytische Natur zugeschrieben wird.¹³⁰ Die Formosereaktion kann mit einem Zusatz von mindestens 3 ppm endiolisierendem Zucker effektiv initiiert werden.¹²⁹

Zuckeraufbau: Nachdem die Formosereaktion die Induktionsphase durchlaufen hat und durch konsekutive Aldol- und Retroaldolreaktion ausreichend einfache Zucker als Reaktionspartner für das elektrophile Formaldehyd zur Verfügung stehen, werden in stetig wachsender Zahl Kohlenhydrate aufgebaut und Formaldehyd verbraucht. Es bilden sich C3, C4, C6, C7 und C8 Zucker. Bei 30 % verbrauchtem Formaldehyd enthält die Produktmischung in etwa 30 % C2, C3 und C4 Zucker, 30 % Zucker mit mehr als 4 Kohlenstoffatomen in der Kette und 30 % Ameisensäure und Methanol.¹³¹ Dabei treten wiederholt Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein-Isomerisierungen¹³² und Hydrid-Shifts ein,¹³³ die zur Komplexität des sich bildenden Reaktionsgemisches beitragen. Basierend auf Deuterium-Experimenten konnte gezeigt werden, dass letztere einen bedeutend höheren Anteil an Isomerisierungen leisten.^{133,134} Eine umfängliche Darstellung der ablaufenden Prozesse ist in **Abbildung 5** gezeigt.

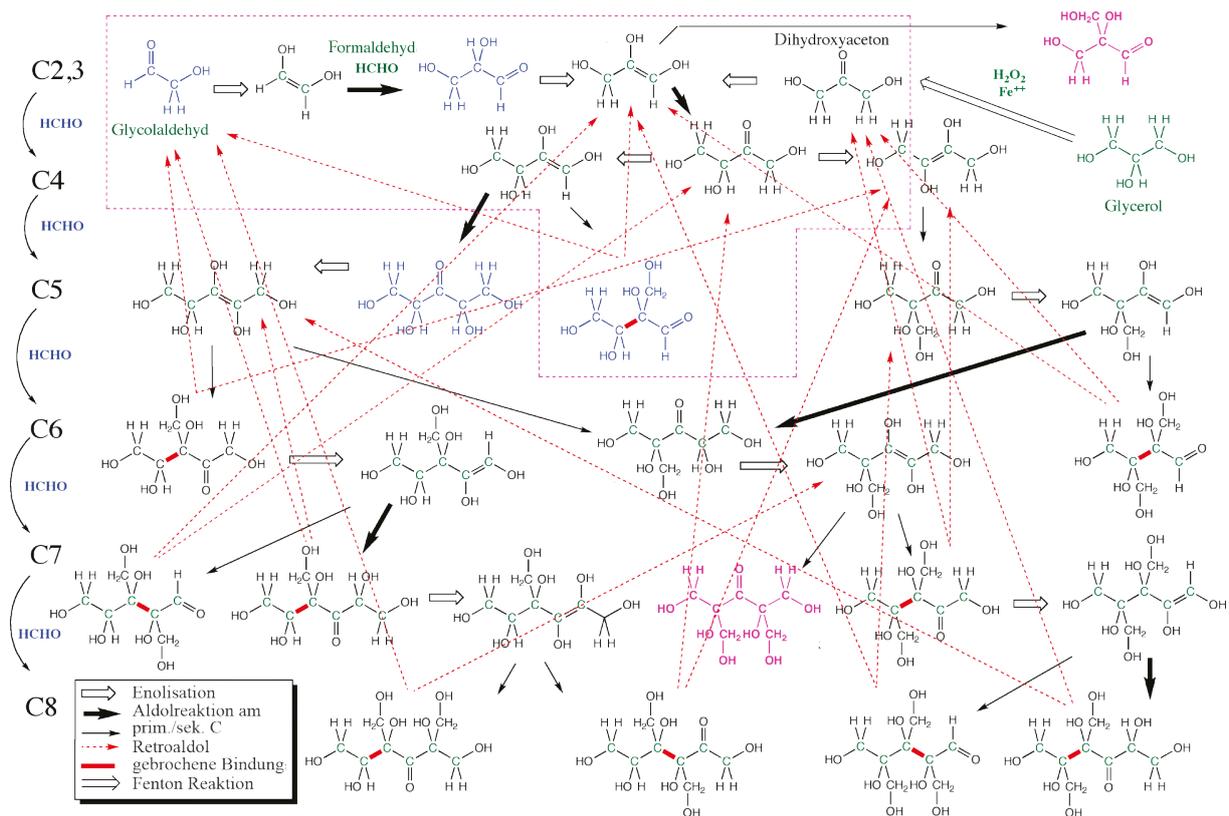


Abbildung 5. Reaktionsnetzwerk der klassischen Formosereaktion. Übersetzt nach H. J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468.¹³⁴ Wiedergegeben mit Erlaubnis des Verlages. Copyright 2018 American Chemical Society.

Zuckerdegradation: Bei etwa 5 % verbleibenden Formaldehyd in der Reaktion tritt die letzte Phase der Formosereaktion ein, die sich optisch durch eine Gelbfärbung bemerkbar macht.¹³⁵⁻¹³⁷ An diesem „*yellow point*“ setzen noch nicht aufgeklärte Reaktionswege ein, die zu Produkten wie Säuren (Milchsäure, 2,3-Dihydroxy-2-methylpropansäure, Essigsäure, Glycerinsäure) und Polyolen führen.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Für erstere werden vor allem β -Eliminierungen und für letztere Kreuz-Cannizzaro-Reaktionen in Betracht gezogen. Mit fortschreitender Reaktion intensiviert sich die Verfärbung des Gemisches weiter, bis ein brauner, unlöslicher Teer entsteht, über dessen Zusammensetzung nur wenig bekannt ist. Die Bildung von polymeren Strukturen wird vermutet.¹⁴¹

Die Formosereaktion kann durch eine beträchtliche Anzahl an verschiedenen Substanzen katalysiert werden, darunter anorganische wie organische Katalysatoren.¹¹⁷ Eine Auswahl ist in **Tabelle 5** gegeben.

Tabelle 5. Exemplarische Übersicht über anorganische und organische Katalysatoren in der Formosereaktion.

| Katalysator | Beispiele |
|--------------------|--|
| Anorganisch | $\text{Al}(\text{OH})_3$ ¹⁴² |
| | Al_2O_3 ¹⁴² |
| | $\text{BaCl}_2 + \text{NaOH}$ ¹⁴³ |
| | CaCO_3 ¹⁴⁴ |
| | CaO ¹⁴² |
| | $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ¹⁴² |
| | MgSO_4 ¹⁴² |
| Organisch | Aminoethanol ¹⁴⁵ |
| | Collidine ¹⁴⁴ |
| | Glycin ¹⁴⁶ |
| | Imidazol ¹⁴⁶ |
| | Pyridin ¹⁴⁶ |
| | Thiazolium Abkömmlinge ¹⁴⁷ |

Von besonderem Interesse sind Reaktionsbedingungen, unter denen eine gewünschte Selektivität und Stabilität der gebildeten Kohlenhydrate in stark basischem Milieu erzielt werden kann, speziell in Bezug auf die Monosaccharide Ribose und Glucose. Dies konnte im Fall von zwei mineralischen Zusätzen bereits gezeigt werden. So sind zum einen Silikate in der Lage, mit Monosacchariden ab einer Kettenlänge von 4 Kohlenstoffatomen stabile Komplexe der Stöchiometrie 2:1 Zucker:Silikat zu bilden, in denen die anomere Hydroxylgruppe

niedrigsten pK_s -Wertes mit einer ihr benachbarten Hydroxylgruppe in *cis*-Konfiguration bindet.^{148,149} Dabei haben Rechnungen zeigen können, dass im Fall der Ribose die höchste thermodynamische Stabilität des Komplexes erreicht wird.¹⁵⁰ Zum anderen konnte für den Einsatz von Boraten eine Selektivität für Pentosen gefunden werden, die sich durch die Stabilisierung von Monosacchariden mit geminalen Hydroxylgruppen erklären lässt.^{86,134,151} Während die Addition von Formaldehyd an Glykolaldehyd nicht beeinflusst wird und Glyceraldehyd bildet, verhindert die Koordination von Borat an Glyceraldehyd den Angriff des Formaldehyds, da die Enolisierung und damit Nukleophilie der Aldose unterdrückt wird. In der Folge kann es nur als Elektrophil dienen und mit enolisiertem Glykolaldehyd reagieren. So entstehen vornehmlich Pentosen.^{86,134,151} In beiden Fällen, mit Zusatz von Silikaten und Boraten, bedingen die gebildeten Komplexe eine erhöhte Stabilität der Formoseproduktmischungen und inhibieren signifikant die Zuckerdegradation.^{86,134,148,149,151} Ein Setup mit derart mineralischen Beisätzen wird daher als präbiotisch möglich angesehen. Für die Formosereaktion konnte aber bisher nach bestem Wissen des Autors kein System beschrieben werden, in welchem die Produktbildung mit einem Enantiomerenüberschuss erfolgt.

3.1.4. Homochiralität

Ein weiterer wesentlicher Aspekt innerhalb der Forschung nach dem Ursprung des Lebens besteht in der Frage nach der Ursache für die Homochiralität in zellulärem Leben.¹⁵² So kommen fast ausnahmslos Kohlenhydrate in D- und Aminosäuren in L-Konfiguration vor. Diese chirale Uniformität ist in allen Organismen in gleicher Weise konserviert. Einen bemerkenswerten Unterschied lässt sich nur für die Domäne der Archaea herausstellen, die in ihren Lipiden der Doppelmembranen im Gegensatz zu Bakterien und Eukaryonten nicht D-, sondern L-Glycerol-1-phosphat einbauen.¹⁵³ Dabei geht die aktuelle Lehrmeinung davon aus, dass die Verwendung von homochiralen Molekülklassen durch ein enantioselektives Angebot erzwungen wurde.^{154,155} Anhaltspunkte für diese Annahme liefern astronomische Himmelskörper, in denen teilweise Enantiomerenüberschüsse sowohl für Aminosäuren^{64,156} als auch für Zucker-

Tabelle 6. Enantiomerenüberschüsse für ausgewählte Beispiele in meteoritischen Gesteinen.

| Verbindung | ee % | Meteorite |
|---------------------------------------|-----------------------------|---|
| Alanin ^{158,159} | L: 33 (<i>umstritten</i>) | Murchison |
| Isovalin ^{65,160,161} | L: 2.5 – 19.6 | Murchison, Murray, Orgueil |
| Isoleucin ¹⁶⁰ | L: 4-50 | Murchison, Murray, GRA 95229, LAP 02342 |
| Alloisoleucin ¹⁶⁰ | D: 2-60 | Murchison, Murray, GRA 95229, LAP 02342 |
| 2-Methylvalin ¹⁶⁰ | L: 1.0 | Murchison, Murray |
| Milchsäure ^{160,162} | L: 3.0 – 12.3 | Murchison, GRA 95229, LAP 02342 |
| Threonsäure ¹⁶³ | D: 33-55 | Murchison, Murray, GRA 95229, LAP 02342 |
| Ribonsäure ¹⁶³ | D: 57 | Murchison |

säuren¹⁵⁷ detektiert werden konnten. Eine exemplarische Übersicht liefert **Tabelle 6**.

Als Mechanismus hinter der Enantioselektion in meteoritischen Gesteinen werden vor allem photolytische Prozesse gesehen,¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ da abiotische Syntheserouten für Aminosäuren gemeinhin in racemischen Produkten münden. Als wahrscheinliche Reaktionstypen werden die Streckersynthese¹⁶⁸⁻¹⁷¹ und reduktive Aminierungen^{65,172,173} angenommen. Nach Bildung der Produkte, so die Hypothese, werden die racemischen Moleküle durch Wechselwirkungen mit elektromagnetischer Strahlung hinsichtlich ihrer Enantiomere diskriminiert. Dies kann durch zirkular polarisiertes Licht,^{164-167,174} Spin-polarisierte Elektronen¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ oder unpolarisiertes Licht in gerichteten Magnetfeldern erfolgen.¹⁷⁸⁻¹⁸¹ Letzteres wird als magnetochiraler Dichroismus bezeichnet. Für diesen Effekt sind jedoch sehr starke Magnetfelder nötig. So lassen sich mit 1 T Magnetfeld lediglich 10⁻⁵ % ee generieren.^{166,179} Der in einem typischen Experiment beobachtete Enantiomerenüberschuss, der mit Hilfe von ultraviolettem, zirkular polarisiertem Licht erhalten wurde, liegt dem entgegen bei 2.5 % und kann damit ebenfalls nicht umfassend die beobachtete Enantiodiskriminierung auf astronomischen Himmelskörpern erklären. Außerdem sei darauf hingewiesen, dass im publizierten Fall von erreichten 2.5 % Enantiomerenüberschuss gleichzeitig 75 % des ursprünglichen Ausgangsmaterials degradiert wurde.¹⁸²

Es wird daher angenommen, dass nach anfänglicher Erzeugung eines chiralen Ungleichgewichtes weitere Mechanismen zum Tragen gekommen sind, die diesen geringen Überschuss amplifiziert haben.^{154,155} In diesem Zusammenhang sollen zwei Möglichkeiten diskutiert werden: Amplifizierung durch (1) Phasenübergänge und (2) Autokatalyse.

Phasenübergänge: Unter Phasenübergänge werden Gleichgewichtsreaktionen verstanden, bei denen die entsprechenden Komponenten in mindestens zwei unterschiedlichen Phasen vorkommen; fest/flüssig, flüssig/flüssig, fest/gasförmig oder flüssig/gasförmig. Ein anschauliches und relevantes Beispiel sind Aminosäuren in fest/flüssig Systemen.^{154,164,183} Wenn Aminosäuren kristallisieren, lassen sich zwei unterschiedliche Phasenverhalten beobachten. So können sich Razemate bilden – Kristalle, die stöchiometrisch aus 1:1 D:L-Enantiomeren aufgebaut sind – oder Konglomerate – Kristalle, die enantiomerenrein und parallel vorliegen. In welcher Form eine betreffende Substanz kristallisiert, ist eine stoffspezifische Eigenschaft bei gegebener Temperatur und Druck. Im Fall der 19 proteinogene Aminosäuren kristallisieren 2 als Konglomerate, 17 als Razemate.^{154,183} Für das sich einstellende Gleichgewicht zwischen fester und gelöster Phase gilt dabei, dass für Konglomerate der Enantiomerenüberschuss in Lösung gleich null und für Razemate ungleich null ist. Ursächlich dafür sind die unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften der enantiomerenreinen Verbindung und des Razemats. Wird so beispielsweise eine gesättigte Lösung einer als Razemat kristallisierenden Aminosäure hergestellt, indem ein Enantiomer in einem definierten Überschuss eingesetzt wird, bildet sich ein

Gleichgewicht von racemischen und enantiomerenreinen Kristallen mit den Enantiomeren in der Lösung aus, dass zu Ab- bzw. Anreicherung eines bestimmten Enantiomers führt. Ausschlaggebend für die Zusammensetzung der Lösung sind die Löslichkeitsprodukte der beteiligten Gleichgewichte. Dieses Verhalten kann zur pseudo, nicht linearen Amplifikation in der Organokatalyse eingesetzt werden.^{154,183} Das Beispiel einer Prolin-katalysierten Aldolreaktion ist in **Abbildung 6** gezeigt.¹⁸³

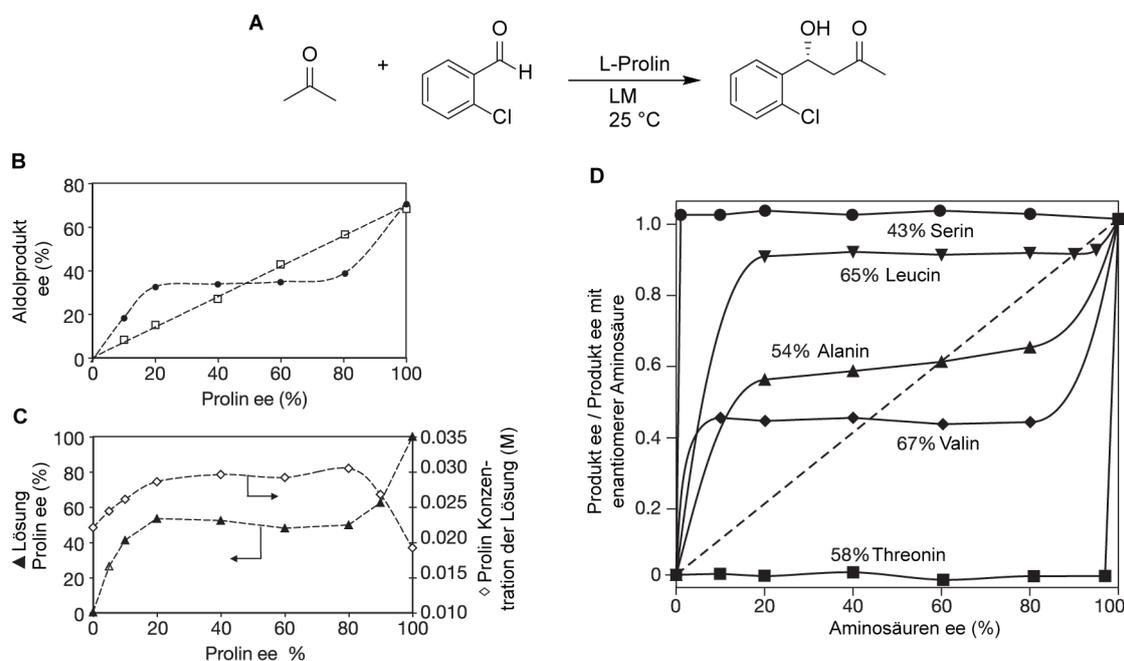


Abbildung 6. Prolin-katalysierte Aldolreaktion und pseudo nicht-lineare Amplifikation. (A) Reaktionsschema. (B) Kreise: Eingesetzte Gesamtmenge des Prolins: 0.1 M; pseudo nichtlinearer Verlauf, da die Bildung racemischer Kristalle den Enantiomerenüberschuss in Lösung bei etwa 50 % gleichsam puffern; Rechtecke: Gesamtkonzentration unterhalb der Löslichkeitsprodukte: 0.025 M. Linearer Zusammenhang zwischen Prolin-Enantiomerenüberschuss und Produktenantiomerenüberschuss. (C) Enantiomerenüberschuss der Lösung an Prolin und Prolinkonzentration der Lösung gegen Prolinenantiomerenüberschuss. (D) Produktenantiomerenüberschuss relativ zum selbigen bei Einsatz der enantiomerenreinen Aminosäure gegen gesamtheitlichen Enantiomerenüberschuss der eingesetzten Aminosäure. In Anlehnung an und übersetzt nach M. Klussmann, H. Iwamura, S. P. Mathew, D. H. Wells Jr, U. Pandya, A. Armstrong, D. G. Blackmond, *Nature* **2006**, *441*, 621.¹⁸³ Wiedergegeben mit Erlaubnis des Verlanges. Copyright 2006 Nature Publishing Group.

Da sich im Gleichgewicht zwischen den Phasen der racemischen Kristalle, enantiomerenreinen Kristalle und Lösung ein anderer Enantiomerenüberschuss in Lösung einstellt als angesetzt wurde, kann bei Auftragung des Produktenantiomerenüberschusses gegen den des ursprünglich eingesetzten Auxiliars der Verlauf einer nicht-linearen Kurve erhalten werden (siehe **Abbildung 6B** und **6D**). Dieser Verlauf entspricht dabei dem Enantiomerenüberschuss

des eigentlich in Lösung befindlichen Prolins (siehe **Abbildung 6C**). Daher korreliert der Produktenantiomerenüberschuss linear mit dem des gelösten Prolins und folglich handelt es sich um eine pseudo, nicht-lineare Amplifikation, auf dessen Grundlage allerdings asymmetrische Synthesen von biologisch relevanten Molekülen wie Zucker möglich sind.¹⁸³ Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle auch auf die Viedma-¹⁸⁴⁻¹⁸⁷ und Ostwald-Reifung¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ hingewiesen.

Autokatalyse: Ein komplementärer Ansatz zu solchen physikalischen Mechanismen der chiralen Amplifikation besteht in der asymmetrischen Autokatalyse, bei der das Produkt einer Reaktion seine eigene Bildung mit gleicher Konfiguration katalysiert. Ein erstes mathematisches Modell für eine solche Reaktion wurde von Frank bereits 1953 eingeführt.^{191,192} Soai konnte den experimentellen Beweis einer solchen Reaktion 1990 liefern,^{193,194} die schematisch in **Abbildung 7** wiedergegeben ist.

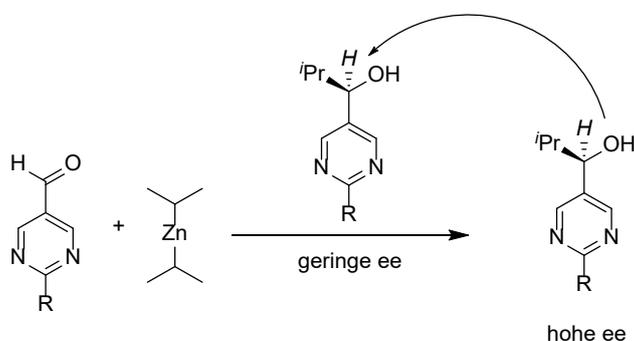


Abbildung 7. Schema zur autokatalytischen Soai-Reaktion mit musterhafter Konfiguration.

Bei der Soai-Reaktion handelt es sich um die autokatalytische Alkylierung von Pyrimidin-Aldehyden zu Alkoholen durch Dialkylzink-Verbindungen.¹⁹⁵ Soai konnte dabei nachweisen, dass selbst geringe Ungleichgewichte in dem anfänglichen Auxillar/Produktenantiomerenüberschuss ausreichen, um über mehrere Katalysezyklen sehr hohe Produktenantiomerenüberschüsse zu erzeugen. Als Quelle für Ungleichgewichte verwendete er unter anderem chirale Minerale,¹⁹⁶ Isotopensubstitutionen¹⁹⁷ und zirkulär polarisiertes Licht.¹⁹⁸ So konnte Soai zum Beispiel für einen anfänglichen Enantiomerenüberschuss von 0.00005 % zeigen, dass nach drei konsekutiven asymmetrischen Katalysezyklen eine Amplifizierung von bis zu 99.5 % Produktenantiomerenüberschuss realisierbar ist.¹⁹⁵ Der detaillierte Mechanismus der Soai-Reaktion ist allerdings bis heute nicht abschließend geklärt. Auf Grundlage von Kagans Model¹⁹⁹ werden homochirale Dimere und Tetramere noch nicht bestätigter Struktur vermutet, die gegenüber ihren heterodimeren Komplexen eine wesentlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit zeigen. An dieser Stelle sei auf die diskutierten Strukturvorschläge in der Literatur verwiesen.²⁰⁰⁻²⁰³

Ein verwandtes Beispiel einer enantioselektiven, selbst-amplifizierenden Katalyse konnte von Trapp und Mitarbeitern etabliert werden. Sie designten einen axial chiralen Liganden für die Hydrierung mit Rhodium(I)-Komplex, der durch Wechselwirkungen von nicht-kovalenten Bindungsstellen im Rückgrat mit Produktmolekülen ausgerichtet werden kann und auf diese Weise eine chirale Informationsübertragung und letztlich Amplifikation erlaubt.²⁰⁴ Bei dem synthetisierten Liganden handelt es sich um ein Phosphoramidit, der an einem flexiblen Biphenylkern geknüpft ist und im Rückgrat mittels Amidbindung eine *N*-Pivaloylprolin-Einheit als Substratbindungsstelle enthält. Durch diese gewählte Struktur kann der in **Abbildung 8** gezeigte Katalysezyklus realisiert werden. Nach Aktivierung des Katalysators wird in einem ersten Schritt Substrat in marginaler Enantioselektivität zu einem Produktgemisch aus *R*- und *S*-Enantiomeren umgesetzt. Die gebildeten Produktmoleküle – hier *N*-(3,5-Dinitrobenzoyl)alaninester – können basierend auf einer 3-Punkt-Wechselwirkung mit den nicht-kovalenten Bindungsstellen des Liganden erkannt werden und Katalysator-Produkt-Addukte bilden, die zur strukturellen Ausrichtung des Katalysator-Komplexes führen. Erfolgt dies selektiv für ein Addukt aufgrund unterschiedlicher Energien der diastereomeren Komplexe oder Reaktionsgeschwindigkeiten, führt diese zur Begünstigung der Bildung eines Produktes mit selektiver Konfiguration. Durch Anreicherung dieses Produktes und wiederholter Bindung an den Katalysatorkomplex wird so über mehrere Katalysatorzyklen mit stetig steigender Selektivität ein Enantiomer gebildet. Die Reaktion kann dann als enantioselektive, selbst-amplifizierende Katalyse mit Produktbeteiligung beschrieben werden.²⁰⁴

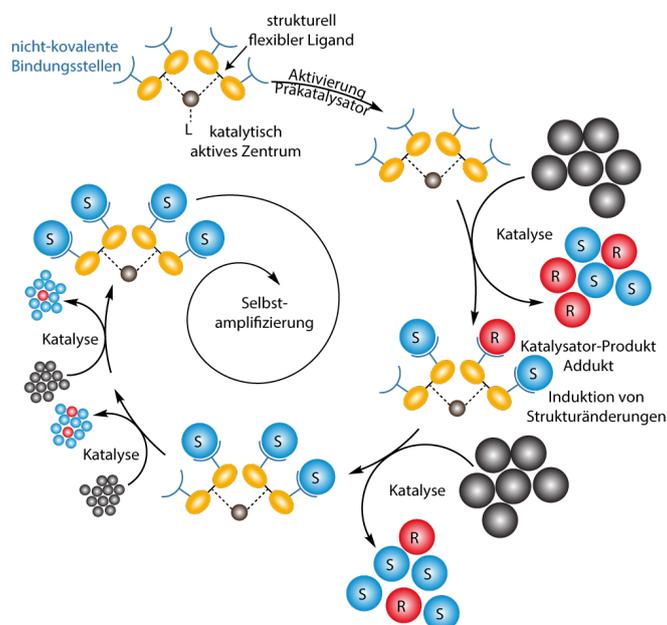


Abbildung 8. Schematische Darstellung einer enantioselektiven, selbst-amplifizierenden Katalyse mit Produktbeteiligung basierend auf Phosphoramidit-Biphenyl-Systemen. Übersetzt nach G. Storch, O. Trapp, *Nat Chem* **2017**, 9, 179-187.²⁰⁴ Wiedergegeben mit Erlaubnis des Verlages. Copyright 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature.

Neben der erforderlichen Wechselwirkung zwischen Produkt und Katalysator ist dabei von Bedeutung, dass zum einen die erzwungene strukturelle Änderung der Konfiguration des Katalysators zu einer erhöhten Enantioselektivität führt und zum anderen die Katalysatoraktivität nicht vermindert wird.²⁰⁵

Aufgrund ihrer flexiblen, axialen Chiralität sind Biphenyle für die Entwicklung und das Verständnis der Prinzipien selbst-amplifizierender, autokatalytischer Systeme ideale Modellsysteme. In der Gruppe um Trapp wurden bereits Arbeiten zu diesen Kernstrukturen veröffentlicht, die ihre Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten charakterisieren.²⁰⁶⁻²¹⁴ Die zentrale Fragestellung in diesem Zusammenhang ist die Größenordnung der Rotationsbarrieren für eine optimale und effektive Produkt-Ligand-Wechselwirkung, sodass eine gezielte und schnelle Selbst-Amplifizierung erzielt werden kann. Für BIPHEP und BIPHEP(O) Liganden liegen die Rotationsbarrieren $\Delta G_{298\text{ K}}^\ddagger$ zwischen 86 und 110 kJ mol⁻¹.²⁰⁴ Für den hier beschriebenen Phosphoramiditliganden konnte mittels DFT-Rechnung eine Rotationsbarriere von $\Delta G_{298\text{ K}}^\ddagger = 36.7$ kJ mol⁻¹ bestimmt werden.²⁰⁴ Experimentelle Untersuchungen der Rotationsbarrieren, sofern die Zielverbindungen unter den Analysebedingungen stabil sind, kann mittels enantioselektiver dynamischer HPLC erfolgen. Zu diesem Zweck werden Elutionsprofile bei unterschiedlichen Temperaturen chromatographisch vermessen und aus den zugänglichen Peak- und Plateau-Parametern die Geschwindigkeitskonstanten und freien Gibbs-Energien auf Grundlage der Unified und Eyring Gleichung bestimmt.^{215,216}

3.2. Multiplexing basierend auf Hadamard-Transformation

Wie aus den vorangegangenen Kapiteln deutlich wurde, besteht eine der zentralen Fragen der Forschung nach dem Ursprung des Lebens in der Aufklärung, Bestimmung und Charakterisierung von komplexen Reaktionsnetzwerken, aus denen unter anderem biologisch relevante Moleküle wie Aminosäuren, Zuckern, Nukleinbasen, Fette, Amphiphile und weitere hervorgegangen sein könnten. Um diese Aufgabe zu lösen, bedarf es leistungsfähiger Separationstechniken, mit deren Hilfe nicht nur die vielseitigen Mischungen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert, sondern auch zeitlich aufgelöst quantifiziert werden können. Analysemethoden sollten dabei möglichst nicht-invasiv sein und wenn nötig kaum Aufarbeitungsschritte erfordern, die in keinem Fall das Analyseergebnis beeinflussen dürfen. Außerdem wird die Anforderung gestellt, dass mit hoher Sensitivität alle Bestandteile der komplexen Reaktionsmischungen detektiert und identifiziert werden können sollen. Insbesondere letzter Punkt ist oftmals eine inhärente Limitierung, die durch einen gewählten oder erforderlichen Detektor gesetzt wird.

Im Folgenden sollen das mathematische Konzept der Hadamard-Transformation sowie das darauf beruhende Multiplexing-Analyseverfahren vorgestellt werden, mit deren Hilfe die Sensitivität bestehender Systeme verbessert werden kann.

3.2.1. Multiplexing mittels Hadamard-Transformation

Unter dem Begriff des Multiplexings wird ein Datenübermittlungskonzept verstanden, bei welchem ein oder mehrere eingehende Signale von einer oder mehreren beliebigen Quellen durch Modulation kombiniert beziehungsweise überlagert werden, sodass ein einziges, aufsummiertes Signal am Ausgang aufgezeichnet werden kann.²¹⁷⁻²¹⁹ Dieses muss anschließend mit Wissen um die hinterlegte Modulation wieder zurück in die ursprünglichen, eingehenden Signale umgewandelt werden. Multiplexing ist in diesem Zusammenhang ein bekanntes und vielfach verwendetes Prinzip in Übertragungstechnologien.²²⁰⁻²²⁴ Es lässt sich aber auch in chemisch-analytische Anwendungsbereichen nutzen. So können beispielsweise Photonen- und Partikelströme moduliert, überlagert und anschließend dekonvolviert werden. Daher findet dieses Verfahren vor allem in spektroskopischen und analytischen Methoden Verwendung.²²⁵⁻²³⁰ Es ist aber inhaltlich von sogenannten gemultiplexten (englisch *multiplexed*) Experimenten zu unterscheiden, in denen das Setup oder der Detektor lediglich parallelisiert ist, aber das eigentliche Signal keine Überlagerung beziehungsweise Komprimierung erfährt. Beispiele für solche gemultiplexten Methoden sind medizinische und bioanalytische Hochdurchsatzapplikationen.²³¹⁻²³⁴ Multiplexing-Anwendungen auf der anderen Seite finden sich in der IR²³⁵⁻²³⁹ und UV-VIS-Spektrometrie,^{240,241} Massenspektrometrie,^{230,242-245} Gas-,²⁴⁶⁻²⁵⁰ Flüssigkeit-²⁵¹⁻²⁵⁶ und Ionen-Mobilitätschromatographie^{257,258} sowie Kernresonanzspektroskopie.²²⁵⁻²²⁷

Insbesondere im spektroskopischen Bereich wird dabei für die Modulation die Fourier-Transformation genutzt, bei welcher die Signale in Koeffizienten kontinuierlicher, trigonometrischer Funktionen zerlegt werden. In solchen Fällen, bei welchen die Überlagerung mit diskreten Werten (-1 und +1) wie Masken oder Injektionsfolgen durchgeführt wird, findet die Hadamard-Transformation auf Grundlage der sogenannten Walsh-Funktionen Anwendung.²⁵⁹ In beiden genannten Fällen kann mit Hilfe des Multiplexing Setups nicht nur ein höherer Durchsatz, sondern auch eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht werden. Diese Vorteile wurden erstmals durch Jacquinot und Fellgett im Zusammenhang mit Interferometern beschrieben. So konnte Jaquinot zeigen, dass die Fläche multipliziert mit dem Raumwinkel des Strahls – der optische Energiedurchsatz – für ein Interferometer bei gleicher Auflösung größer ist als für ein Monochromator.^{260,261} Fellgett auf der anderen Seite erkannte, dass im Vergleich von dispersiven zu *continuous wave* Spektrometern erstere eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses in der Größenordnung von \sqrt{N} erzielen bei gleicher

Datenaufnahmefrequenz, da die gleiche Anzahl an Spektralelemente N nicht sequentiell durchlaufen werden muss.²⁶²⁻²⁶⁴

Die durch Multiplexing-Techniken erzeugten Signale, Spektren oder Chromatogramme können als summierte, in einander gepackte Einzelinformationen verstanden werden, die nach Aufzeichnung oder Detektion in eine konventionelle, singuläre Darstellung zurücktransformiert werden müssen. Im Folgenden sollen die nötigen mathematischen Voraussetzungen und Algorithmen für die Hadamard-Transformation skizziert werden.

Der Zusammenhang zwischen einer Einzelinformation x und einem überlagerten Multiplexing-Signal X ist durch folgenden Matrix-Ausdruck gegeben:

$$X_n = H_n \cdot x_n \quad (\text{Gl. 1})$$

mit H_n als Hadamard-Matrix der Ordnung n .

Um das konventionelle Spektrum oder Chromatogramm x aus dem Multiplexing-Signal X zu erhalten, muss folglich mit der inversen der Hadamard-Matrix multipliziert werden. Es gilt dann:

$$x_n = H_n^{-1} \cdot X_n \quad (\text{Gl. 2})$$

Hadamard-Matrizen, die auf den französischen Mathematiker Jaques Hadamard zurückgehen,²⁶⁵ sind Matrizen einer Ordnung n mit $n \times n$ Größe, die ausschließlich die Werte 1 und -1 (vergleiche Welsh-Funktion) als Koeffizienten zulassen und für die gilt, dass alle Zeilen und Spalten untereinander orthogonal zueinander sind. Daraus folgt:

$$H_n H_n^T = n I_n \quad (\text{Gl. 3})$$

mit I_n als Einheitsmatrix.²¹⁸ Hadamard-Matrizen können dabei derart konstruiert werden, dass die erste Zeile und Spalte lediglich den Wert +1 enthalten. In der Folge lassen sich aufgrund des redundanten Charakters dieser Eintragungen die Hadamard-Matrizen vereinfachen, indem diese gestrichen werden. Des Weiteren kann die Hadamard-Matrix so aufgebaut werden, dass sie zyklisch beziehungsweise links zirkulant ist. Ihre Zeilen lassen sich dann ausgehend vom Wissen um die Werte der ersten Zeile rekonstruieren. Dabei werden zur Formulierung der nächsten Zeile die Werte der vorangegangenen Zeile um eine Stelle nach links verschoben. Es ist ferner üblich, diese Matrizen in sogenannte Simplex-Matrizen zu überführen. Dies geschieht durch Austausch der Koeffizienten: +1 durch 0 und -1 durch +1. Der Gebrauch von Hadamard- oder Simplex-Matrizen variiert je nach Anwendung.^{218,219}

Im Folgenden sind sowohl ein Beispiel für eine Hadamard- als auch entsprechende zirkuläre Simplex-Matrix gezeigt. Man vergleiche die Zahleneinträge und Verwandtschaft der beiden Matrizen.

$$H_8 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 \end{pmatrix}; S_7 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 4a,b})$$

Die Reihen der gezeigten Simplex-Matrix können als Sequenzabfolge des eingehenden Signals interpretiert werden. Sie werden als pseudo-zufällige binären Sequenzen (PRBS – *pseudo random binary sequences*) bezeichnet und kodieren die Modulation.^{266,267} Als Folge des zyklischen Charakters der Simplex-Matrix ist es so möglich, mit Hilfe lediglich einer Zeile/der PRBS die Modulation der spektroskopischen oder chromatografischen Information gesamtheitlich zu erfassen.

Um Hadamard- und Simplexmatrizen dieser Art zu erzeugen, existieren verschiedene mathematische Strategien. Zu diesen zählen die Methode der quadratischen Reste,^{268,269} der Primzahlzwillinge²⁷⁰ und der rückgekoppelten Schieberegister.²⁷¹

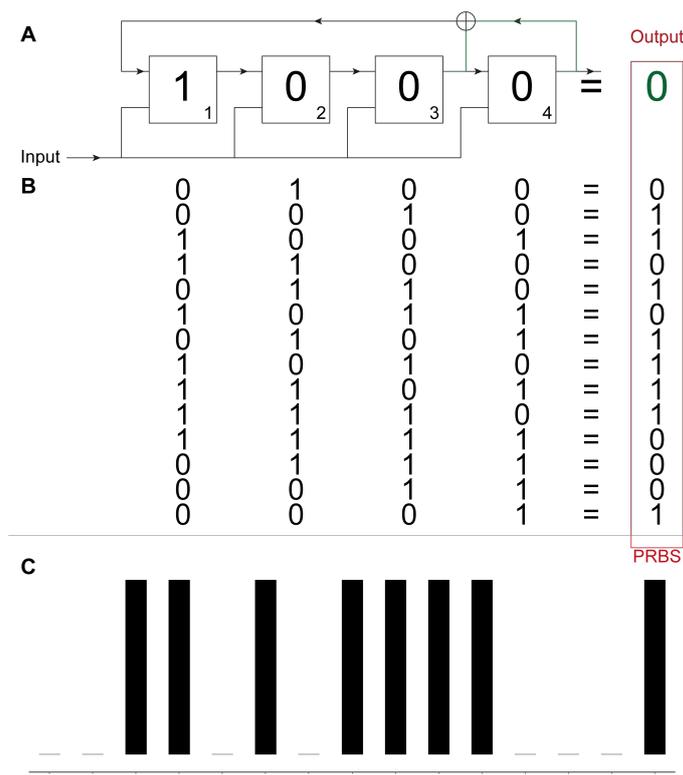


Abbildung 9. Funktionsweise von linear rückgekoppelten Schieberegister und ihre Verwendung in der Erzeugung von pseudo-zufälligen binären Sequenzen. (A) Linear rückgekoppeltes Schieberegister. Quadrate sind Positionen beziehungsweise Flipflops innerhalb des Registers. (B) Perioden des Schieberegisters bis zur maximalen Länge mit Output. (C) Barcode-Darstellung des Outputs.

Insbesondere letzteres Verfahren findet weitverbreitete Anwendung und wurde auch für die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten PRBS genutzt. Sie sei daher im Folgenden vorgestellt. Eine schematische Darstellung ist in **Abbildung 9** gezeigt.

Unter linearen rückgekoppelten Schieberegister werden mathematische Algorithmen verstanden, mit deren Hilfe determinierte Zufallsfolgen mit pseudo-zufälliger Natur auf Basis der logischen Funktion XOR durch sequentielle Verschiebung eines definierten Registers erzeugt werden können. Bei der Funktion XOR, dargestellt durch \oplus , handelt es sich um die Kontravalenz, für die im Fall von Koeffizienten der Simplex-Matrix gilt:

$$0 \oplus 0 = 1 \oplus 1 = 0 \quad (\text{Gl. 5})$$

$$0 \oplus 1 = 1 \oplus 0 = 1 \quad (\text{Gl. 6})$$

Für die Erstellung des linearen rückgekoppelten Schieberegisters werden zusätzlich sogenannte binäre, primitive Polynome benötigt.²⁷² Diese Polynome bestimmen durch die Relation:

$$n = 2^m - 1 \quad (\text{Gl. 7})$$

mit m (-bit) als Ordnung des Polynoms die maximale Anzahl an Elemente n , welche der Ordnung der Simplex-Matrix und gleichzeitig der maximalen Periodenlänge des Registers entspricht. Ihre Struktur gibt außerdem den Aufbau des Schieberegister an. So determiniert die Ordnung des Polynoms die Anzahl an Stellen im Register, genannt Flipflops, während die auftretenden polynomischen Terme die Verknüpfung der Flipflops mit den XOR-Operatoren anzeigen. **Tabelle 7** zeigt die verwendeten binären primitiven Polynome von $m = 3$ bis $m = 8$.

Tabelle 7. Binäre, primitive Polynome zu Erzeugung von linearen rückgekoppelten Schieberegister beziehungsweise zyklischen Simplex-Matrizen und theoretisch mögliche maximale Signal-zu-Rausch-Verstärkung G_{HT} .

| m-bit | $n = 2^m - 1$ Elemente | Binäre, primitive Polynome | G_{HT} |
|-------|------------------------|-----------------------------|----------|
| 3 | 7 | $x^3 + x^2 + 1$ | 1.5 |
| 4 | 15 | $x^4 + x^3 + 1$ | 2.1 |
| 5 | 31 | $x^5 + x^3 + 1$ | 2.9 |
| 6 | 63 | $x^6 + x^5 + 1$ | 4.0 |
| 7 | 127 | $x^7 + x^6 + 1$ | 5.7 |
| 8 | 255 | $x^8 + x^6 + x^5 + x^4 + 1$ | 8.0 |

Als Beispiel und in Anlehnung an **Abbildung 9** sei $m = 4$ gewählt. Gemäß der beschriebenen Vorgehensweise enthält in diesem Fall ein lineares Schieberegister 4 Flipflops, bei

welchem die Stellen 4 und 3, gemäß der auftretenden polynomischen Terme $(x^4 + x^3 + 1)$ mittels XOR-Operators verknüpft sind. Nun wird das Schieberegister mit den ersten Koeffizienten gefüllt; hier 1 0 0 0. Ausschließlich die Werte 0 können nicht verwendet werden, da das System diesen Zustand nie verlassen könnte. Gleichung 5 und 6 folgend, ergibt sich $0 \oplus 0 = 0$. 0 ist der erste generierte Output. Jetzt wird das Register weitergeschoben und der Output an die Stelle 1 gesetzt. Es folgt: 0 1 0 0. Auch hier ist der Output wieder 0. Dieses Vorgehen wird so lange weiter betrieben, bis die erste Folge des Registereintrags wiederholt werden würde. Dies geschieht exakt nach $n = 2^m - 1$ Elementen. Der gesamtheitlich erzeugte Output stellt nun die pseudo-zufällige binäre Sequenz dar, mit deren Hilfe die Simplex-Matrix konstruiert werden kann. Die PRBS wird üblicherweise auch als Barcode visualisiert (vergleiche **Abbildung 9C**).^{218,219}

In der chromatographischen Anwendung werden die Elemente der PRBS als Probeninjektionen („1“) und Blankinjektionen („0“) übersetzt. In solchen Fällen kann HT basiertes Multiplexing als Fließinjektionsanalyse gedeutet werden, bei der in einem gewählten Intervall Δt , der Modulationszeit, die PRBS durchlaufen wird. Es entsteht ein Chromatogramm mit vielfach überlagerten Signalen. Durch Rekonstruktion der Simplex-Matrix und Korrelation des Detektorsignals gemäß Gleichung 2 kann schließlich auf das Chromatogramm einer einfachen Injektion, aber mit signifikant gesteigertem Signal-zu-Rausch-Wert zurückgerechnet werden. Der Gewinn an Sensitivität lässt sich als Mittelung der vielfach injizierten Probe verstehen. Da die Probe aber in einem einzigen Chromatogramm überlagert wird, ergibt sich ein Zeitgewinn im Vergleich zu klassischen Mittelungsstrategien.^{218,219}

Der maximal mögliche Gewinn an Sensitivität G_{HT} lässt sich durch folgende Formel beschreiben:

$$G_{HT} = \frac{(n+1)}{2\sqrt{n}} \approx \frac{\sqrt{n}}{2} \quad (\text{Gl. 7})$$

und lässt sich aus dem allgemeinen Zusammenhang, dass

$$G = \frac{n}{\sqrt{n}} = \sqrt{n}, \quad (\text{Gl. 7})$$

herleiten, wenn man berücksichtigt, dass beim Multiplexing nur $(N+1)/2$ Kanäle Informationen tragen, heißt, Probeninjektionen sind.²⁷³ Vergleiche **Tabelle 7** Eintrag G_{HT} für einen Überblick über maximal erreichbare Sensitivitätssteigerungen in Abhängigkeit von m . Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist allgemein definiert als Peak-Höhe geteilt durch das Basislinienrauschen.²⁷⁴ **Abbildung 10** veranschaulicht diesen Zusammenhang.

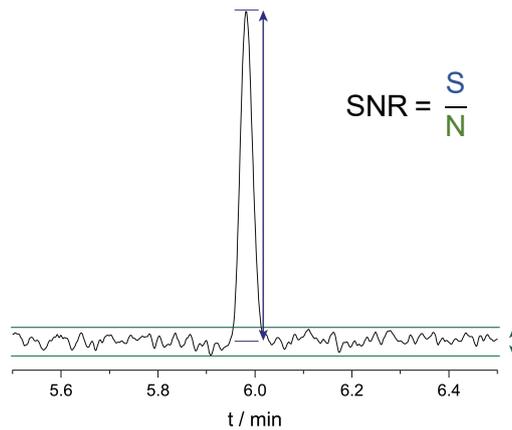


Abbildung 10. Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses.

Die Magnitude des Basislinienrauschens kann in diesem Zusammenhang auf unterschiedliche Weise bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die übliche Definition als 6σ -Bereich der linearen Regression des Rauschens verwendet. SNR-Werte haben analytische Bedeutung als Detektions- und Quantifikationsgrenzen. So wird als das Detektionslimit ein SNR von 3 und als Quantifizierungslimit ein SNR von 10 definiert.^{275,276}

3.2.2. Multiplexing in Chromatographie und Kapillarelektrophorese

Wie in dem vorausgegangenen Kapitel dargestellt wurde, handelt es sich bei Multiplexing um ein im Experimentablauf implementiertes mathematisches Vorgehen, mit dessen Hilfe nicht nur der Durchsatz an Proben durch sequentielle Injektion erhöht, sondern auch die Signalintensität durch Mittelung des Basislinienrauschens verbessert werden kann. Da für die Dekonvolution der überlagerten Daten sowohl die Eigenschaften der Signale als auch ihre zeitliche Modulation konstant bleiben müssen, kann diese Technik nicht für Gradienten-basierte Applikationen Anwendung finden. Dies betrifft in der Hauptsache Elutionsgradienten in der Flüssigchromatographie sowie Temperaturgradienten in der Gaschromatographie. Basierend auf den zuvor genannten Vorteilen konnte das Multiplexing daher Einzug in der Prozesstechnik, wo hauptsächlich mit kontinuierlichen und stabilen Bedingungen gearbeitet wird, und in der Spurenanalyse finden, wo eine zusätzliche Verbesserung der Signalintensität in bestehenden Instrumentenkonfigurationen erzielt werden soll. Typische Anwendungen finden sich daher in der Qualitätskontrolle von Produktionsströmen und Reaktionsüberwachung von schnellen Reaktionen.

Die erste Beschreibung zur Anwendung von Multiplexing in der Chromatographie geht auf Izawa 1967 zurück, der in einem kontinuierlichen Verfahren Gasströme von Stickstoff und Sauerstoff-Gemischen untersuchte.²⁷⁷ Zu diesem Zweck injizierte er Proben in der Form, dass rechteckige Signale an einem pseudo-zufälligem binären Signal-Modulator kontrolliert wurden. Auf diese Weise gelang es ihm, mehrere unterschiedliche Gasströme nur mit Hilfe einer Trennsäule zu beobachten. Die wesentliche Verbesserung dieses Ansatzes bestand dabei in

der effektiveren Ausnutzung der Totzeit einfacher Messungen. Methoden, die in ähnlicher Weise multiple Injektionen in einem experimentellen Lauf (MISER, *multiple injections in a single experimental run*) nutzen, wurden maßgeblich durch die Arbeiten von Welch geprägt.²⁷⁸

Die ersten Arbeiten mit dem Ziel der Steigerung der Signalintensität wurden von Smit veröffentlicht, der allerdings die Datenrückgewinnung nicht basierend auf Hadamard-Transformation durchführte, sondern mittels Kreuzkorrelation. Mit seinem Verfahren und unter Anwendung einer 6-bit Sequenz gelang es ihm, 5 µL *n*-Pentan in 5 L Gas nachzuweisen.²⁷⁹

In der Folge wurde die Entwicklung des Multiplexing-Ansatzes weiter vorangetrieben. Darunter sind die Arbeiten von Annino und Kaljurand zu nennen. In einer Reihe von Publikationen hat ersterer zahlreiche wegbereitende Erkenntnisse veröffentlicht; so zum Beispiel, dass Fluktuationen in der Probenkonzentration die Dekonvolution der Daten beeinträchtigt und so den möglichen Zugewinn an Signal-zu-Rausch-Verhältnis minimiert. Dies wurde im Wesentlichen auf Retentionsinstabilitäten zurückgeführt. Außerdem wurden die Transformationstechniken stetig verbessert und schneller.^{246,280,281} Kaljurand beispielsweise setzte einen schnellen Hadamard-Transformationsalgorithmus ein, um pyrolysierte Polymere zu analysieren.²⁸²⁻²⁸⁴ Smit wiederum war der erste, der ein vollständig Computer-basiertes Multiplexing-System etablierte.^{285,286}

Aus den Ergebnissen der ersten Anwendungen wurde schnell deutlich, dass erfolgreiches und breit-anwendbares Multiplexing schnellere und präzisere Injektoren, Computer-gestützte Dekonvolutionsverfahren und Software-gestützte Bedienung der möglichst unmodifizierten Instrumente bedarf. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet wurden durch Lin *et al.* durchgeführt. Sie entwickelten spezielle Probeninjektoren für die Anwendung in der HT-GC- und HT-HPLC-MS. Für erstere entwarfen sie eine elektronisch kontrollierte Pumpe mit T-Stück und für letztere ein elektromagnetisches Ventil, mit deren Hilfe sie die Drogen 3,4-Methylenedioxy-*N*-methylamphetamin und *N,N*-Dimethyltryptamin untersuchten. So konnten sie mit ihren präzisen Injektionen Intensitätssteigerungen von 6.8 und 10 für 10- und 11-bit Sequenzen erzielen.²⁸⁷⁻²⁹⁰

Ein weiterer wesentlicher Schritt gelang Trapp *et al.* mit der Implementierung eines Macro-gestützten Multiplexing-Ansatzes auf kommerziell erhältlichen HPLC-Instrumenten. Mit ihrer Software-Entwicklung ermöglichen sie es im Prinzip, jedem Nutzer Hadamard-basiertes Multiplexing auf unmodifizierten flüssigchromatographischen Geräten einzusetzen. Sie verifizierten ihren Ansatz in der Trennung von sechs polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, für die sie Signal-zu-Rausch-Verbesserungen zwischen 15.4 und 8.4 für 10-bit Sequenzen realisieren konnten (vergleiche **Abbildung 11A**).²⁹¹⁻²⁹³

Darüber hinaus konnte Trapp eine Strategie zur Hochdurchsatz-Multiplexing-Gas-Chromatographie etablieren, mit welcher unter kurzen Druckimpulsen von 1 bis 5 ms Proben entsprechend einer PRBS injiziert werden können. Dazu findet ein 6-faches Multiplexing-Ventil sowie eine zweite Ebene der Codierung Anwendung. Für Details sei hier auf die Publikationen verwiesen.^{294,295} Mit Hilfe dieser Technologie konnten 100 Proben mit 5 verschiedenen Analyten variierender Konzentration in 50 Minuten analysiert werden (vergleiche **Abbildung 11B**).

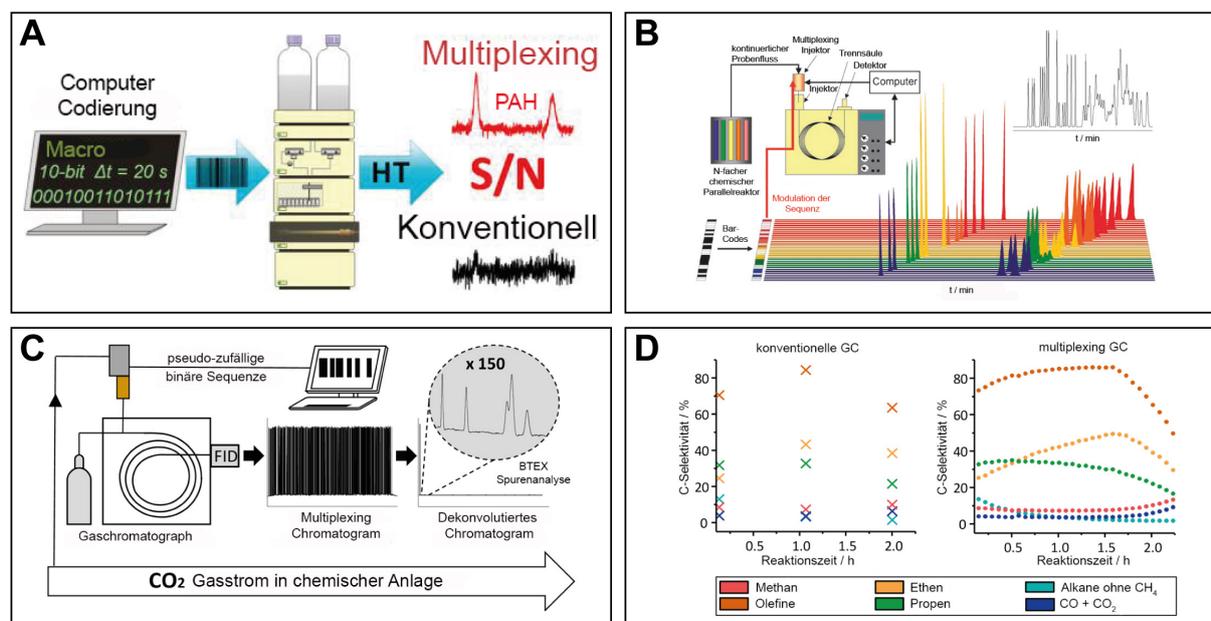


Abbildung 11. Beispiele für die Anwendung von Multiplexing in der Chromatographie. (A) Implementierung des Software- und Macro-unterstützten Multiplexings auf kommerziellen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Systemen. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von A. F. Siegle, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10828-10833.²⁹¹ Copyright 2014 American Chemical Society. (B) Hochdurchsatz-Multiplexing Gas-Chromatographie. Proben werden sequentiell mit Hilfe eines Druck-Impulses auf die Trennsäule injiziert. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von O. Trapp, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 5609-5613.²⁹⁵ Copyright 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. (C) Kontinuierliche Echtzeit-Spurenanalyse mittels Multiplexing Gas-Chromatographie zur Identifizierung von Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol-Isomeren (BTEX) in CO₂-Gas. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von M. R. Wunsch, R. Lehnig, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4038-4045.²⁹⁶ Copyright 2017 American Chemical Society. (D) Echtzeit-Hochdurchsatz-Messungen einer schnellen Katalysereaktion. Mittels des Multiplexing-Ansatzes wurde mit hoher Zeitauflösung die Reaktion von Methanol zu Olefinen beobachtet. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von M. R. Wunsch, R. Lehnig, C. Janke, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 9256-9263.²⁹⁷ Copyright 2018 American Chemical Society.

Weitere aktuelle Multiplexing-Anwendungen beinhalten die Echtzeit-Spurenanalyse von Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol-Isomeren (BTEX) in CO₂-Gasströmen industrieller Anlagen und die zeitaufgelöste Katalyseüberwachung der Umsetzung von Methanol zu Olefinen in der BASF (vergleiche **Abbildung 11C** und **11D**).^{296,297}

Neben der gas- und flüssigkeitschromatographischen Anwendung konnte der Multiplexing-Ansatz ebenso in der Kapillarelektrophorese realisiert werden. So sind verschiedene Verfahren in der Kapillarezonenelektrophorese,^{298,299} Mizellen elektrokinetischen Chromatographie³⁰⁰ und Microchip-Kapillarelektrophorese³⁰¹⁻³⁰⁴ in Kombination mit UV-,³⁰⁵⁻³⁰⁸ LIF-,^{303,309,310} und Amperometrie-Detektion³⁰⁴ bereits etabliert. Ihnen allen gemein ist jedoch, dass es für ihre erfolgreiche Umsetzung zusätzlicher, spezialisierter Hardware bedarf. Dazu zählen pneumatische Autosampler,^{306,311} mikrofabrizierte Einlassstellen oder Schalter verschiedenster Form und Gestaltung^{298,307,308,312} sowie optische Gatter.^{309,313} Nach bestem Wissen des Autors ist nur eine Untersuchung publiziert, welche das Multiplexing in unmodifizierter Hardware exploriert hat. Dazu wurde durch Seiman *et al.* die PRBS durch einen Vial-Austausch am Inlet mit daraus resultierender Spannungs- und Stromunterbrechung realisiert. Allerdings konnten sie durch eine bedingte Inhomogenität der Injektion und Migrationszeiten keine Signalverbesserung für Proben mit mehr als einem Analyten erzielen.³¹⁴ In einer weiteren Arbeit konnten sie zeigen, dass Unterschiede in der elektrischen Leitfähigkeit von Zonen durch beispielsweise Injektion von in Wasser verdünnten Proben zu Probenstapelung führt, durch welche die Migrationsgeschwindigkeiten uneinheitlich moduliert werden und die Dekonvolution der Daten erschwert wird. Sie zeigten ferner, dass dies auch der Fall für größere Probenkonzentrationen ist, wodurch Multiplexing am besten für hoch-verdünnte Proben umsetzbar ist.³¹¹

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über bekannte Hardware-Modifizierungen für den Injektionsprozess vorgestellt werden. Die erste erfolgreiche Multiplexing-Umsetzung in der Kapillarelektrophorese gelang Smit *et al.* mit Hilfe einer Vorrichtung für elektrokinetische Injektionen, die es erlaubt, Injektionen stabil und schnell durchzuführen, ohne dabei das elektrische Feld Störungen auszusetzen. Sie erzielten eine Steigerung der Signalintensität von 5.3 für eine 7-bit-Sequenz für ein Gemisch aus Benzyltrimethylammoniumchlorid und Benzyltriethylammoniumchlorid. **Abbildung 12A** zeigt die Struktur der verwendeten Injektionsvorrichtung, die T-förmiger Natur ist und ein seriell schalten zwischen der linken und rechten beziehungsweise Puffer- und Proben-Hemisphäre erlaubt.³⁰⁷

Ramsey *et al.* wendeten Kreuzkorrelationsmethoden gekoppelt mit Fluoreszenz-Detektion in Microchips an und konnten für eine 9-bit Sequenz Signal-zu-Rausch-Verbesserungen von 17 und 6 für die Verbindungen 2,7-Dichlorfluorescein und Fluorescein erreichen.³⁰³

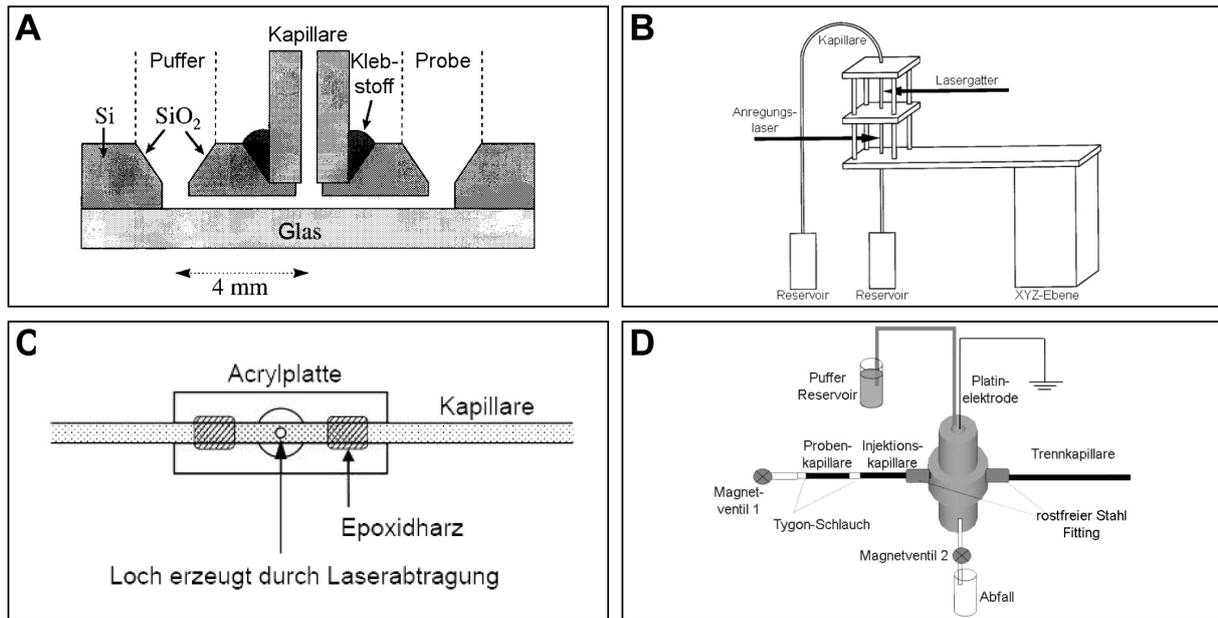


Abbildung 12. Methodische Umsetzungen von Multiplexing in der Kapillarelektrophorese. (A) Injektionsvorrichtung basierend auf einem Microchip zur sequentiellen Injektion von Probe und Puffer ohne Stromunterbrechungen. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von J. N. van der Moolen, H. Poppe, H. C. Smit, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4220-4225.³⁰⁸ Copyright 1997 American Chemical Society. (B) Hadamard Transformation basiertes Photobleaching. Ein Laser dient als Gatter durch Degradation der fluoreszenten Probe; ein zweiter Laser wird zur Anregung der intakten Probe genutzt. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von T. Kaneta, Y. Yamaguchi, T. Imasaka, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5444-5446.³¹³ Copyright 1999 American Chemical Society. (C) Kapillare mit erzeugtem Loch für Probeninjektion durch zweite Hochspannungsquelle. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von K. Hata, T. Kaneta, T. Imasaka, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4421-4425.²⁹⁸ Copyright 2004 American Chemical Society. (D) Darstellung einer Vorrichtung für Druck assistierte Injektionen unter Verwendung von Magnetventilen. Übersetzt und mit Erlaubnis wiedergegeben von L. Gao, E. E. Patterson, 2nd, S. A. Shippy, *Analyst* **2006**, *131*, 222-228.³¹² Copyright 2006 The Royal Society of Chemistry.

Die Kombination mit Fluoreszenz-Detektion wurde anschließend durch Kaneta *et al.* aufgegriffen und mit Hilfe eines optischen Gatters in der Kapillarelektrophorese realisiert. Der schematische Aufbau ihrer Versuchsapparatur ist in **Abbildung 12B** gezeigt.³¹⁵ Durch Verwendung von zwei Lasern, von denen der eine durch Fotobleaching eine definierte PRBS moduliert und der andere zur Anregung der Fluoreszenz dient, gelang es ihnen, die Empfindlichkeit in der Detektion um einen Faktor von 8 und später 18 zu steigern. Sie waren in diesem Zusammenhang die ersten, die mit Hilfe der Fluoreszenz-Detektion das LOD von Analyten in den sub-nano- und subpicomolaren Bereich bringen konnten.^{302,316,317}

Eine weitere Methode zur Realisierung des Multiplexing-Ansatzes wurde durch Imasaka eingeführt, welcher einen zusätzlichen Probeneingang mit eigener Hochspannungsquelle in der Kapillare nutzt, der durch Anwendung eines Lasers erzeugt wird. Für Sequenzen der Länge 8-bit erzielten sie Intensitätssteigerungen von bis zu 6.5. **Abbildung 12C** zeigt den schematischen Versuchsaufbau.²⁹⁸

Eine ähnliche T-artige Kombination von Proben-, Puffer- und Trennkapillare, aber für die Verwendung von hydrodynamischen Injektionen wurde schließlich durch Shippy *et al.* eingeführt. Sie designten einen aus Polycarbonat bestehenden Konnektor, der durch zwei Magnetventile den Zugang zur Trennkapillare kontrolliert (vergleiche **Abbildung 12D**). Das Magnetventil 1 dient dabei als Injektionsventil, während Ventil 2 die Aufgabe der Kontrolle des transversalen Flusses übernimmt. Mit Hilfe dieser Konstruktion ist es möglich, aus einer aus wenigen Mikrolitern bestehenden Probe reproduzierbar 5 nL Probenvolumina entsprechend einer PRBS mit hoher Genauigkeit zu injizieren. Die Autoren nutzten ihr System für den Nachweis von Nitrit und Nitrat und erreichten eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von 3.6 für eine Sequenz der Länge 6-bit.³¹²

Wie aus den Darstellungen zur Realisierung des Multiplexing-Ansatzes in der Kapillarelektrophorese deutlich wurde, existierte in der Literatur keine Methode, die ihre Verwendung auf kommerziellen, unmodifizierten Instrumenten ermöglichen würde. In der Folge handelte es sich stets um eine Spezialanwendung für einen kleinen Kreis an Experten ohne relevante Applikationen.

4. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden im Wesentlichen zwei Themenbereiche bearbeitet: (1) die Untersuchung und Aufklärung von präbiotischen Reaktionsnetzwerken und (2) die Implementierung einer Multiplexing-Methode basierend auf der Hadamard-Transformation in der Kapillarelektrophorese ohne notwendige instrumentelle Modifikationen. Die genannten Projekte wurden dabei, wie folgt, untergliedert:

(1) Untersuchung und Aufklärung von präbiotischen Reaktionsnetzwerken

Innerhalb dieses Themenschwerpunktes wurde drei Aufgabenstellungen durch den Autor nachgegangen:

(a) Abschluss der Untersuchung und Charakterisierung der stereodynamischen Tetrahydrobiisoindol-Liganden „NU-BIPHEP(O)s“ als Modellsysteme für asymmetrische Amplifikation

Wie zuvor in den Ausführungen zu **Kapitel 5.1.4 Homochiralität** deutlich wurde, wird nach derzeitiger Lehrmeinung davon ausgegangen, dass sich geringe Enantiomerenüberschüsse in Folge noch ungeklärter, chiraler Selektionswege für kleine terrestrische und extraterrestrische Moleküle gebildet haben, die durch physikalische und/oder chemische Mechanismen amplifiziert wurden. Ein ideales Modellsystem zur Erforschung der zugrunde liegenden Prinzipien und Wirkungsweisen besteht in stereodynamischen Biphenyl-basierten Liganden, die unter anderem in der Rhodium-katalysierten Hydrierung von Kohlenstoffdoppelbindungen eingesetzt werden können. Nach Synthese und Modifizierung der bereits bekannten Klasse der NU-BIPHEP(O) sollen diese als Teil dieser Dissertation abschließend hinsichtlich ihrer Rotationsbarrieren und nicht-kovalenter Wechselwirkungen untersucht und charakterisiert werden. Dazu sollen NMR-Studien zur Bildung von diastereomeren Addukten und die enantioselektive dynamische HPLC durchgeführt werden. Diese Arbeiten sollen in Kooperation mit Golo Storch erfolgen.

(b) Untersuchung des meteoritischen Materials Schreibersits (Fe_3P) in Bezug auf Korrosionsverhalten in Wasser, der effektiven Phosphorylierungsfähigkeit und Reaktivität gegenüber kleinen organischen Molekülen

Bei dem meteoritischen Material Schreibersit (Fe_3P) handelt es um ein Mineral mit Phosphor in einer unter terrestrischen Bedingungen ungewöhnlich niedrigen Oxidationsstufe. Unter Oxidation in wässrigem Medium in Form eines korrosiven Prozesses setzt dieses Mineral reaktive Phosphoroxo-Anionen und -Radikale frei, die nachweislich biologisch relevante Moleküle wie Glycerol und Nukleoside unter schlechter Ausbeute phosphorylieren können (vergleiche Kapitel **5.1.2. Phosphorylierungen**). Über die Produktverteilung der sich

Aufgabenstellung

bildenden Phosphoroxo-Anionen besteht in der Literatur noch Uneinigkeit. Daher soll im Rahmen dieses Projektes zunächst eine Trennmethode entwickelt werden, mit deren Hilfe die relevanten Phosphoroxo-Anionen nicht nur nachgewiesen, sondern auch ihr Entstehung während der Korrosion überwacht und quantifiziert werden können. Dabei soll sichergestellt werden, dass die Spezies von Interesse unter den verwendeten Trennbedingungen hinreichend stabil sind. In einem nächsten Schritt soll die Korrosion unter verschiedenen Parametern wie Temperatur, Druck, Atmosphäre und Salzkonzentration hinsichtlich ihrer Produktverteilung charakterisiert werden. Anschließend soll die Reaktivität gegenüber kleinen, organischen Molekülen mit biologischer Relevanz (Zucker, Aminosäuren, Amphiphile) getestet werden. Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse soll schließlich eine präbiotische Relevanz für das Szenario von eingetragener Schreibersite abgeleitet werden. Dieses Forschungsvorhaben soll zusammen mit Jana Šteflová und Ann-Kathrin Henß bearbeitet werden.

(c) Untersuchung und Aufklärung von Reaktionsbedingungen zur präbiotischen Bildung von Monosacchariden

Eine der wesentlichen Ansätze zur präbiotischen Erzeugung von Monosacchariden ist die Formose-Reaktion (siehe **Kapitel 5.1.3. Monosaccharidsynthese**). Dabei reagiert Formaldehyd unter Anwesenheit eines basischen Katalysators und eines endiolisierenden Ko-Katalysators zu einem komplexen Reaktionsnetzwerk bestehend aus Monosacchariden unterschiedlicher Länge, Verzweigung und Konfiguration. In diesem Teilprojekt soll untersucht werden, inwiefern die Formose-Reaktion und Teilprozesse ihres Netzwerkes in meteoritischen Szenarien realisierbar sind. Dazu soll in einem ersten Schritt eine mögliche präbiotische Verknüpfung von Monosacchariden mit dem meteoritischen Material Schreibersit im Zentrum der Fragestellung stehen. Dies beinhaltet Versuche zur Stabilität, Phosphorylierbarkeit und Reaktivität einfacher Monosaccharide in Anwesenheit von Fe_3P . Im weiteren Verlauf der Untersuchung zur Bildung von Monosacchariden soll motiviert von Arbeiten zur mechanochemischen Durchführbarkeit von Aldolreaktionen die Synthese einfacher Zucker unter nicht-wässrigen Bedingungen und unter Einfluss mechanischer Energie getestet werden. Auf diese Weise kann ein Bezug zu sogenannten Einschlagszenarien hergestellt werden. Abschließend soll unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse eine Abschätzung zur Plausibilität der Formose-Reaktion gemacht werden. Diese thematischen Fragestellungen sollen dabei in Kooperation mit Saskia Lamour und Maren Haas bearbeitet werden.

(2) Implementierung des Hadamard-Transformation-Multiplexings auf kommerziellen, unmodifizierten Geräten

Aus den Ausführungen zu dem **Kapitel 5.2.2. Multiplexing in Chromatographie und Kapillarelektrophorese** ist deutlich geworden, dass es sich bei dem genannten Verfahren um eine orthogonale Strategie handelt, um sowohl den Durchsatz an Proben als auch das Signal-

zu-Rausch-Verhältnis mit bestehender Instrumentation signifikant zu steigern. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Trapp ist es in diesem Zusammenhang bereits gelungen, eine Macro- und Software-basierte Methode für die HPLC zu etablieren, mit deren Hilfe auf unmodifizierten Instrumenten für Alltagsanwender der Flüssigkeitschromatographie Multiplexing realisierbar wird. Für die Kapillarelektrophorese existiert ein solches Verfahren nicht, da Anwendungen stets auf speziell gefertigte Injektoren oder Detektionsaufbauten angewiesen sind. In diesem Forschungsvorhaben soll daher die mögliche Implementierung des Hadamard-Transformation-Ansatzes auf unmodifizierten Instrumenten untersucht und Lösungen für identifizierte Limitierung entwickelt werden. Das Projekt unterteilt sich in zwei Phasen und wird in Zusammenarbeit mit Alexander Siegle und Jana Šteflová bearbeitet.

(a) Entwicklung eines experimentellen Ansatzes zur Realisierung von Hadamard-basiertem Multiplexing auf unmodifizierten Instrumenten für die Kapillarelektrophorese

Zunächst soll ein experimenteller Ansatz gefunden werden, unter dessen Setup Multiplexing durchgeführt werden kann. Dabei sollen auftretende, kritische Phänomene identifiziert und charakterisiert werden. Befunde sollen dabei theoretisch und durch Simulationen bestätigt werden. Auf dieser Grundlage sollen Lösungsvorschläge im experimentellen Ablauf entwickelt und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit getestet werden. Übergeordnetes Ziel soll dabei sein, keine Hardware-Modifikationen in das bestehende Instrument einzuführen. Schließlich soll eine gesamtheitliche Methode gefunden werden, mit deren Hilfe HT für Sequenzen der Mindestlänge von 8-bit mit signifikanter Signal-zu-Rausch-Verstärkung realisiert werden können.

(b) Verifizierung und Validierung der gefundenen Methode

Im zweiten Teil des Projektes soll die entwickelte Methode sowohl verifiziert als auch validiert werden. Zu diesem Zweck soll ein Standard-Mix und eine biologische Probe mit anwendungsbezogenem Interesse Verwendung finden. Bei der Wahl der Probe soll zudem eine thematische Nähe zu einer analytischen Applikation im Zusammenhang mit der Erforschung des Lebens stehen. Mit Hilfe dieser Tests sollen dabei die Vorteile, aber auch die Limitierungen der Methode herausgearbeitet werden. Insbesondere für letztere soll zusätzlich eine Ursachenanalyse durchgeführt werden, um potentiellen Nutzern der Methode eine Abschätzung der Nützlichkeit und Durchführbarkeit zu erlauben.

5. Veröffentlichte Arbeiten

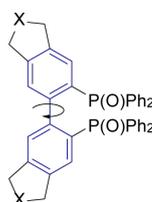
5.1. Stereodynamische Tetrahydrobiisindol „NU-BIPHEP(O)“s: Funktionalisierung, Rotationsbarrieren und nicht-kovalente Wechselwirkungen

Golo Storch, **Sebastian Pallmann**, Frank Rominger und Oliver Trapp, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1453-1458.²¹²

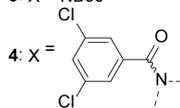
Kurzzusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchungen zu stereodynamischen Liganden auf Basis von Biphenylen im Arbeitskreis Trapp wurde die Zugänglichkeit, Modifizierbarkeit und Eigenschaften von sogenannten Newcastle University (NU)-BIPHEP(O)s exploriert. Die Synthesestrategie beruhte auf der bereits etablierten zweifachen Rhodium-katalysierten [2+2+2] Cycloaddition eines 1,4-Bis(diphenylphosphanyl)buta-1,3-diins und zweier Di(prop-2-in-1-yl)-Einheiten von Doherty *et al.*³¹⁸ In der vorliegenden Publikation sind auf diese Weise vier verschiedene NU-BIPHEP(O)-Liganden synthetisiert worden, von welchen einer mit einer im Rückgrat befindlichen 3-Punkt-Wechselwirkungsbindungsstelle (3,5-Dichlorbenzoylamidyl) modifiziert wurde. Für die etablierten Systeme wurden Studien zur nicht-kovalente Wechselwirkung mit Okamoto-artigen Cellulose Derivaten und on-column Deracemisierung durchgeführt. Außerdem wurden mittels enantioselektiver dynamischer HPLC die Rotationsbarrieren für zwei Liganden bestimmt. Diese Ergebnisse haben einen Beitrag zum Verständnis und zur Entwicklung stereodynamischer Liganden nach Design und deren Anwendung in der enantioselektiven Katalyse geleistet.

NU-BIPHEP(O)



- 1: X = CH₂
- 2: X = NTs
- 3: X = NBoc

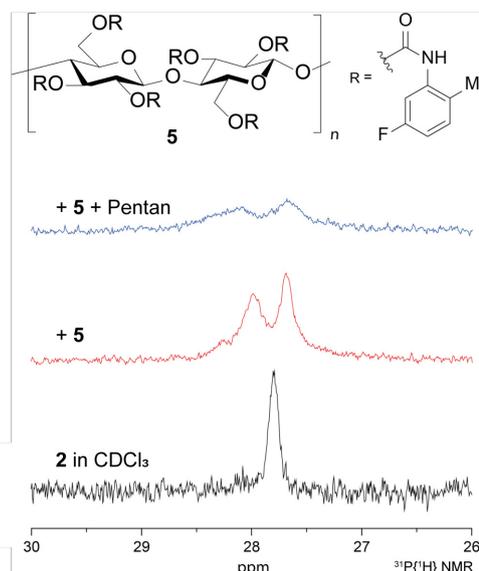


Rotationsbarrieren

1: $\Delta G_{298\text{ K}}^{\ddagger} = 92.2 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$

3: $\Delta G_{298\text{ K}}^{\ddagger} = 99.5 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$

nicht-kovalente Wechselwirkungen



Autorenbeitrag

Projekt- und Syntheseidee wurden von OT und GS entworfen. SP hat die Verbindungen synthetisiert und in der Hauptsache charakterisiert. Enantioselektive dynamische HPLC

Veröffentlichte Arbeiten

Messungen wurden gemeinschaftlich durch GS und SP durchgeführt. Datenauswertung und -interpretation erfolgte in Zusammenarbeit zwischen SP, GS und OT. GS hat die Publikation geschrieben. Ein Teil der Ergebnisse wurde vor Beginn der eigenen Promotion erhalten. Das Projekt wurde innerhalb der Promotion abgeschlossen und veröffentlicht.

Lizenz

Gemäß der *Creative Commons Attribution License 2.0*, unter welcher der genannte Artikel im *Beilstein Journal of Organic Chemistry* veröffentlicht wurde, liegt das Urheberrecht bei den Autoren und erlaubt diesen die uneingeschränkte Verwendung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien, sofern der originale Beitrag korrekt zitiert ist.



Stereodynamic tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)”s: functionalization, rotational barriers and non-covalent interactions

Golo Storch, Sebastian Pallmann, Frank Rominger and Oliver Trapp*

Full Research Paper

Open Access

Address:
Organisch-Chemisches Institut, Ruprecht-Karls Universität
Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg, Germany

Email:
Oliver Trapp* - trapp@oci.uni-heidelberg.de

* Corresponding author

Keywords:
atropisomer; enantioselective DHPLC; ligand design; non-covalent interactions; Okamoto phases; phosphine ligand; stereodynamic ligands

Beilstein J. Org. Chem. 2016, 12, 1453–1458.
doi:10.3762/bjoc.12.141

Received: 08 April 2016
Accepted: 28 June 2016
Published: 14 July 2016

This article is part of the Thematic Series "Organometallic chemistry".

Guest Editor: B. F. Straub

© 2016 Storch et al.; licensee Beilstein-Institut.
License and terms: see end of document.

Abstract

Stereodynamic ligands offer intriguing possibilities in enantioselective catalysis. “NU-BIPHEPs” are a class of stereodynamic diphosphine ligands which are easily accessible via rhodium-catalyzed double [2 + 2 + 2] cycloadditions. This study explores the preparation of differently functionalized “NU-BIPHEP(O)” compounds, the characterization of non-covalent adduct formation and the quantification of enantiomerization barriers. In order to explore the possibilities of functionalization, we studied modifications of the ligand backbone, e.g., with 3,5-dichlorobenzoyl chloride. Diastereomeric adducts with Okamoto-type cellulose derivatives and on-column deracemization were realized on the basis of non-covalent interactions. Enantioselective dynamic HPLC (DHPLC) allowed for the determination of rotational barriers of $\Delta G^{\ddagger}_{298K} = 92.2 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $99.5 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ underlining the stereodynamic properties of “NU-BIPHEPs” and “NU-BIPHEP(O)s”, respectively. These results make the preparation of tailor-made functionalized stereodynamic ligands possible and give an outline for possible applications in enantioselective catalysis.

Introduction

Axially chiral biaryl compounds such as BINAP (2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl) represent widely used and highly efficient ligands that can be applied in a variety of enantioselective catalytic transformations. Unlike BINAP, the related stereodynamic BIPHEP (2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-biphenyl) ligands have a significantly lower barrier of rota-

tion around the central C–C bond regarding the conversion of the enantiomers into one another. This enables fast enantiomerization at room temperature.

This, however, does not conflict with their usage in enantioselective catalysis. Noyori and Mikami reported the stereochemi-

cal alignment of BIPHEP ligands in ruthenium complexes upon addition of chiral diamine co-ligands [1,2]. The resulting complexes were successfully employed in enantioselective ketone hydrogenation. Further examples of such systems are BIPHEP complexes of rhodium [3-6], palladium [7,8], platinum [9,10] and gold [11-13] in combination with chiral co-ligands or counter ions that are used after alignment of the ligand's axial chirality.

One major advantage of stereodynamic ligands is that there is no need for separate preparation of one ligand enantiomer as long as their chirality can be controlled by chiral additives or auxiliaries. In addition, the simultaneous presence of both axially chiral BIPHEP enantiomers can be beneficial as this allows bidirectional control of enantioselectivity depending on temperature [14,15]. In this approach, both product enantiomers of an enantioselective transformation can be addressed selectively by fine tuning of the conditions prior to and during catalysis.

The rotational barrier around the central C–C bond of BIPHEP ligands is a key property of stereodynamic ligands that determines the temperature required for ligand enantiomerization as well as the half-life of isolated enantiomers. The latter are of particular importance if chiral co-ligands are cleaved off prior to catalysis and if the remaining stereochemically aligned BIPHEP complex fragment serves as the active species. Therefore, detailed knowledge of the interconversion barriers of stereodynamic ligands is crucial for the choice of conditions used for stereochemical alignment and subsequent application in catalysis. A rotational barrier of 92 kJ mol⁻¹ for the unsubstituted BIPHEP was determined by NMR coalescence of a partially deuterated derivative [16]. However, this method does not fulfil the requirements for a reliable rapid screening of novel stereodynamic ligands due to harsh conditions such as isotope exchange. We recently reported the rotational barriers of 3,3' and 5,5' substituted BIPHEP and BIPHEP(O) compounds based on enantioselective DHPLC by evaluation of elution profiles using the unified equation [17-20]. Rotational barriers were found to be between $\Delta G_{298K}^\ddagger = 86.8$ kJ mol⁻¹ (unsubstituted BIPHEP) and $\Delta G_{298K}^\ddagger = 100.4$ kJ mol⁻¹. BIPHEP(O) derivatives (unsubstituted BIPHEP(O): $\Delta G_{298K}^\ddagger = 88.6$ kJ mol⁻¹) were observed to exhibit slightly increased (approximately 2 kJ mol⁻¹) barriers.

Functionalization of stereodynamic BIPHEP ligands at the biaryl core offers multiple possibilities. The introduction of achiral, non-covalent interaction sites allows for ee determination of chiral analytes via NMR spectroscopy [21] as well as deracemization of the BIPHEPs with HPLC stationary phases [22].

However, introduction of functional groups which enable a modular derivatization approach is often hampered by long and tedious synthetic procedures. Doherty et al. reported a rhodium catalyzed double [2 + 2 + 2] cycloaddition strategy for a convergent synthesis of “NU-BIPHEP”s [23].

In this paper, we describe the application of Doherty's synthetic strategy for the synthesis of stereodynamic tetrahydrobiisindole “NU-BIPHEP(O)” compounds bearing secondary amino groups for functionalization. The attachment of a 3,5-dichlorobenzoyl binding site is reported and non-covalent interactions as well as rotational barriers are studied in solution by (D)HPLC techniques.

Results and Discussion

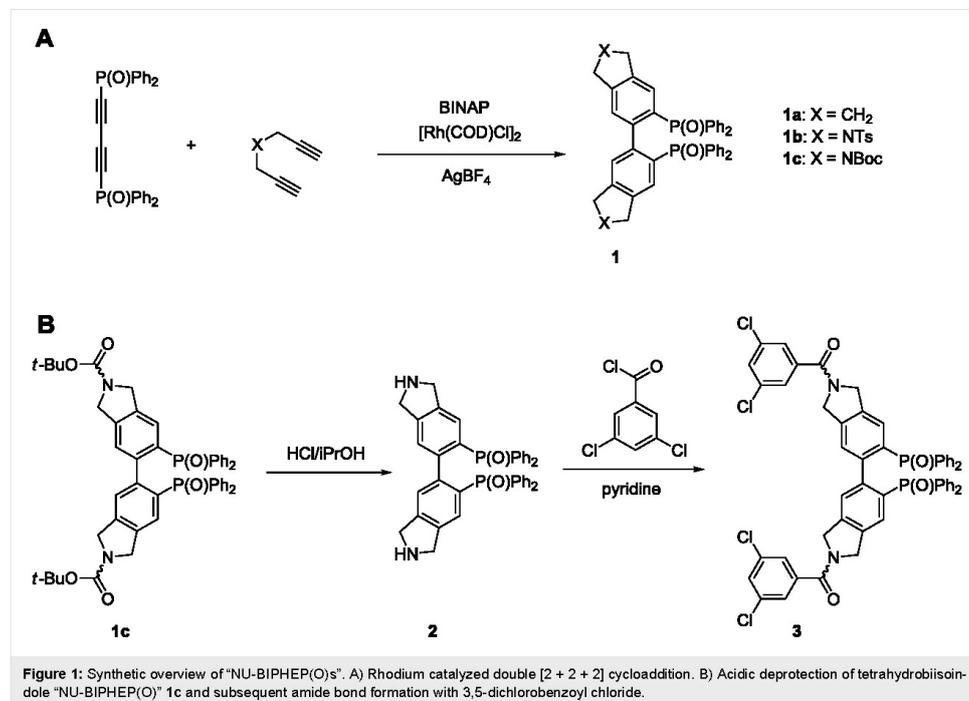
Synthesis of tetrahydrobiisindole “NU-BIPHEP(O)s”

The rhodium catalyzed double [2 + 2 + 2] cycloaddition of 1,4-bis(diphenylphosphinoyl)buta-1,3-diyne and a variable diyne compound is the key step in the preparation of “NU-BIPHEPs” [23] and related biaryls [24]. Doherty et al. reported the use of various diynes yielding for instance tetrahydrobiindene **1a** and *N*-tosyl-protected tetrahydrobiisindole **1b** as the only *N*-heterocyclic compound (Figure 1A).

Aiming at facile deprotection and enabling subsequent functionalization at the secondary amine position, we changed the strategy and used *N*-Boc dipropargylamine as the diyne compound (Figure 1A). The double cycloaddition product **1c** was obtained in 77% yield. In accordance with the report of Doherty et al., very slow addition of the diyne compound via syringe pump was crucial.

In contrast to **1a** and **1b**, three coexisting isomeric species were observed with NMR spectroscopy in CDCl₃ for tetrahydrobiisindole “NU-BIPHEP(O)” **1c**. This behaviour originates from an increased interconversion barrier between the *E/Z* isomers of the carbamate N–C(O) unit that is derived from a secondary amine. Deprotection of **1c** proceeds smoothly with 5–6 M HCl in 2-propanol and the tetrahydrobiisindole “NU-BIPHEP(O)” **2** can be isolated as hydrogen chloride salt in 93% yield (Figure 1B).

Tetrahydrobiisindole “NU-BIPHEP(O)” **2** offers various possibilities for functionalization with chiral and achiral auxiliaries or binding sites. In this study, we chose amide bond formation with 3,5-dichlorobenzoyl chloride (Figure 2B) in connection with our recent report [21] on non-covalent interaction properties of stereodynamic BIPHEP ligands with this binding site that is well known in HPLC stationary phase design. The “NU-BIPHEP(O)” **3** was isolated in 49% yield and again three



isomeric species were observed by NMR spectroscopy in CDCl₃ due to hindered rotation of the tertiary amide bond (Figure 2A).

Intriguingly, only two peaks were observed upon investigation of **3** by enantioselective HPLC applying *n*-hexane/2-propanol as mobile phase and a normal phase Okamoto-type stationary phase (CHIRALPAK® IA-3). Opposing signals in HPLC–CD coupling corroborated the assumption that the peaks correspond to two axially chiral enantiomers (Figure 2B).

When left on the chiral stationary phase (*n*-hexane/2-propanol 50:50, CHIRALPAK® IA) for seven days in a stopped-flow experiment, partial deracemization of **3** was observed. The final enantiomeric ratio (absolute configurations were not determined) was observed to reach approximately 72:28.

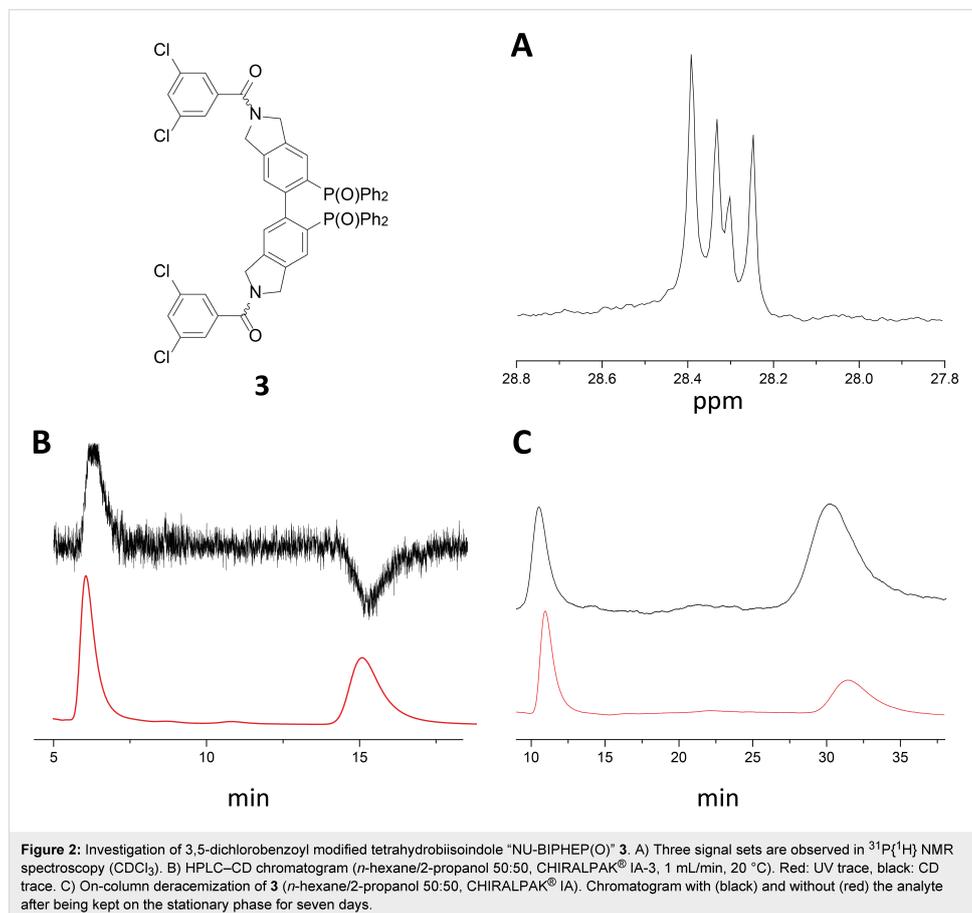
Non-covalent interactions in solution

Non-covalent interactions are not only a key step in deracemization of stereodynamic compounds but they also allow ee determination in solution by NMR spectroscopy. However, the formation of diastereomeric adducts between chiral compounds and BIPHEP(O) [25] or BINAP(O) [26] has so far rarely been

investigated. In a subsequent part of our study, we explored the non-covalent interactions of tetrahydroisindole “NU-BIPHEP(O)s” in solution since they exhibit very strong interactions with Okamoto-type chiral stationary phases (CSPs) in HPLC.

Okamoto et al. reported the preparation of short CSP-analogue cellulose and amylose compounds with carbamate selector units that are soluble in organic solvents [27–30]. We prepared cellulose derivative **4** which bears 5-fluoro-2-methylphenylcarbamate binding sites [27] and investigated the formation of diastereomeric adducts with **1b** and **3** by ³¹P{¹H} NMR spectroscopy in anhydrous CDCl₃. Significant signal splitting was observed for both “NU-BIPHEP(O)s” due to strong non-covalent interactions. However, detailed analysis of **3** was hampered due to overlaying multiple signal sets caused by *E/Z* isomerism of the tertiary amide unit.

Adding **4** to a solution of **1b** (Figure 3A, solid-state structure) in CDCl₃ resulted in significant signal splitting of Δδ = 0.30 ppm (³¹P{¹H} NMR). This effect could be intensified by adding *n*-pentane which increased the splitting to Δδ = 0.41 ppm although signal broadening rose simultaneously (Figure 3B).

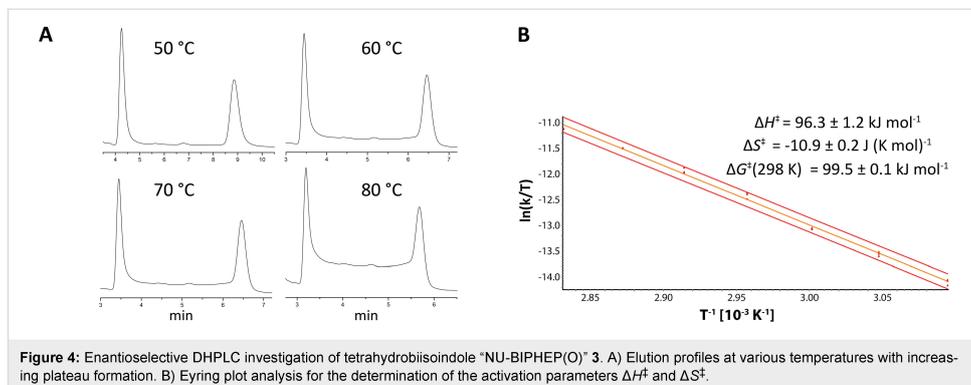
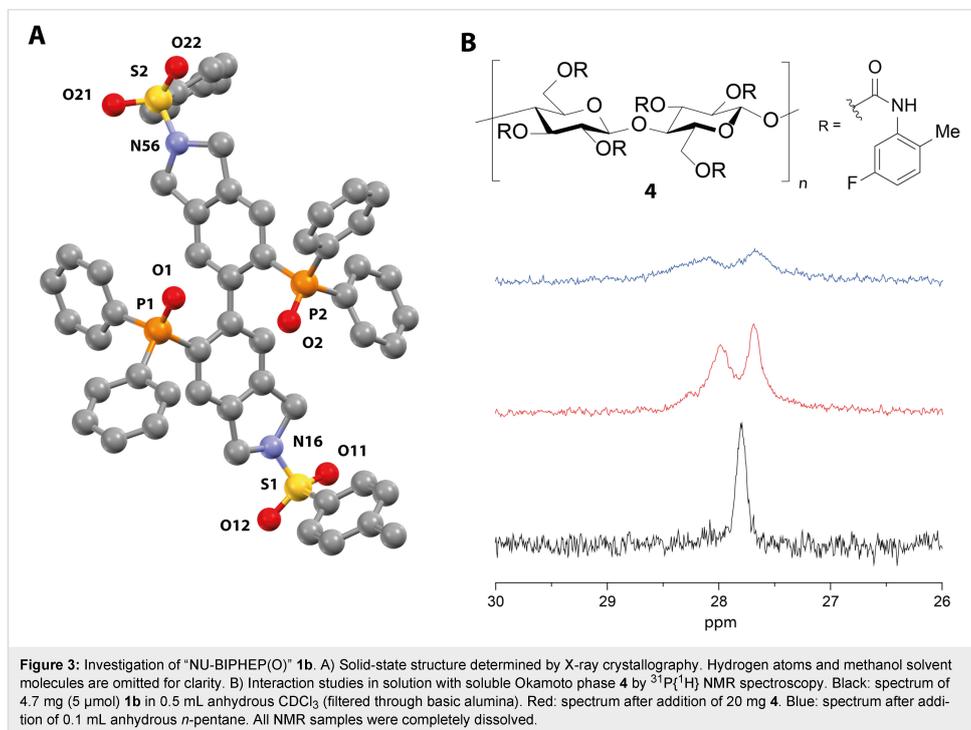


Determination of rotational barriers by enantioselective DHPLC

To the best of our knowledge the enantiomerization properties of "NU-BIPHEP(O)s" have not yet been studied. Therefore, we investigated the rotational barriers of **1a** and **3** by enantioselective DHPLC. Elution profiles of **3** were obtained in a temperature range between 50.0 °C and 80.0 °C (CHIRALPAK[®] IA-3, t_{ret} (50 °C) = 4.25 and 8.87 min, $\alpha = 2.42$, Figure 4A). All rate constants and corresponding Gibbs free energies of activation were directly calculated using the unified equation and the Eyring equation. This elution profile evaluation was done using the DCXplorer software which can be obtained from the corresponding author upon request. A rotational barrier of $\Delta G_{298\text{K}}^\ddagger = 99.5 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ was determined for the interconversion of **3**. This is a significant increase compared to unsubstituted

BIPHEP(O) ($\Delta G_{298\text{K}}^\ddagger = 88.6 \text{ kJ mol}^{-1}$). Eyring plot analysis allowed the determination of the activation parameters $\Delta H^\ddagger = 96.3 \pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta S^\ddagger = -10.9 \pm 0.2 \text{ J (K mol)}^{-1}$ (Figure 4B). The increased rotational barrier of **3** can be rationalized according to additional interactions and steric repulsion of the large 3,5-dichlorobenzoyl amide binding sites. It has to be noted that the entropic contribution to the enantiomerization barrier is exceptionally low.

For comparison, we investigated tetrahydrobiindene "NU-BIPHEP(O)" **1a** in a similar way (see Supporting Information File 1 for details). The elution profiles were evaluated in a temperature range between 20.0 °C and 45.0 °C (CHIRALPAK[®] IE-3, t_{ret} (20 °C) = 14.2 and 26.6 min, $\alpha = 1.94$). A rotational barrier of $\Delta G_{298\text{K}}^\ddagger = 92.2 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ was determined and



subsequent Eyring plot analysis gave the activation parameters $\Delta H^\ddagger = 68.4 \pm 1.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta S^\ddagger = -79.9 \pm 4.5 \text{ J (K mol)}^{-1}$. Interestingly, the activation parameters of **1a** are similar to those reported for 5,5'-dimethoxy BIPHEP(O) ($\Delta G_{298\text{K}}^\ddagger = 93.0 \text{ kJ mol}^{-1}$) [20] which is in accordance with a barrier increase caused by small substituents in the 5,5' positions.

Conclusion

We report a strategy to use unprotected tetrahydrobiisindole "NU-BIPHEP(O)" for functionalization with substituents at the secondary amine position, in this study namely by formation of tertiary amide binding sites with 3,5-dichlorobenzoyl chloride. Non-covalent interactions of "NU-BIPHEP(O)s" with

Okamoto-type cellulose derivatives resulted in the formation of diastereomeric adducts which led to significant NMR signal splitting in solution and additionally enabled successful on-column deracemization. Furthermore, interconversion barriers of $\Delta G_{298K}^{\ddagger} = 92.2 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta G_{298K}^{\ddagger} = 99.5 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ were determined by evaluation of enantioselective DHPLC elution profiles quantifying the stereodynamic properties of “NU-BIPHEP(O)” compounds. These results help understanding the influence of substitution patterns on the enantiomerization barrier of BIPHEP ligands and open up new possibilities towards designing tailor-made stereodynamic compounds used as smart ligands in enantioselective catalysis.

Supporting Information

Supporting Information File 1

Experimental procedures, data for the determination of rotational barriers and copies of NMR spectra.

[<http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-12-141-S1.pdf>]

Acknowledgements

Generous financial support by the European Research Council (ERC) for a Starting Grant (No. 258740, AMPCAT) is gratefully acknowledged. G.S. acknowledges the Fonds der Chemischen Industrie for a Ph.D. fellowship.

References

- Mikami, K.; Korenaga, T.; Terada, M.; Ohkuma, T.; Pham, T.; Noyori, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 495. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990215)38:4<495::AID-ANIE495>3.0.CO;2-O
- Mikami, K.; Aikawa, K.; Korenaga, T. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 243. doi:10.1021/ol0068896
- Mikami, K.; Kataoka, S.; Yusa, Y.; Aikawa, K. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3699. doi:10.1021/ol048604l
- Mikami, K.; Kataoka, S.; Wakabayashi, K.; Aikawa, K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6361. doi:10.1016/j.tetlet.2006.06.179
- Aikawa, K.; Takabayashi, Y.; Kawauchi, S.; Mikami, K. *Chem. Commun.* **2008**, 5095. doi:10.1039/b809683j
- Punniyamurthy, T.; Mayr, M.; Dorofeev, A. S.; Bataille, C. J. R.; Gosiewska, S.; Nguyen, B.; Cowley, A. R.; Brown, J. M. *Chem. Commun.* **2008**, 5092. doi:10.1039/b807669c
- Mikami, K.; Aikawa, K.; Yusa, Y. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 95. doi:10.1021/ol0169675
- Mikami, K.; Aikawa, K.; Yusa, Y.; Hatano, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 91. doi:10.1021/ol016969p
- Becker, J. J.; White, P. S.; Gagné, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9478. doi:10.1021/ja016167p
- Mikami, K.; Kakuno, H.; Aikawa, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7257. doi:10.1002/anie.200502682
- Aikawa, K.; Kojima, M.; Mikami, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6073. doi:10.1002/anie.200902084
- Kojima, M.; Mikami, K. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 13950. doi:10.1002/chem.201103023
- Kojima, M.; Mikami, K. *Synlett* **2012**, 57. doi:10.1055/s-0031-1289875
- Storch, G.; Trapp, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 3580. doi:10.1002/anie.201412098
- Oczipka, P.; Müller, D.; Leitner, W.; Franció, G. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 678. doi:10.1039/C5SC03465E
- Desponds, O.; Schlosser, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 47. doi:10.1016/0040-4039(95)02080-2
- Trapp, O. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 42. doi:10.1016/j.jchromb.2008.07.047
- Trapp, O. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 189. doi:10.1021/ac051655r
- Maier, F.; Trapp, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 2985. doi:10.1002/anie.201107907
- Maier, F.; Trapp, O. *Chirality* **2012**, *25*, 126. doi:10.1002/chir.22125
- Storch, G.; Siebert, M.; Rominger, F.; Trapp, O. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15665. doi:10.1039/C5CC06306J
- Maier, F.; Trapp, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 8756. doi:10.1002/anie.201402293
- Doherty, S.; Knight, J. G.; Smyth, C. H.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4925. doi:10.1021/ol702390p
- Mori, F.; Fukawa, N.; Noguchi, K.; Tanaka, K. *Org. Lett.* **2010**, *13*, 362. doi:10.1021/ol102927y
- Demchuk, O. M.; Świerczyńska, W.; Michał Pietrusiewicz, K.; Woźnica, M.; Wójcik, D.; Frelek, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2339. doi:10.1016/j.tetasy.2008.10.001
- Hatano, B.; Hashimoto, K.; Katagiri, H.; Kijima, T.; Murakami, S.; Matsuba, S.; Kusakari, M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3595. doi:10.1021/jo202630p
- Yashima, E.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4036. doi:10.1021/ja960050x
- Yamamoto, C.; Yashima, E.; Okamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12583. doi:10.1021/ja020828g
- Ye, Y. K.; Bai, S.; Vyas, S.; Wirth, M. J. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1189. doi:10.1021/jp0637173
- Ikai, T.; Okamoto, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6077. doi:10.1021/cr8005558

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<http://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: [doi:10.3762/bjoc.12.141](https://doi.org/10.3762/bjoc.12.141)

Supporting Information

for

Stereodynamic tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)”s: functionalization, rotational barriers and non-covalent interactions

Golo Storch, Sebastian Pallmann, Frank Rominger and Oliver Trapp*

Address: Organisch-Chemisches Institut, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg, Germany

Email: Oliver Trapp - trapp@oci.uni-heidelberg.de

* Corresponding author

Experimental procedures, data for the determination of rotational barriers and copies of NMR spectra

S1

Table of Contents

| | |
|--|-----|
| 1. General remarks..... | S3 |
| 1.1. Synthetic techniques, solvents and chemicals | S3 |
| 1.2. NMR Spectroscopy | S3 |
| 1.3. Mass spectrometry | S3 |
| 1.4. Infrared spectroscopy..... | S4 |
| 1.5. X-ray crystal structure determination | S4 |
| 1.6. Chromatography..... | S4 |
| 2. Synthetic procedures | S5 |
| 2.1. N^{Boc} -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)” | S5 |
| 2.2. N^{H} -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)” | S6 |
| 2.3. $N^{\text{3,5-DCB}}$ -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)” | S7 |
| 3. Enantioselective DHPLC | S9 |
| 3.1. 6,6'-Bis(diphenylphosphinoyl)-2,3,2',3'-tetrahydro-1 <i>H</i> ,1 <i>H</i> '-[5,5']-biindene | S9 |
| 3.2. $N^{\text{3,5-DCB}}$ -Biisoindole „NU-BIPHEP(O)” | S10 |
| 4. X-ray crystal structure determination of N^{Ts} -tetrahydro-biisoindole “Nu-BIPHEP(O)” | S11 |
| 5. NMR Spectra | S12 |
| 5.1. N^{Boc} -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)” | S12 |
| 5.2. N^{H} -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)” | S13 |
| 5.3. $N^{\text{3,5-DCB}}$ -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)” | S15 |
| 6. References | S16 |

1. General remarks

1.1. Synthetic techniques, solvents and chemicals

Syntheses with air sensitive reactants were carried out under an argon atmosphere (Ar 5.0) with exclusion of air. All glassware was heated prior to use and standard Schlenk techniques were applied. THF, toluene, diethyl ether, acetonitrile and DCM were dried with an MBraun solvent purification system (MB SPS-800) and stored under argon over molecular sieves. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, Acros, TCI, abcr or Alfa Aesar and used without further purification. Degassing of solvents was achieved by at least three freeze-pump-thaw cycles.

In order to improve comprehensibility, simplified names were used in some cases rather than using exact IUPAC names. Atom numbering for NMR assignments is not based on IUPAC nomenclature.

1.2. NMR Spectroscopy

NMR spectra were recorded at the NMR Spectroscopy Facility of the Institute of Organic Chemistry (Head: Dr. Jürgen Graf, Heidelberg University) on Bruker Avance 600, 500, 400 and 300 MHz spectrometers. Chemical shifts δ are reported in ppm, coupling constants J in Hz and peak multiplicity is defined by s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). Broad signals are labeled as such (b/br). The solvent residual signals were used for calibration [1]. Assignment of all signals was realized by two-dimensional experiments (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C HSQC-ME and ^1H - ^{13}C HMBC).

1.3. Mass spectrometry

Mass spectra were recorded at the Mass Spectrometry Facility of the Institute of Organic Chemistry (Head: Dr. Jürgen H. Gross, Heidelberg University) on JEOL JMS-700 Magnetic Sector, Bruker ApexQe hybrid 9.4 T FT-ICR, Finnigan MAT TSQ 700 or EOL AccuTOF GCx time-of-flight spectrometers.

1.4. Infrared spectroscopy

Infrared spectra were recorded on a Thermo Scientific Nicolet 6700 ATR-FT-IR spectrometer.

1.5. X-ray crystal structure determination

Crystal-structure analysis was performed at the X-Ray Crystallography Laboratory of the Institute of Organic Chemistry (Head: Dr. Frank Rominger, Heidelberg University) on Bruker Smart CCD or Bruker APEX diffractometers.

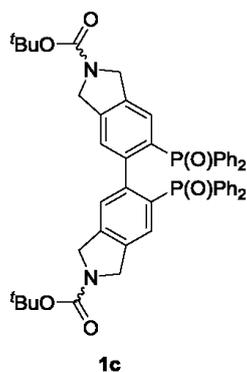
1.6. Chromatography

Thin-layer chromatography was performed with Polygram® Sil G/UV₂₅₄ or Alox N/UV₂₅₄ polyester sheets obtained from Macherey-Nagel. Flash column chromatography was performed using silica (63–200 µm, Sigma-Aldrich) or alumina (neutral, Sigma-Aldrich). HPLC and HPLC-MS measurements were performed on an Agilent Technologies 1200 HPLC equipped with a DAD and a quadrupole mass spectrometer (APCI). All columns with chiral stationary phases were obtained from Chiral Technologies. The HPLC-grade solvents were obtained from Sigma-Aldrich.

2. Synthetic procedures

N-Boc-dipropargylamine [2], 1,4-bis(diphenylphosphinoyl)buta-1,3-diyne [3,4], 6,6'-bis(diphenylphosphinoyl)-2,3,2',3'-tetrahydro-1*H*,1*H'*-[5,5']-biindene [3], 6,6'-bis(diphenylphosphinoyl)-2,2'-bis((4-methyl)benzenesulfonyl)-2,3,2',3'-tetrahydro-1*H*,1*H'*-[5,5']-biisoindole (*N*^[Ts]-tetrahydrobiisoindole “Nu-BIPHEP(O)”) [3] and cellulose tris(5-fluoro-2-methylphenylcarbamate) [5] are known compounds that were prepared according to the procedures in the given references.

2.1. *N*^(Boc)-Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)”



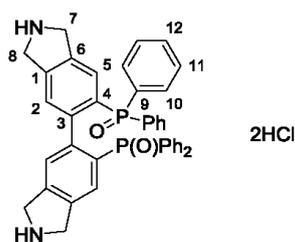
In a first Schlenk flask, AgBF₄ (43.2 mg, 222 μmol, 10 mol %) was suspended in degassed anhydrous DCM (4 mL) in the dark. In a second Schlenk flask, [(Rh(COD)Cl)₂] (54.7 mg, 111 μmol, 5 mol %) was dissolved in degassed anhydrous DCM (4 mL) and BINAP (138 mg, 222 μmol, 10 mol %) was added. In a third Schlenk flask, *N*-boc-dipropargylamine (1.72 g, 8.88 mmol, 4.00 equiv) was dissolved in degassed anhydrous DCM (18 mL). Subsequently, the rhodium complex solution was added to the suspension of AgBF₄ followed by 1,4-bis(diphenylphosphinoyl)buta-1,3-diyne (1.00 g, 2.22 mmol, 1.00 equiv). The carbamate solution was added by a syringe pump at a flow rate of 0.7 mL/h by GC capillary at room temperature. After complete addition, the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (100 mL) and brine (100 mL). The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined extracts were dried over Na₂SO₄ and all volatiles were

S5

removed under reduced pressure. The crude product was purified *via* flash column chromatography (silica, hexanes/acetone (5:1) – EtOAc/acetone (5:1) – hexanes/2-propanol (4:1), $R_F = 0.70$ (hexanes/2-propanol (4:1)).

Beige solid, 1.43 g (77%); The compound exists as mixture of (*E,E*), (*E,Z*) and (*Z,Z*) isomers of the N–C(O) unit. The occurrence of three overlapping signal sets hampers signal assignment in ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 121.64 MHz, 300 K): $\delta = 29.4$ (br); HR-MS (ESI^+): m/z calc. for $[(\text{M}+\text{H})^+]$, $[\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}_2]^+$: 837.3217, found: 837.3235; IR (FT-ATR): ν (cm^{-1}) = 3054, 2973, 2860, 1691, 1590, 1561, 1474, 1437, 1390, 1365, 1299, 1253, 1167, 1101, 998, 903, 875, 750, 694.

2.2. $N^{(H)}$ -Tetrahydrobiisoindole “NU-BIPHEP(O)”



2

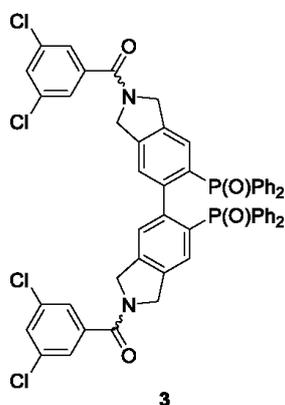
1c (200 mg, 239 μmol , 1.00 equiv) was dissolved in anhydrous 2-propanol (4 mL) and a solution of HCl (5–6 M in anhydrous 2-propanol, 2.39 mL, 12.0 mmol, 50.0 equiv) was added. The resulting reaction mixture was stirred overnight. All volatiles were removed under reduced pressure. The crude product was re-dissolved in a small amount of 2-propanol and precipitated with EtOAc. The solid was separated and dried under reduced pressure.

Beige solid (**2**·2HCl), 157 mg (93%); ^1H NMR (D_2O , 600.25 MHz, 300 K): $\delta = 4.39$ (ABq, $\Delta\delta = 0.19$ ppm, $^2J_{\text{H-H}}[\text{AB}] = 15.4$ Hz, 4H, $\text{H}^{7/8}$), 4.52 (ABq, $\Delta\delta = 0.05$ ppm, $^2J_{\text{H-H}}[\text{AB}] = 15.0$ Hz, 4H, $\text{H}^{7/8}$), 6.80 (d, $^3/4J_{\text{H-P}} = 3.3$ Hz, 2H, $\text{H}^{2/5}$), 7.26 (d, $^3/4J_{\text{H-P}} = 14.0$ Hz, 2H, $\text{H}^{2/5}$), 7.44–7.69 (m, 20H, $\text{H}^{10,11,12}$), NH was not observed; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 150.95 MHz, 300 K): $\delta = 50.4$ (2C, $\text{C}^{7/8}$), 50.5 (2C, $\text{C}^{7/8}$), 126.6 (d, $^{2/3}J_{\text{C-P}} = 10.5$ Hz, 2C, $\text{C}^{2/5}$), 128.3 (d, $^{2/3}J_{\text{C-P}} = 13.6$ Hz, 2C, $\text{C}^{2/5}$),

S6

128.6 (d, $^{2/3}J_{C-P} = 12.5$ Hz, 4C, C^{10/11}), 128.9 (d, $^{2/3}J_{C-P} = 12.4$ Hz, 4C, C^{10/11}), 130.3 (d, $^1J_{C-P} = 103.6$ Hz, 2C, C^{9a}), 130.6 (d, $^1J_{C-P} = 104.4$ Hz, 2C, C⁴), 131.0 (d, $^1J_{C-P} = 102.2$ Hz, 2C, C^{9b}), 131.7 (d, $^{2/3}J_{C-P} = 10.1$ Hz, 4C, C^{10/11}), 132.0 (d, $^{2/3}J_{C-P} = 10.3$ Hz, 4C, C^{10/11}), 132.6 (d, $^4J_{C-P} = 1.4$ Hz, 2C, C^{12a}), 132.8 (d, $^4J_{C-P} = 2.1$ Hz, 2C, C^{12b}), 134.2 (d, $^3J_{C-P} = 14.5$ Hz, 2C, C⁶), 137.8 (d, $^4J_{C-P} = 2.0$ Hz, 2C, C¹), 143.5 (dd, $^{2/3}J_{C-P} = 8.3$ Hz, $^{2/3}J_{C-P} = 3.5$ Hz, 2C, C³); $^{31}P\{^1H\}$ NMR (D₂O, 243.00 MHz, 300 K): $\delta = 34.7$; HR-MS (ESI⁺): m/z calc. for $([M+H]^+, [C_{40}H_{35}N_2O_2P_2]^+)$: 637.2168, found: 637.2180; IR (FT-ATR, **2**): ν (cm⁻¹) = 3287, 3053, 2848, 1731, 1590, 1466, 1436, 1369, 1242, 1179, 1100, 1071, 1044, 997, 877, 803, 750, 721, 693.

2.3. *N*{^{3,5}-DCB}-Tetrahydrobiisindole "NU-BIPHEP(O)"



2ⁱ (50.0 mg, 78.5 μ mol, 1.00 equiv) was dissolved in degassed anhydrous DCM (2 mL). Anhydrous pyridine (37.3 mg, 471 μ mol, 6.00 equiv) and 3,5-dichlorobenzoyl chloride (41.1 mg, 196 μ mol, 2.50 equiv) were added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was treated with NH₄Cl solution (saturated aqueous, 20 mL) and DCM (20 mL). The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (3 \times 20 mL). The combined organic extracts were washed with NaOH solution (1 M aqueous, 10 mL) and dried over Na₂SO₄. All volatiles were removed under reduced pressure. The crude product was purified *via* flash column chromatography (silica, EtOAc/acetone (5:1), $R_f = 0.27$ – 0.58 (mixture of *E/Z* isomers, EtOAc/acetone (5:1))

ⁱ The hydrogen chloride salt **2·2HCl** is also suitable if additional equivalents of base (e.g. triethylamine) are added.

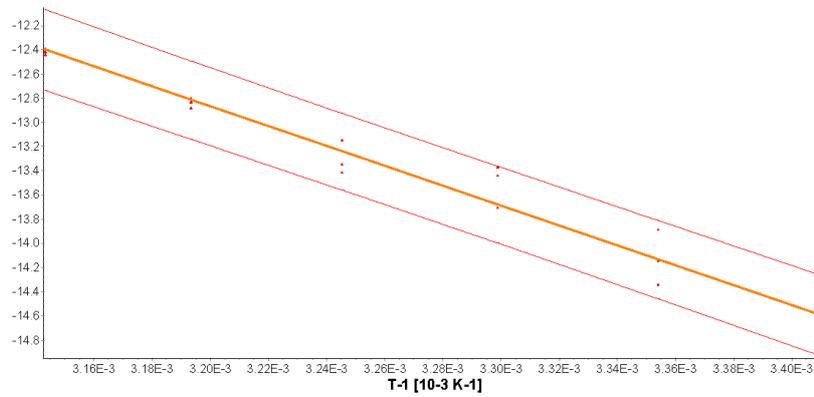
Reddish solid, 38.0 mg (49%); The compound exists as mixture of (*E,E*), (*E,Z*) and (*Z,Z*) isomers of the tertiary amide unit. The occurrence of three overlapping signal sets hampers signal assignment in ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 243.00 MHz, 300 K): $\delta = 28.25, 28.30, 28.33, 28.39$; HR-MS (ESI^+): m/z calc. for $([\text{M}+\text{H}]^+, [\text{C}_{54}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}_2^{35}\text{Cl}_4]^+)$: 981.1134, found: 981.1163; IR (FT-ATR): ν (cm^{-1}) = 3056, 2962, 1682, 1634, 1563, 1437, 1395, 1294, 1259, 1181, 1097, 1015, 865, 798, 748, 722, 694.

3. Enantioselective DHPLC

3.1. 6,6'-Bis(diphenylphosphinoyl)-2,3,2',3'-tetrahydro-1*H*,1*H*'-[5,5]- biindene

DHPLC measurements were performed with an CHIRALPAK® IE-3 (150 mm, i.d. 4.6 mm, particle size 3 μm) column (hexane/methanol/2-propanol, 70:15:15, 210 nm, 1.0 mL/min) at temperatures between 20.0 and 45.0 °C.

| T [°C] | t_1 [min] | t_2 [min] | h_p [%] | N 1 | N 2 | α | k_1 [1/s] |
|----------|-------------|-------------|-----------|-------|------|----------|-------------|
| 20.0 | 14.187 | 26.627 | 0.71 | 8678 | 5161 | 1.94 | 1.20E-04 |
| 20.0 | 14.179 | 26.632 | 0.71 | 8668 | 5331 | 1.94 | 1.20E-04 |
| 20.0 | 14.155 | 26.582 | 0.69 | 7985 | 5310 | 1.94 | 1.28E-04 |
| 25.0 | 13.345 | 24.265 | 0.95 | 8252 | 5790 | 1.88 | 1.76E-04 |
| 25.0 | 13.359 | 24.305 | 1.18 | 8271 | 5809 | 1.89 | 2.16E-04 |
| 25.0 | 13.354 | 24.3 | 1.54 | 8265 | 5598 | 1.89 | 2.78E-04 |
| 30.0 | 12.612 | 22.239 | 2.19 | 8689 | 6107 | 1.83 | 4.42E-04 |
| 30.0 | 12.607 | 22.24 | 2.36 | 8682 | 6107 | 1.83 | 4.75E-04 |
| 30.0 | 12.599 | 22.232 | 1.79 | 9515 | 6103 | 1.83 | 3.38E-04 |
| 35.0 | 11.927 | 20.387 | 2.65 | 9310 | 6340 | 1.77 | 4.61E-04 |
| 35.0 | 11.9 | 20.314 | 2.86 | 9264 | 6293 | 1.77 | 4.92E-04 |
| 35.0 | 11.9 | 20.314 | 3.56 | 9264 | 6293 | 1.77 | 6.03E-04 |
| 40.0 | 11.272 | 18.652 | 5.22 | 10158 | 6390 | 1.72 | 8.38E-04 |
| 40.0 | 11.279 | 18.659 | 5.18 | 9129 | 6079 | 1.72 | 7.95E-04 |
| 40.0 | 11.287 | 18.66 | 5.42 | 10187 | 6080 | 1.72 | 8.62E-04 |
| 45.0 | 10.737 | 17.197 | 9.58 | 9127 | 5667 | 1.66 | 1.29E-03 |
| 45.0 | 10.747 | 17.214 | 9.13 | 10253 | 5679 | 1.66 | 1.26E-03 |
| 45.0 | 10.745 | 17.219 | 10.46 | 9142 | 5682 | 1.66 | 1.32E-03 |



3.2. *N*(3,5-DCB)-Biisoindole „NU-BIPHEP(O)“

DHPLC measurements were performed with an Chiralpak IA-3 (150 mm, i.d. 4.6 mm, particle size 3 μ m) column (hexane/2-propanol, 50:50, 210 nm, 1.0 mL/min) at temperatures between 50.0 and 80.0 °C.

| T [°C] | t ₁ [min] | t ₂ [min] | h _p [%] | N 1 | N 2 | α | k ₁ [1/s] |
|--------|----------------------|----------------------|--------------------|------|------|----------|----------------------|
| 50.0 | 4.250 | 8.877 | 0.57 | 1464 | 1777 | 2.42 | 2.54E-04 |
| 50.0 | 4.252 | 8.859 | 0.56 | 1466 | 1769 | 2.42 | 2.49E-04 |
| 50.0 | 4.245 | 8.859 | 0.51 | 1460 | 1769 | 2.42 | 2.29E-04 |
| 55.0 | 4.019 | 8.165 | 0.94 | 1682 | 2042 | 2.37 | 4.45E-04 |
| 55.0 | 4.012 | 8.145 | 0.90 | 1674 | 2031 | 2.37 | 4.27E-04 |
| 55.0 | 4.014 | 8.147 | 0.86 | 1677 | 2032 | 2.37 | 4.09E-04 |
| 60.0 | 3.839 | 7.565 | 1.54 | 1746 | 2334 | 2.31 | 7.16E-04 |
| 60.0 | 3.825 | 7.545 | 1.50 | 1729 | 2320 | 2.32 | 6.99E-04 |
| 60.0 | 3.825 | 7.532 | 1.55 | 1729 | 2129 | 2.31 | 7.17E-04 |
| 65.0 | 3.614 | 6.928 | 2.85 | 1761 | 2485 | 2.27 | 1.28E-03 |
| 65.0 | 3.599 | 6.886 | 3.00 | 2107 | 2233 | 2.26 | 1.45E-03 |
| 65.0 | 3.604 | 6.891 | 3.20 | 1748 | 2455 | 2.26 | 1.40E-03 |
| 70.0 | 3.471 | 6.458 | 5.26 | 1904 | 2574 | 2.21 | 2.20E-03 |
| 70.0 | 3.444 | 6.458 | 5.14 | 2300 | 2574 | 2.23 | 2.39E-03 |
| 70.0 | 3.463 | 6.449 | 5.14 | 1892 | 2858 | 2.21 | 2.17E-03 |
| 75.0 | 3.324 | 6.071 | 8.95 | 2080 | 2775 | 2.18 | 3.52E-03 |
| 75.0 | 3.318 | 6.058 | 9.20 | 2069 | 2761 | 2.18 | 3.56E-03 |
| 75.0 | 3.318 | 6.044 | 9.26 | 2069 | 2746 | 2.18 | 3.57E-03 |
| 80.0 | 3.211 | 5.704 | 16.79 | 1882 | 2696 | 2.13 | 5.23E-03 |
| 80.0 | 3.193 | 5.679 | 16.89 | 1852 | 2667 | 2.13 | 5.28E-03 |
| 80.0 | 3.191 | 5.671 | 16.87 | 1849 | 2658 | 2.13 | 5.24E-03 |

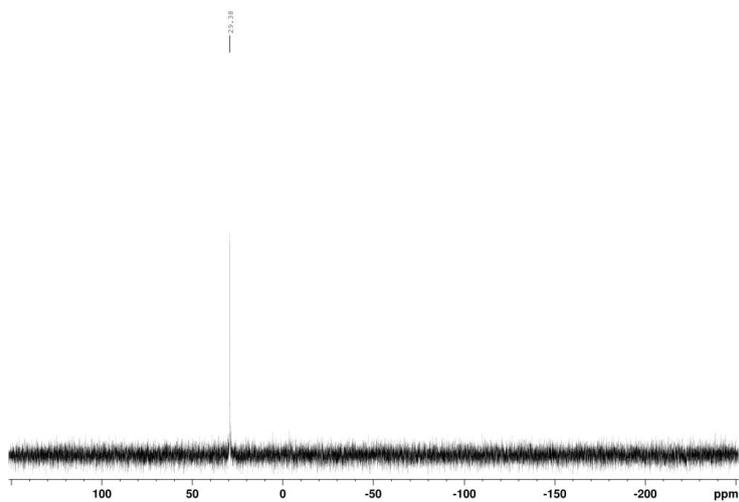
4. X-ray crystal structure determination of *N*^(Ts)-tetrahydro-biisindole “Nu-BIPHEP(O)”

Colourless crystal (plate), dimensions 0.240 × 0.180 × 0.070 mm³, crystal system orthorhombic, space group Aba2, *Z* = 8, *a* = 15.9120(7) Å, *b* = 28.7697(12) Å, *c* = 22.5183(9) Å, alpha = 90 deg, beta = 90 deg, gamma = 90 deg, *V* = 10308.5(7) Å³, rho = 1.280 g/cm³, *T* = 200(2) K, Theta_{max} = 23.531 deg, radiation Mo Kalpha, lambda = 0.71073 Å, 0.5 deg omega-scans with CCD area detector, covering the asymmetric unit in reciprocal space with a mean redundancy of 6.86 and a completeness of 99.9% to a resolution of 0.89 Å, 27838 reflections measured, 7633 unique (*R*(int) = 0.0664), 6120 observed (*I* > 2σ(*I*)), intensities were corrected for Lorentz and polarization effects, an empirical scaling and absorption correction was applied using SADABS [6] based on the Laue symmetry of the reciprocal space, mu = 0.22 mm⁻¹, *T*_{min} = 0.86, *T*_{ma} = 0.94, structure refined against *F*² with a Full-matrix least-squares algorithm using the SHELXL-2014/7 (Sheldrick, 2014) software [7], 679 parameters refined, hydrogen atoms were treated using appropriate riding models, except some hydrogens at the disordered solvent methanol, which were not considered at all, Flack absolute structure parameter 0.00(5), goodness of fit 1.02 for observed reflections, final residual values *R*1(*F*) = 0.058, *wR*(*F*²) = 0.133 for observed reflections, residual electron density -0.34 to 0.64 eÅ⁻³. CCDC 1473145 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

5. NMR Spectra

5.1. *N*-(Boc)-Tetrahydrobiisindole "NU-BIPHEP(O)"

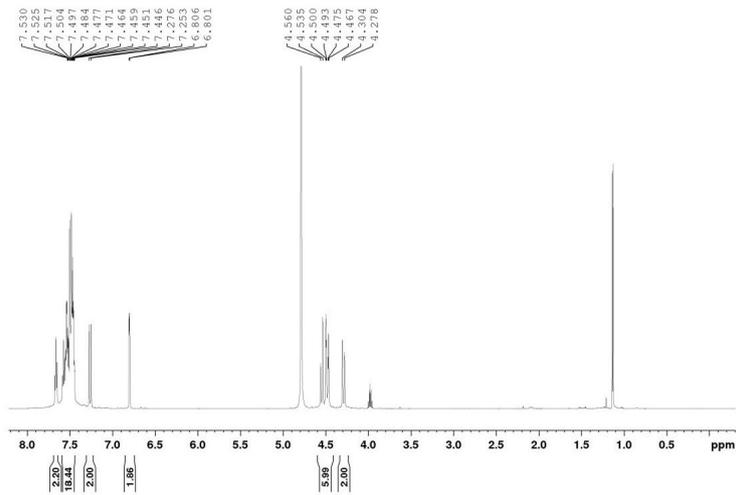
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR



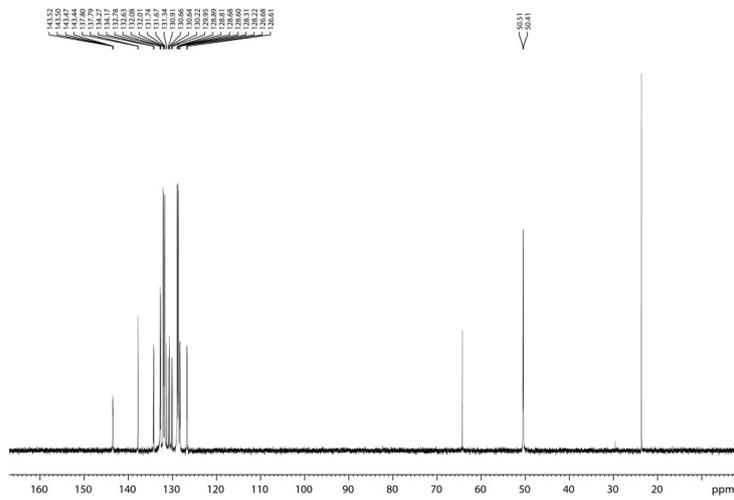
S12

5.2. $N^{(H)}$ -Tetrahydrobiisoindole "NU-BIPHEP(O)"

The spectra contain residual 2-propanol that was not separable even when reduced pressure was applied for prolonged time. ^1H NMR:

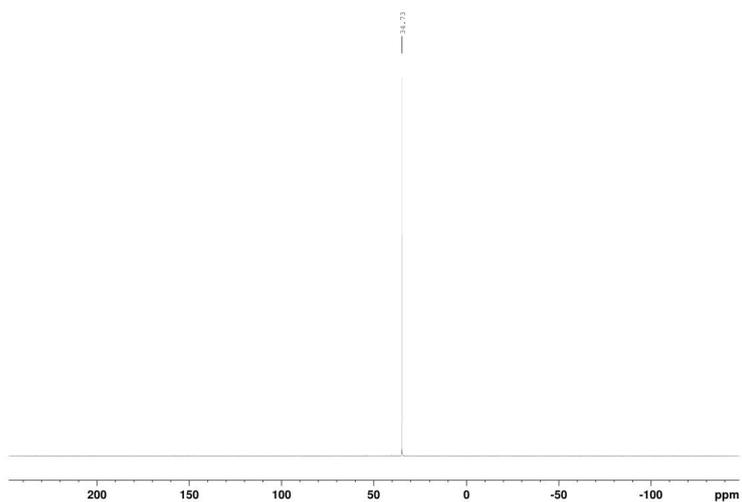


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR



S13

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR



S14

6. References

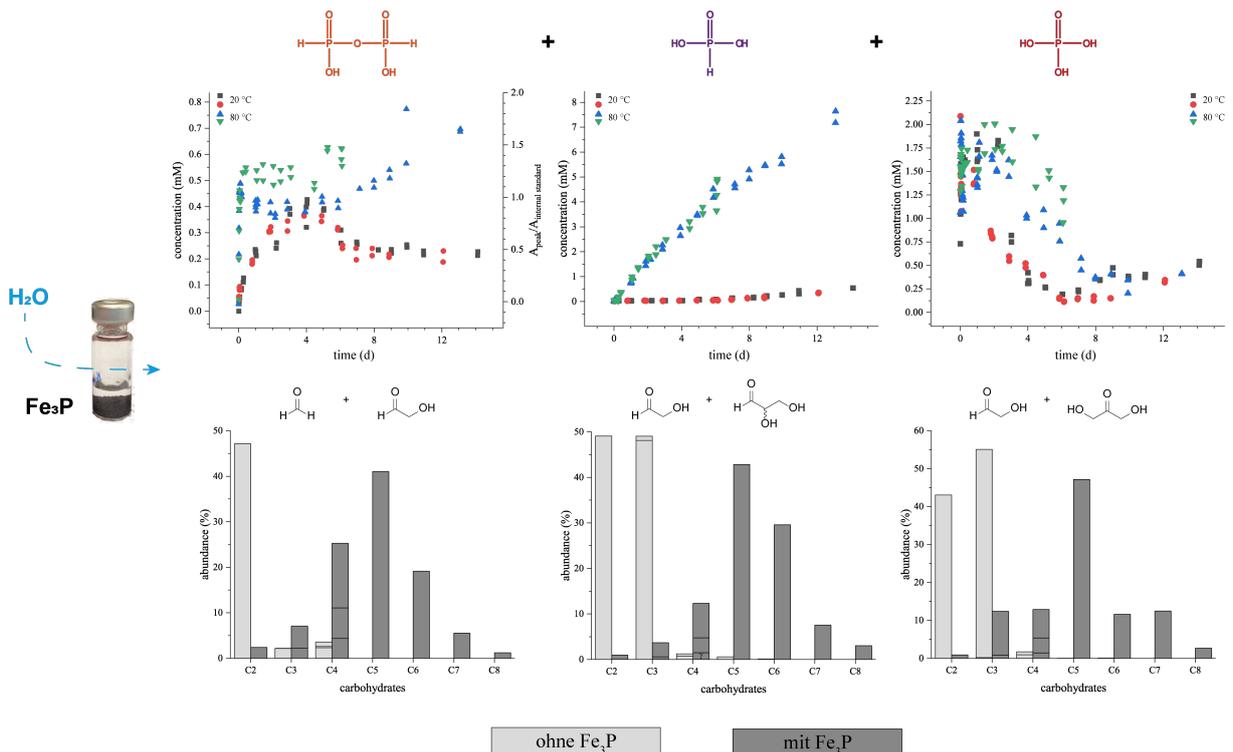
- (1) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176.
- (2) Krasia, T. C.; Steinke, J. H. G. *Chem. Commun.* **2002**, *0*, 22.
- (3) Doherty, S.; Knight, J. G.; Smyth, C. H.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4925.
- (4) Xu, D.; Hong, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1826.
- (5) Yashima, E.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4036.
- (6) Sheldrick, G. M.; SADABS 2012/1 ed.; Bruker Analytical X-ray-Division: Madison, Wisconsin, 2012.
- (7) Sheldrick, G. *Acta Cryst. C* **2015**, *71*, 3.

5.2. Schreibersit: ein effektiver Katalysator im Formose Netzwerk

Sebastian Pallmann, Jana Šteflová (neé Svobodová), Maren Haas, Saskia Lamour, Ann-Kathrin Henß und Oliver Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003.⁵⁶

Kurzzusammenfassung

Thematischer Schwerpunkt der vorliegenden Publikation liegt in der Reevaluierung des meteoritischen Materials Schreibersit, Fe_3P , hinsichtlich des erzielbaren Produktgemisches an Phosphoroxo-Anionen während der wässrigen Korrosion des Materials, seiner Phosphorylierungsfähigkeit gegenüber kleinen organischen Molekülen und Reaktivität in Anwesenheit von Formaldehyd und kleinen Zuckern. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine kapillarelektrophoretische Trennmethode entwickelt, mit deren Hilfe die Korrosion des Schreibersits zeitaufgelöst verfolgt und die Produktzusammensetzung unverfälscht identifiziert werden konnte.



Aufgrund der pH-Sensitivität der unterschiedlichen Phosphoroxo-Anionen wurden dafür pH-neutrale Bedingungen entgegen den bisher publizierten Analysemethoden (NMR unter basischen Bedingungen) gewählt. Außerdem entbehrte die Methode notwendige Aufarbeitungsschritte. In der Korrosionsmischung konnte so im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen die Entwicklung von Phosphit, Diphosphit und Phosphat für verschiedene Temperaturen aufgezeichnet werden. Diese Experimente wurden unter Anwesenheit kleiner organischer und zum Teil biologisch relevanter Moleküle wie Ethanolamin und Cholin wiederholt. Es

Veröffentlichte Arbeiten

konnte aber keine spezifische Fähigkeit des Materials zur Phosphorylierung nachgewiesen werden. Allerdings wurde in Anwesenheit von Formaldehyd und kleinen Zuckern der Ablauf der Formose-Reaktion beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Korrosion von Schreibersit ein basisches Milieu mit Fe(II)-Ionen erzeugt, welche den Ablauf der Formose-Reaktion mit der vornehmlichen Bildung von C5-Zuckern katalysiert. Durch diese Ergebnisse konnte ein Bezug zwischen der Bildung von Zuckern und Phosphaten hergestellt werden. Schreibersit gilt als eine präbiotische Quelle für Phosphate; die Formose-Reaktion als eine mögliche Reaktion hin zu komplexen Reaktionsnetzwerken von Kohlenhydraten. Diese Publikation impliziert daher einen gemeinsamen Ursprung für Phosphor und Zucker.

Autorenbeitrag

Das Forschungsprojekt wurde gemeinschaftlich von OT und SP entwickelt. SP hat alle Korrosionsexperimente durchgeführt, analysiert und ausgewertet. JS hat die CE- und MH sowie SL haben die GC-Trennmethode entwickelt. SP und JS haben gemeinschaftlich die Korrosionskinetik in Wasser und die Reaktionsstudien mit organischen Molekülen durchgeführt. AH hat die XPS-Messungen des Fe₃P-Materials vorgenommen und ausgewertet. SP hat die Publikation geschrieben.

Lizenz

Gemäß der *Creative Commons Attribution License 3.0*, unter welcher der genannte Artikel im *New Journal of Physics* veröffentlicht wurde, ist es erlaubt, den originalen Beitrag in jedwedem Format oder Medium zu vervielfältigen und zu verbreiten, sofern angemessene Urheber- und Rechteangaben gemacht werden, der Link zur Lizenz zur Verfügung gestellt wird, Änderungen angezeigt sind und nicht der Eindruck erweckt wird, dass der Lizenzgeber die Nutzung und die Person unterstütze.

<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.de>

PAPER • OPEN ACCESS

Schreibersite: an effective catalyst in the formose reaction network

To cite this article: S Pallmann *et al* 2018 *New J. Phys.* **20** 055003

View the [article online](#) for updates and enhancements.

Related content

- [THE EVOLUTION OF BIOCATALYSTS](#)
L A Nikolaev
- [The Synthesis of Carbohydrates from Formaldehyde](#)
T I Khomenko, M M Sakharov and O A Golovina
- [Astrophysical and astrochemical insights into the origin of life](#)
P Ehrenfreund, W Irvine, L Becker et al.



IOP | ebooks™

Bringing you innovative digital publishing with leading voices to create your essential collection of books in STEM research.

Start exploring the collection - download the first chapter of every title for free.

This content was downloaded from IP address 129.187.254.47 on 12/08/2018 at 20:19



PAPER

Schreibersite: an effective catalyst in the formose reaction network

OPEN ACCESS

RECEIVED
2 January 2018REVISED
26 March 2018ACCEPTED FOR PUBLICATION
4 April 2018PUBLISHED
9 May 2018S Pallmann¹, J Šteflová (neé Svobodová)¹, M Haas¹, S Lamour^{1,2}, A Henß¹ and O Trapp^{1,2}¹ Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandstr. 5–13, D-81377 München, Germany² Max-Planck-Institut für Astronomie, Königstuhl 17, D-69117 Heidelberg, GermanyE-mail: oliver.trapp@cup.uni-muenchen.de

Keywords: schreibersite, phosphorus oxyanions, formose reaction, meteorite, carbohydrate, sugar, origin of life

Supplementary material for this article is available [online](#)Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 licence](#).

Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.



Abstract

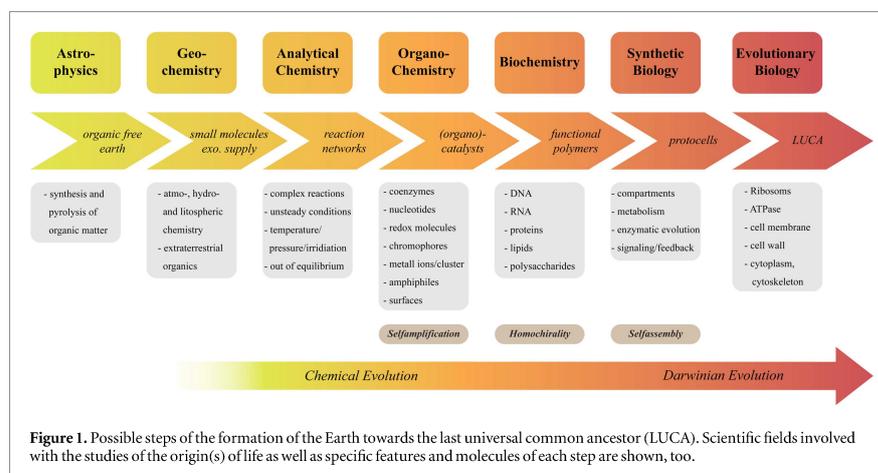
We report on the ability of the meteoritic material schreibersite to catalyze the generation of higher sugars from simple carbohydrates in the formose reaction network. Since the analysis of carbonaceous meteorites like the Murchison meteorite it has become generally accepted that a substantial amount of organic material has been delivered to the early earth and, therefore, ought to be considered in scenarios for the origin(s) of life. Also for the open question of accessible phosphorus sources, an extraterrestrial material called schreibersite has been identified that is capable of releasing soluble and reactive phosphorus oxyanions that would react with organics to form for instance nucleotides and membrane associated molecules. We have reinvestigated this material using capillary electrophoresis to monitor its corrosion process in water and probed its ability to phosphorylate a wide range of organics. Although showing a poor reactivity of schreibersite, we have found that the material catalyzes the aldol reaction of small carbohydrates forming larger sugar molecules. This reaction in the formose reaction network is a prebiotically likely route to biologically relevant sugars. The results of our study present one of the first instances of connecting extraterrestrial material to prebiotic chemistry on the early earth.

1. Introduction

1.1. Chemical networks and chemical evolution

Ever since the pioneering work of Oparin [1], Haldane [2] and Miller [3], the scientific field of the origin(s) of life has amplified in its spectrum of theories, experiments and results starting from the ‘warm little pond’ idea of Charles Darwin [4] to discoveries of extra-solar (super-)earth planets [5, 6] and specific abiotic pathways to relevant building blocks of life [7–18]. Even though the field is now evolving for almost a century, there still is uncertainty about fundamentals like the definition of *life* and the applicability of the phrase *plausible prebiotic condition* [19–24]. That is because scenarios for the origin(s) of life are conceivable for a wide range of different parameters, e.g. temperature, pressure, irradiation flux and availability as well as concentration of feedstock molecules. Possible scenarios for the origin(s) of life include various settings such as hydrothermal vents [25], volcanic locations [26, 27], primordial soup [28, 29] and drying lagoons [30–32]. The difficulty with the characterization of *life*, on the other hand, lies with the many open questions of its evolution. If one could precisely retrace the steps of the emergence of life on earth, it would become apparent where to draw the line between inanimate and alive. A popular periphrasis, though, was given in 1994 by NASA and says that life is ‘a self-sustaining chemical system capable of Darwinian evolution’ [23].

A possible sequence of events leading to systems covered by that definition and giving way to the last universal common ancestor (LUCA) is depicted in figure 1. After the formation of the Earth 4.5 billion years ago in which all organic matter was pyrolyzed, small molecules were not only formed through atmo-, hydro- and/or lithospheric chemistry but also delivered by extraterrestrial bombardment. Those small molecules are prone to construct complex reaction networks under changing conditions of versatile energy flux (out-of-equilibrium chemistry) and give rise to more complex molecules of certain features (redox-, photo- and catalytic activity,



amphiphilic properties for bilayer assembly). Those reaction networks likely succumb to evolutionary principles such as isolation, competence and adaption although their survival is not measured in reproduction or based on heredity but in self-sustainment and complexity. That phase, thus, can be termed chemical evolution. In such a first self-sustaining system, the emergence of functional polymers becomes probable and levels the transition to Darwinian evolution. Once first protocells are formed Darwinian evolution manifests and allows the generation of LUCA.

Along that way, however, there is a multitude of open questions that require several scientific disciplines to answer them. The authors' focus lies with the reaction pathways in context with the formation of small molecules and their reactivity towards complex reaction networks.

The present contribution deals with the meteoritic material schreibersite Fe_3P as a source for reactive phosphorus oxyanions and its behavior during aqueous corrosion in the presence of organic molecules. It, therefore, focuses on the possible emergence and reactivity of small molecules and their transition into complex reaction networks. Specifically, the ability of the mentioned material to catalyze the formation of carbohydrates from small precursors, aldol/retro-aldol reactions in the formose reaction network, is studied. This way, a connection between extraterrestrial and terrestrial material is drawn and the impact of meteoritic bombardment not only for delivery but also for inducing reactions is highlighted.

1.2. Schreibersite as a possible phosphorylation agent

Phosphorus is one of the key elements of life and amounts up to 1% of the weight of dry cells [33]. It is part of the backbone of DNA/RNA, essential component of the phospholipids in cell membranes, energy storage in form of adenosine triphosphate, constituent of coenzyme such as flavine adenine dinucleotide, nicotinamide adenine dinucleotide and coenzyme A as well as crucial derivatization group in metabolic pathways. Its significance in biological life is contrasted by its natural availability. There is no volatile phase or versatile redox chemistry of phosphorus under terrestrial conditions. The stable and predominantly occurring form is orthophosphate (PO_4^{3-}) which exhibits poor solubility in presence of divalent cations in aqueous medium [34]. Phosphorus, therefore, is a limiting ingredient for the origin(s) of life. It is assumed that 95% of the Earth's stock of phosphorus was concentrated in the core of the Earth leaving the continental crust with about 650 ppm phosphorus [35]. An inventory of the possible phosphorus sources in the hadean eon is given in table 1 as posed by Hazen [36] and expanded by Pasek [37].

The majority of the minerals listed in table 1 exhibit only a low solubility in water and, hence, do not have the ability to make phosphorus accessible in aqueous media on the early earth. The low abundance of free phosphorus is accompanied with its generally low reactivity towards organic molecules in its most stable form, orthophosphate. It is still highly discussed by what chemical pathway phosphorus could have been incorporated into organic molecules [37, 38]. Besides reactions in non-aqueous media such as formamide [39–44] and eutectic media [45] as well as by use of condensing agents (urea [46–49] and cyanamide [50–52]) or activated phosphates (pyro-, tri-, poly-, cyclic- or diamidophosphate) [16, 27, 53–55], one scenario is based on the meteoritic material schreibersite ($\text{Fe,Ni,Cr}_3\text{P}$) [56]. Statistics assume that around 0.1%–10% of the Earth's phosphorus inventory was delivered by meteoritic bombardment [57]. This material which contributes about

Table 1. Mineral diversity in the hadean eon on the basis of Hazen [36] and Pasek [37]. Additions by the latter one are given in italics.

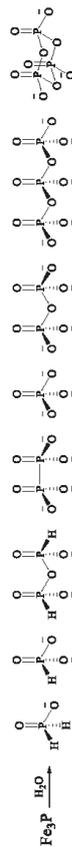
| Name | Formula | Classification |
|--------------------|--|----------------|
| Nickelphosphide | Ni ₃ P | Phosphide |
| Perryite | (Ni,Fe) ₈ (Si,P) ₃ | |
| Schreibersite | (Fe,Ni,Cr) ₃ P | |
| Beusite | Mn(II)Fe(II)(PO ₄) ₂ | Phosphate |
| <i>Bobbierite</i> | Mg ₅ (PO ₄) ₂ · 8H ₂ O | |
| Childrenite | Fe(II)AlPO ₄ (OH) ₂ · H ₂ O | |
| Chlorapatite | Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl | |
| Farringtonite | Mg ₅ (PO ₄) ₂ | |
| Fluorapatite | Ca ₅ (PO ₄) ₃ F | |
| Galileite | NaFe(II)(PO ₄) ₃ | |
| Graftonite | (Fe(II),Mn(II),Ca) ₅ (PO ₄) ₃ | |
| Hydroxylapatite | Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH | |
| Johnsomervilleite | Na ₁₀ Ca ₆ Mg ₁₈ Fe(II)(PO ₄) ₃₆ | |
| <i>Lüneburgite</i> | Mg ₅ B ₂ (PO ₄) ₂ (OH) ₆ · 8H ₂ O | |
| Merrillite | Ca ₂ NaMg(PO ₄) ₇ | |
| Monazite-Ce | CePO ₄ | |
| <i>Newberyite</i> | MgHPO ₄ · 3H ₂ O | |
| Sarcopsidite | Fe(II) ₃ (PO ₄) ₂ | |
| Stanfieldite | Ca ₄ Mg ₅ (PO ₄) ₆ | |
| <i>Struvite</i> | NH ₄ MgPO ₄ · 6H ₂ O | |
| Triplite | (Mn(II),Fe(II)) ₂ PO ₄ (F,OH) | |
| <i>Vivanite</i> | Fe(II) ₃ (PO ₄) ₂ | |
| Wagnerite | Mg ₅ PO ₄ F | |
| Wavellite | Al ₃ (PO ₄) ₂ (OH) ₃ · 5H ₂ O | |
| Whitlockite | Ca ₉ Mg(PO ₄) ₆ (PO ₃ OH) | |
| <i>Xenotime</i> | (Y,Yb)(PO ₄) | |

0.2–0.4 wt% of iron-rich meteorites [58] contains phosphorus in a reduced oxidation state allowing it to be corroded by water and to release reactive phosphorus oxyanions through a radical mechanism [59]. This material has already been examined in literature regarding the composition of the released phosphorus oxyanions (see table 2) and its ability to phosphorylate organic molecules. It was found that schreibersite is capable of phosphorylating glycerol and nucleosides in yields of 2.5% and 5.7%, respectively [60, 61]. The corrosion rate of schreibersite in saline solution is about 0.2% per week and 10% per year [57].

1.3. Formose reaction

Carbohydrates are essential components of life. They are part of nucleotides in form of deoxyribose or ribose and are, therefore, crucial for DNA, RNA and cofactors. They are also vital constituents in metabolic pathways in all organisms, e.g. glycolysis. A plausibly prebiotic formation of carbohydrates of different length and composition was first discovered by Butlerov in 1861 [10] and interpreted on a molecular level by Breslow in 1959 [64] and is termed the formose reaction. The formose reaction is the oligomerization of formaldehyde in aqueous solution in the presence of a basic catalyst. It results in a complex mixture of straight-chain and branched monosaccharides, polyols and polyhydroxycarbonic acids. The specific outcome and product distribution depends on the concentration of involved feedstock molecules, temperature and reaction time. Its mechanism is not yet fully understood [65–68]. The formose reaction comprises a multitude of reaction paths in which carbohydrates not only self- and cross-add to one another in an aldol reaction type, but also split in retro-aldol reactions, disproportionate or oxidize, especially when performed under oxygen [69–72]. An oversimplified reaction network along with a list of unbranched sugars of up until 6 carbon atoms that all are products of the formose reaction network is given in figure 2. If started from formaldehyde, formally the simplest carbohydrate, the formose reaction can only be catalyzed either in the presence of a co-catalyst capable of enediolization, e.g. higher sugars such as glycolaldehyde and glyceraldehyde (a minimum of 3 ppm [66]), thiazolium salts activating formaldehyde for electrophilic attack [73] or UV-irradiation [74, 75]. As for the basic catalyst, a wide range of compounds are suitable such as Al(OH)₃, NaOH, borates, FeO and typically Ca(OH)₂ and have already been studied in literature [72]. Most of the inorganic and organic substances known to be efficient catalysts for the formose reaction network, however, are not considered to be present in the hadean eon for the origin of life [36]. A disadvantage of the formose reaction, also, lies with its poor selectivity. Biologically significant carbohydrates such as ribose are only formed in low yield. Besides, the longer the formose reaction

Table 2. Overview of phosphorus oxyanions: products of schreibersite corrosion and determined concentrations in various experiments in literature.



| Name | Hypo-phosphate [H ₂ O ₂ P] ⁻ | Phosphite [HO ₂ P] ⁻ | Diphosphite [H ₂ O ₂ P ₂] ²⁻ | Hypo-phosphate [O ₂ P ₂] ⁴⁻ | Phosphate [O ₄ P] ³⁻ | Pyro-phosphate [O ₇ P ₂] ⁴⁻ | Triphosphate [O ₁₀ P ₃] ⁵⁻ | Trimeta-phosphate [O ₁₃ P ₃] ⁵⁻ |
|----------------------|--|---|--|--|---|--|---|--|
| Oxidation state of P | +I | +III | +III | +IV | +V | +V | +V | +V |
| Charge/P | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| A (μM) | — | 700 | — | 280 | 1100 | 150 | — | — |
| B (μM) | — | 100 | — | 18 | 130 | 23 | — | — |
| C (%) | 0 | 59 | — | 2 | 31 | 1 | — | — |
| D (%) | 61 | 26 | — | — | 5 | — | — | — |
| E (%) | 87 | 11 | — | — | — | — | — | — |
| F (μM) | — | 1100 | — | 360 | 430 | 450 | — | — |
| G | Yes | Yes | No | No | Yes | No | No | No |

A: 1 g Fe₃P, 25 ml DI water, air, 1 d; 293 K; quantification by NMR after addition of NaOH [56].

B: 1 g Fe₃P, 25 ml DI water, argon, 1 d; 293 K; quantification by NMR after addition of NaOH [56].

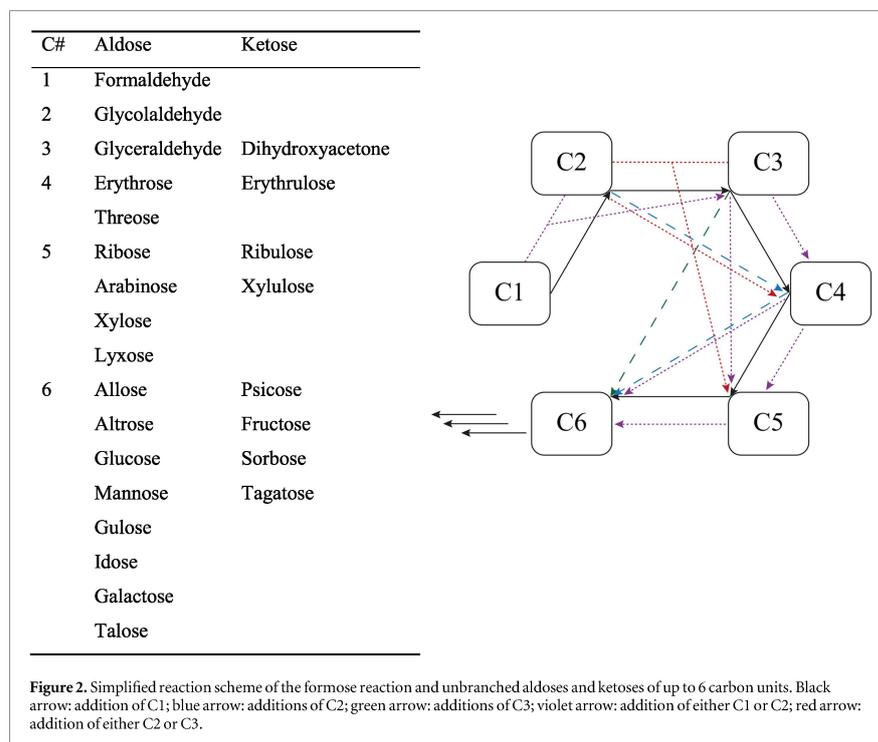
C: 0.5 g Fe₃P, 25 ml 0.1 M H₂SO₄; 7 d, 298 K; quantification by NMR after addition of Na₂S [62].

D: 0.5 g Fe₃P, 10 ml H₂O; UV; 3 h, 77 K; quantification by NMR after addition of Na₂S [62].

E: 19.1 g meteorite, 20 ml EtOH; H₂O 1:1 v/v; UV, 15 h, 77 K; quantification by NMR after addition of Na₂S [62].

F: 1 g, 25 ml DI water, air, 1 d; 293 K; quantification by NMR after addition of NaOH [59].

G: 0.5 g Fe₃P, N₂, 1 week; 293 K and 343 K; evaluation by IC-ESI-MS [65].



proceeds the more carbohydrates are turned into a water insoluble tar discernable from an intensifying yellow–brown color of the solution [70]. It was shown, however, that the presence of borate [69, 76] or phosphorylated carbohydrates [77, 78] overcome that selectivity issue.

2. Chemicals and methods

2.1. Chemicals

All chemicals have been used as received except for aqueous sugar standards that were lyophilized to obtain the compounds as solids. Synthetic schreibersite material was purchased from Alfa Aesar (99.5% metal basis) and Sigma-Aldrich (99.5% trace metals basis). Formaldehyde (37% wt in H₂O), cyanamide (99%), dicyandiamide (99%), sodium sulfide nonahydrate (99%), thiourea (99%), stearic acid (98.5%), ethanolamine (99%), choline (98%), *O*-ethylhydroxylamine hydrochloride (99%), *N*-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) (99%), *N*, *O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) (99%), pyridine (99%), glycolaldehyde dimer (mixture of stereoisomers), *D*-threose (60%), *D*-erythrose (75%), *L*-erythrulose (80%), dihydroxyacetone dimer (97%), *D*-allose (98%), *L*-arabinose (99%), *D*-mannose (99%), *D*-fructose (99%), *D*-galactose (99%), *D*-ribose (98%), salicylic acid (99%) BIS-TRIS (98%) and sodium hexafluorophosphate (99%) were supplied by Sigma-Aldrich. Methanol (HPLC grade) and acetonitril (HPLC grade) was bought from Fisher Chemicals and VRW Chemicals, respectively. Urea (99%) and *D*-xylose (99%) were obtained from Merck. Sugar standards were largely purchased from Carbosynth Limited. Those sugars include: *D*-xylulose (98%), *D*-psicose (98%), *D*-idose (99%), *L*-ribulose (97%), *D*-altrose (99%), *D*-lyxose (99%), *L*-gulose (98%), *D*-tallose (99%), *D*-tagatose (99%), *L*-sorbose (98%), beta-*D*-galactoheptose (99%). *D*-glucose-1-hydrate (99%) was supplied by PanReac AppliChem ITW Reagents. Meso-inositol (99%) was bought from Roth. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and ammonia (2M) were obtained from the chemical shop of the department of chemistry and pharmacy of the Ludwig–Maximilian University, Munich. Water was deionized (DI) by a VWR Purity PU 15 (VWR, Leuven, Belgium).

2.2. Instrumentations

2.2.1. Capillary electrophoresis (CE)

Monitoring of schreibersite corrosion and screening of phosphorylation reactions were performed on an Agilent ^{3D}CE 1600 apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) controlled by the ChemStation software Rev. B.04.03. Measurements ran on a fused silica capillary (ID 50 μm , OD 360 μm) purchased from MicroQuartz Munich (Munich, Germany).

2.2.2. Gas chromatography (GC)

Separation of silylated sugars from the schreibersite induced formose type reaction were achieved on a Trace GC Ultra system hyphenated to either a PolarisQ MS (quadrupole-ion trap mass spectrometer (MS)) or a ISQ single quadrupole MS (Thermo Scientific, San Jose, California, USA) operated by Xcalibur software 1.4 SR1 or 2.2 SP1, respectively. Injections utilized a split/splitless injector (split mode; at 250 °C). MS detection was, routinely, complemented by flame ionization detection that was operated at 250 °C and carbon-corrected.

2.2.3. Scanning electron microscope with energy dispersive x-ray analysis (SEM-EDX)

Synthetic schreibersite material was analyzed with a FEI Helios G3 UC system equipped with a X-Max-N 80 detector using the AzTec software. Measurements were conducted with 20 kV accelerating voltage at 4 mm working distance.

2.2.4. X-ray photoemission spectroscopy (XPS)

Schreibersite material was loaded into a UHV chamber equipped with a VSW TA10 x-ray source providing non-monochromatic Al K α radiation and a VSW HA100 hemispherical analyzer. Due to charging of the sample peak shifts were corrected by setting the Na 1s peak to 1072.1 eV. Spectra were acquired before and after cleaning of the sample by Ar⁺ sputtering (1 kV; 7 μA). The recorded peaks were fitted with a Doniach–Sunjic line shape convoluted with a Gaussian and linear background subtraction for analysis [79].

2.2.5. pH meter

Determination of pH values was conducted with the SCHOTT instrument pH meter Lab 850 by SI Analytics GmbH (Mainz, Germany).

2.3. Methods

2.3.1. CE

Separation conditions were predicted and optimized by the Peakmaster 5.3 Complex software [80]. The background electrolyte (BGE) chosen consisted of 20 mM salicylic acid and 30 mM BIS-TRIS (pH 6.2 and IS 20 mM). Samples were injected with 200 mbar \cdot s, and 0.1 vol% DMSO was used at outlet position before separation as electroosmotic flow (EOF) marker. Separation voltage was set to -30 kV with 40 mbar pressure assistance. The apparent mobility of the EOF was determined to be approximately $\mu_{\text{EOF}} = 11 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The capillary was conditioned each day using a sequence of water flush (2 min), 0.1 M sodium hydroxide flush (2 min), water flush (2 min) and BGE flush (5 min). In between measurements, the capillary was rinsed with BGE for 2 min. Indirect-UV electropherograms were recorded with 10 Hz at 210 and 230 nm with a bandwidth of 4 nm and ran at 25 °C. Peak positions were determined by fitting with the Haarhoff–Van der Linde function using OriginPro 2017 SR2 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). For identification and calibration, measurements with phosphorus oxyanions standards of different concentration were conducted with sodium hexafluorophosphate as internal standard in triplicates to determine effective mobilities and linearization graphs.

2.3.2. GC–MS

For the separation of sugars, two complementary derivatization strategies were used. Around 4 mg of residue of filtered and lyophilized reaction solution was dissolved in 400 μl pyridine, mixed with 400 μl of a 40 mg ml⁻¹ O-ethylhydroxylamine hydrochloride solution and heated to 70 °C for 30 min on a rocking shaker. One half of that solution was further derivatized with 120 μl BSTFA while the other one was subject to 50 μl MBTFA. Either step was followed by incubation at 70 °C for 30 min on a rocking shaker. BSTFA derivatized sugars were separated on a SE-52 column (14 m length, ID 250 nm, 250 nm film thickness) with 80 kPa helium and a temperature program starting at 50 °C for 2 min and increasing temperature by 10 K min⁻¹ to 140 °C and then 5 K min⁻¹ to 240 °C and keeping that temperature for 2 min MBTFA modified sugars were measured on a OC 225 column (30 m length, ID 250 nm, 250 nm film thickness) with 80 kPa helium using the following temperature gradient: 80 °C for 5 min, 2 K min⁻¹ to 160 °C, 10 K min⁻¹ to 200 °C and keeping that temperature for 12 min. Chromatograms were baseline corrected and peaks were integrated using OriginPro 2017 SR2 (OriginLab

Corporation, Northampton, USA). Integration results were corrected by the number of carbon atoms and used for relative quantification of components in mixture. Retention times and fragmentation patterns of standards of all unbranched aldose and ketose sugars up until 6 carbon atoms were used for identification of sugars in reaction mixture.

2.4. Corrosion experiments

2.4.1. Monitoring of schreibersite corrosion

1 g of commercially available Fe_3P was placed in glass CE vials and mixed with 500 μl water. Vials were capped, sealed with a crimper and kept at 5 °C, 25 °C, 80 °C or 150 °C for different periods of time. For monitoring of reaction process, vials were shortly removed from the heating block, opened and measured. Right after sample injection, reaction vessels were closed as described and put back into the heating block.

2.4.2. Reaction of organics in the presence of schreibersite

Glass CE vials were charged with 250 mg of synthetic schreibersite material and 0.5 ml of 0.020 M solution of an organic. If solubility of organics prohibited addition at desired concentration, the substance was added as a solid and the mixture was suspended in the given volume of DI water. The reaction mixture was capped, sealed with a crimper and heated to either 80 °C for 7 days or 150 °C for 1 day.

2.4.3. Schreibersite induced formose type reaction

Glass CE vials were filled with 1 g of synthetic schreibersite material and 1 ml of 0.250 M carbohydrate solution. In cross reactions the concentration of each component was 0.125 M. Vials were capped and sealed with a crimper. Reaction mixtures were heated at 80 °C for either 1 or 7 days before being filtered, lyophilized and derivatized for GC separation.

3. Results

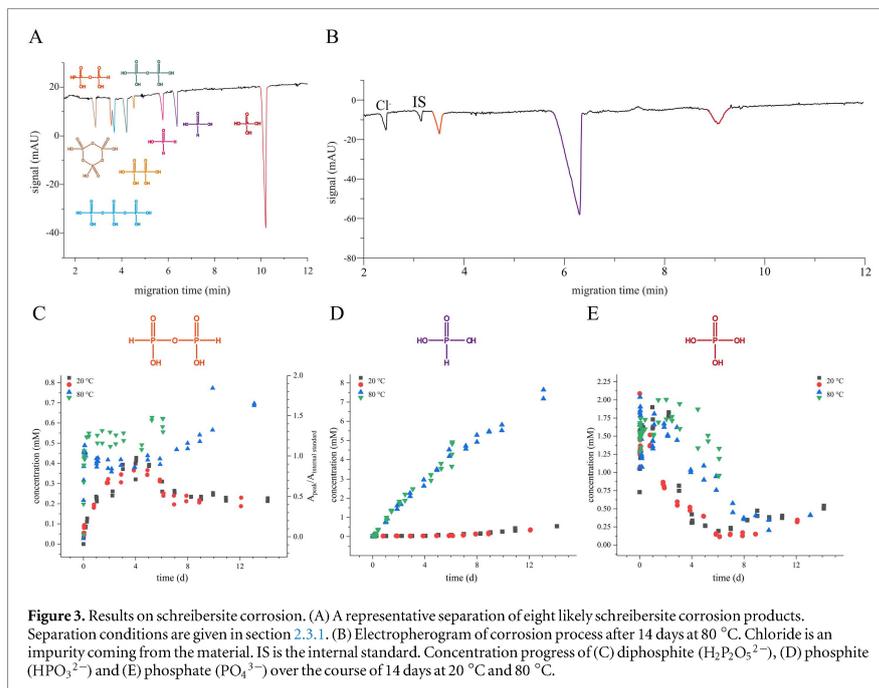
3.1. Verification of quality of schreibersite surrogate Fe_3P

The synthetic and commercially available Fe_3P which was shown to be a reasonable chemical proxy for schreibersite was probed via SEM-EDX and XPS to confirm that the material meets the quality of natural and artificial samples described in literature [81]. Full SEM-EDX and XPS data can be found in the supporting information (figures S1 and S2 is available online at stacks.iop.org/NJP/20/055003/mmedia). Either measurement validates that the material employed in all experiments is Fe_3P of high purity that has already undergone aerobic hydrolysis on the surface. It has been shown that this alteration does not corrupt the results of corrosion experiments performed thereafter [62, 81].

3.2. Analysis of schreibersite corrosion

Based on the results of Foster et al (see table 2) that showed that the outcome of the analysis of schreibersite hydrolysis depends on the subsequent work-up of the sample, the author's focus lay with the development of a separation method that would allow the continuous monitoring of the corrosion process under inert conditions so that pH-sensitive phosphorus oxyanions would be detected unambiguously. For that purpose, a CE method with indirect UV-detection was established that separates the common corrosion process products in about 12 min utilizing a BGE of the pH value of 6.2 under which the targeted molecules would be both stable and charged in order to allow separation. It shall be highlighted that many of the phosphorus oxyanions of low oxidation state are instable and hydrolyze under high and low pH. A representative separation is shown in figure 3(A).

Since sample consumption is in the nL regime and sample work-up is usually not required in CE separation, the schreibersite corrosion process became monitorable in a straightforward fashion. This way, we could screen the process under various conditions of different temperature, pressure, concentration and atmosphere. We observed that the corrosion process proceeds rather slowly at 5 °C and 20 °C but is sufficiently fast at higher temperatures. A typical electropherogram of the material after 14 days at 80 °C is depicted in figure 3(B). On the contrary to literature results summarized in table 2 (entries A–C, F), we did not observe hypo- or pyrophosphate. This, however, is in agreement with Foster et al [63] (see table 2, entry G). Additionally, we detected a signal of the effective mobility of $-(54.5 \pm 0.5) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ which could not be unambiguously attributed to either triphosphate or diphosphite ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$). As triphosphate would be accompanied with its hydrolyzes product pyrophosphate, which has not been detected, and a radical mechanism involving PO_3^{2-} radicals makes the formation of diphosphite ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$) likely [59], we can assign the peak of the given mobility to be diphosphite ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$). The progress of the changes in concentration for 20 °C and 80 °C for the three main products of the



corrosion process are shown in figures 2(C)–(E). It is highlighted that phosphite (HPO_3^{2-}) is the major dissolved product accumulating over time.

Furthermore, studies on the influence of inert atmosphere did not result in observations other than already published [56]. Pressure was found to have no effect on the outcome of the corrosion and the amount of added water solely changed the concentration of the products, not the product distribution. Unlike stated in literature, however, we found that the pH value of corrosion experiments changed drastically and immediately on contact with water. After mixing Fe_3P with water, we observed an instant increase of the pH value to around 11 that slowly decreased over time to 9. In order to exclude any impurities of the material to be the cause for that observation, we washed Fe_3P five times with water before conducting the pH measurement of the corrosion process. Even then the pH value rose to 9 in about 20 min and stagnated. We attribute the immediate increase of pH when not washing the material to the release of tribasic phosphate (PO_4^{3-}) that has formed on the surface due to hydrolysis by the humidity of the air.

Besides screening at 5 °C, 20 °C and 80 °C, we conducted corrosion experiments at 150 °C in sealed glass vials. They were in alignment with the previously stated findings but allowed the corrosion process to progress faster. Typically, a corrosion for 14 days at 80 °C equaled one for 1 day at 150 °C in product distribution. Representative electropherograms can be found in the supporting information (figure S4).

3.3. Screening of phosphorylation with organics

As a result of our studies that showed that the corrosion process is sufficiently fast at 80 °C and 150 °C, we screened several organic molecules for their reactivity towards phosphorylation or condensation of phosphates to polyphosphates under the given conditions. However, we could not find detectable amounts of new species in most of the electropherograms. Table 3 gives an overview of the probed molecules. Only for the tested carbohydrates, we observed additional peaks as well as a yellow discoloration of the samples. In combination with the results of Pasek *et al* [59] that described a tar like residue when reacting glycolaldehyde with schreibersite that they, however, could not analyze, we checked those reaction samples for products associated with the formose reaction.

3.4. Schreibersite catalyzed formose type reaction

The analysis of the carbohydrate samples from the reactivity studies of Fe_3P in the presence of organics confirmed to contain higher sugars such as formed in a formose type reaction. We, therefore, examined the four

Table 3. Overview of organic molecules tested in their effect during the schreibersite corrosion.

| O containing molecules | N containing molecules | S containing molecules | Carbohydrates | Membrane relevant molecules |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|---|
| Methanol | Ammonia | Sodium sulfide | Formaldehyde | Stearic acid |
| CH ₃ OH | NH ₃ | Na ₂ S | CH ₂ O | H ₃ C-(CH ₂) ₁₆ -COOH |
| Urea | Acetonitrile | Thiourea | Glycolaldehyde | Ethanolamine |
| H ₂ NCONH ₂ | CH ₃ CN | H ₂ NCSNH ₂ | HO-CH ₂ CHO | HO-C ₂ H ₄ -NH ₂ |
| Formamide | Cyanamide | | Glyceraldehyde | Choline |
| HCO-NH ₂ | NC-NH ₂ | | HO-CH ₂ -CH(OH)-CHO | (H ₃ C) ₃ N ⁺ -C ₂ H ₄ -OH |
| | Dicyandiamide | | Dihydroxyacetone | Inositol |
| | (H ₂ N) ₂ C=N-CN | | HO-CH ₂ COCH ₂ -OH | C ₆ H ₁₂ O ₆ |

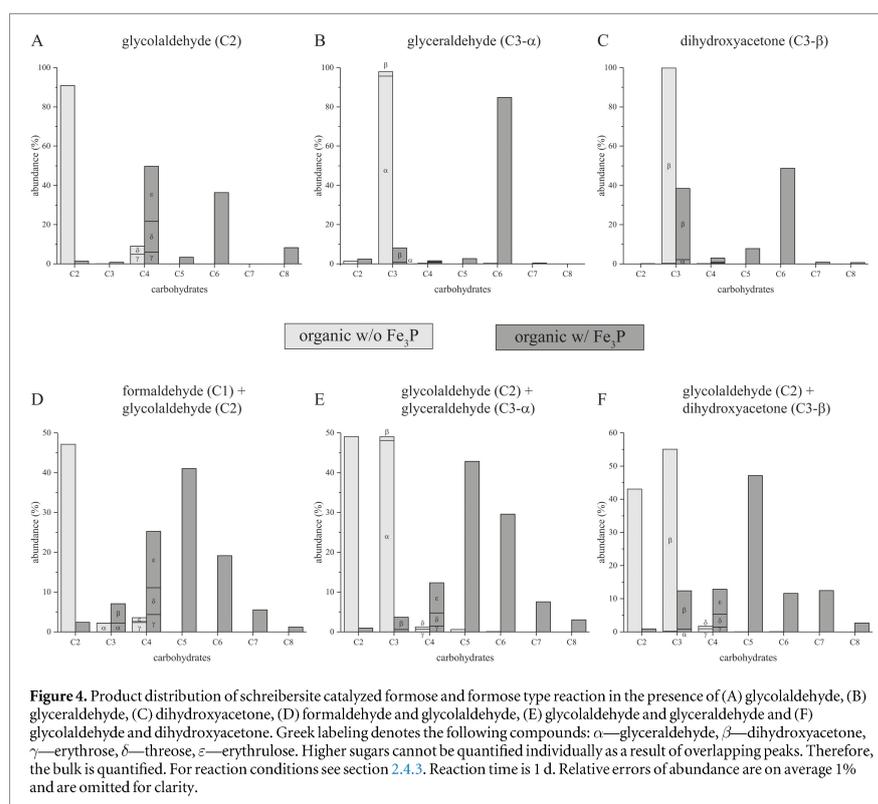
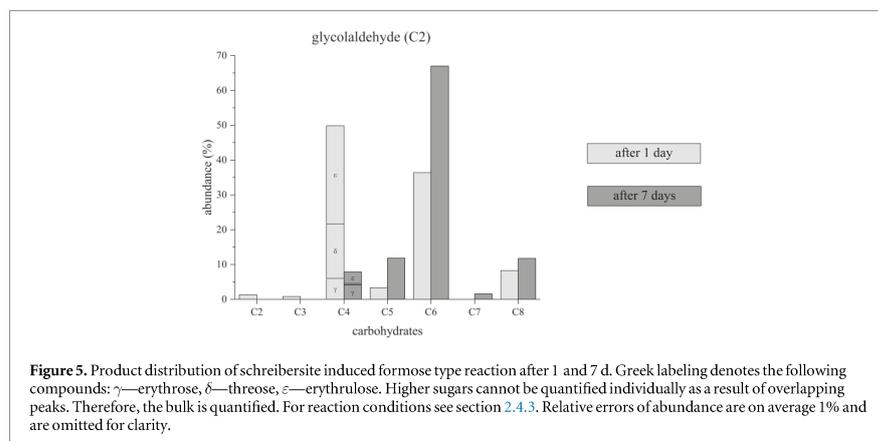


Figure 4. Product distribution of schreibersite catalyzed formose and formose type reaction in the presence of (A) glycolaldehyde, (B) glyceraldehyde, (C) dihydroxyacetone, (D) formaldehyde and glycolaldehyde, (E) glycolaldehyde and glyceraldehyde and (F) glycolaldehyde and dihydroxyacetone. Greek labeling denotes the following compounds: α—glyceraldehyde, β—dihydroxyacetone, γ—erythrose, δ—threose, ε—erythrulose. Higher sugars cannot be quantified individually as a result of overlapping peaks. Therefore, the bulk is quantified. For reaction conditions see section 2.4.3. Reaction time is 1 d. Relative errors of abundance are on average 1% and are omitted for clarity.

carbohydrates formaldehyde (C1 sugar), glycolaldehyde (C2 sugar), glyceraldehyde (C3 sugar) and dihydroxyacetone (C3 sugar) in single and cross-reaction setups and analyzed the product distribution. Separation of the reaction products was performed by GC utilizing the derivatization of carbohydrates with BSTFA and MBTFA that allows a relative quantification and identification of detected products. The results of our experiments are shown in figure 4. Typical gas chromatograms can be found in the supporting information (figure S5).

Formation of sugars was only observed in presence of schreibersite. The comparison of the product distributions of all performed reactions shows the self- and cross-addition of substrates as expected in a typical aldol reaction such as in the formose reaction network. Glycolaldehyde as a C2 carbohydrate predominantly forms C4, C6 and C8 sugars (see figure 4(A)), whereas glyceraldehyde and dihydroxyacetone as C3 sugars generate C6 carbohydrates (see figures 4(B), (C)). The results, further, demonstrate that dihydroxyacetone is less reactive than glyceraldehyde as is indicated by its smaller consumption in the reaction. For dihydroxyacetone, we, also, detected products of C6 constitution that did not match any of the unbranched carbohydrates



standards we used for establishing the GC separation method suggesting that branched sugars [70] are formed under these conditions.

We did not observe any conversion to higher carbohydrates within a day when only formaldehyde (C1 sugar) was employed. It can be, hence, concluded that schreibersite is not capable of activating formaldehyde which would require an Umpolung reactions. It is being consumed, though, in the presence of higher sugars (see figure 4(D)). In our cross-reaction experiments (see figures 4(D) to (F)), we could, further, observe a predominance for the formation of C5 sugars with the biologically relevant ribose being a minor constituent. C6 sugars formed were primarily ketoses rather than aldoses.

As it is known that the product distribution of the formose reaction changes with time, we examined the generation of higher carbohydrates for the glycolaldehyde sample after 1 and 7 d. The results are depicted in figure 5.

The results of this study are in agreement with previous observations of the formose reaction [70, 72]. Under prolonged reaction time the product distribution changes in favor of higher sugars. Also, more retro-aldol products such as C5 sugars become abundant and substrate is transferred into higher molecular structures resulting in a tar like material of low water solubility. Compared to analogous reaction conditions, however, the formation of tar and the associated decomposition of carbohydrates set in significantly later with schreibersite [70, 72]. The conditions introduced by the corrosion process presumably pose a mild environment in which the generation of sugars even over longer period of time is facilitated.

All identified and detected unbranched sugars of the performed experiments can be found in the supporting information (table S3).

4. Discussion

4.1. Monitoring of schreibersite corrosion

We could show that CE is a suitable method for monitoring the corrosion process of artificial schreibersite material as sample consumption is minimal and pretreatment unnecessary. Separations were performed under neutral conditions (pH 6.2) to exclude any bias connected to the pH sensitivity of phosphorus oxyanions. Our results on the composition of the aqueous phase of the Fe_3P corrosion are in general agreement with previously published results. Main constituents are phosphite (HPO_3^{2-}) and phosphate (PO_4^{3-}) [56, 59, 62]. In contrast to earlier work, we could not detect pyrophosphate or hypophosphate but diphosphite ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$). In case of the former, this might be due to a lack of sensitivity. Limits of detection with the indirect UV-detection are around 10–100 μM . In the latter case, it is assumed that diphosphite ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$) has not yet been observed as it hydrolyzes with a half-life of 3 min at 20 °C in 0.1 N NaOH solution [82, 83]. The general procedure of detection and quantification of corrosion products in literature, though, involves treatment of the samples with either NaOH or Na_2S in order to remove Fe(II) and allow NMR analysis. This practice significantly raises the pH value and would quench any available diphosphite ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$). On that note, it shall be highlighted that also phosphite (HPO_3^{2-}) is prone to hydrolysis generating phosphate (PO_4^{3-}) and molecular hydrogen, but this process only becomes relevant at high temperatures [84]. The differences in observations of NMR based methods and our approach is supported by Foster *et al* They performed ion chromatography of the corrosion

products without pretreatment of the samples and could not detect diphosphate ($P_2O_7^{4-}$) and hypophosphate ($P_2O_6^{4-}$) either [63].

Besides, the results of our CE method provide insight into the progress of the corrosion process for different temperature. Whereas the phosphate (PO_4^{3-}) concentration increases sharply in the beginning and then decreases to stagnate at a plateau of around 0.5 mM, concentrations of phosphite (HPO_3^{2-}) and diphosphite ($H_2P_2O_5^{2-}$) increase steadily over time for corrosions performed at 80 °C. At 20 °C diphosphite ($H_2P_2O_5^{2-}$) reaches a steady state concentration already after around 7 days while phosphite (HPO_3^{2-}) keeps increasing slowly. The immediate rise of the phosphate (PO_4^{3-}) concentration in the beginning regardless of the temperature is attributed to the already oxidized surface of the material containing phosphate (PO_4^{3-}) when stored under air. The advanced decrease of the concentration can be explained by the low solubility of iron(II) phosphate that over the cause of the corrosion is formed and depleting the solution of phosphate (PO_4^{3-}). The more soluble phosphite (HPO_3^{2-}), on the other hand, accumulates.

The immediate release of phosphate (PO_4^{3-}) is, also, held responsible for the observed quick rise of the pH value in the beginning of the corrosion. Such an increase can only be explained by phosphate (PO_4^{3-}) in its tribasic state (as in Na_3PO_4). As the mechanism of the corrosion is still elusive in detail, we argue that any phosphorus oxy compound formed will be in its fully deprotonated form as free protons of any acidic product would be reduced immediately by either iron or phosphorus in Fe_3P to form molecular hydrogen. The determined concentrations of phosphate (PO_4^{3-}) in the corrosion process match the observed pH values in this context. A concentration of 2 mM tribasic phosphate (PO_4^{3-}) as in the beginning of the corrosion experiments when other possibly buffering species are absent equals a pH value of around 11 as was observed. We believe that the basifying conditions of schreibersite have yet not been described in literature since experiments were performed with little material in 25–50 times the water volume we employed in our experiments. Such a dilution corresponds to a decrease in pH by 1.5 units. As the pH declines over time to a value of around 9 due to buffering reactions by iron (formation of insoluble $Fe(OH)_2$), published experiments likely observed a neutral pH of around 7.5.

4.2. Screening for phosphorylation and condensation to polyphosphates

The conducted reactions of organics in presence of schreibersite corrosion have shown no detectable amounts of both phosphorylated products or condensed phosphates. This demonstrates the low reactivity of the meteoritic material as is also reflected in the low yields of published but successful phosphorylation reactions with nucleosides [61] and glycerol [60]. It is very likely that the efficiency of those reactions could be enhanced by reducing the amount of water present. Water serves as a quenching agent for reactive phosphorus oxyradical intermediates [59] and, thus, hinders phosphorylation. As phosphorylation reactions in water are disfavored thermodynamically, such an approach might be beneficial in many regards.

4.3. Schreibersite catalyzed formose reaction

As discussed in section 4.1., corroded schreibersite material basifies the aqueous phase in which it is immersed by creating a buffer composed of phosphite (HPO_3^{2-}), phosphate (PO_4^{3-}) and iron(II) ions (Fe^{2+}). In such a medium, we observed that simple sugars react in an aldol reaction scheme to generate higher carbohydrates. This formose reaction network is a known abiotic pathway to biologically relevant sugars. We, therefore, tested the reaction with formaldehyde, glycolaldehyde, glyceraldehyde and dihydroxyacetone all of which have been linked to terrestrial [8, 85] and extraterrestrial [11, 86–88] origins. In all cases except for pure formaldehyde, we found typical formose network product distributions after one day. The fact that formaldehyde did not show any reactivity under the given conditions is in full agreement with previous observations in literature [70]. In order to activate formaldehyde, it has to undergo an Umpolung reaction which cannot be achieved by base catalysis. Formaldehyde, however, is being consumed in the presence of an organic co-catalyst. Any organic molecule with the ability to enediolize like glycolaldehyde can serve as such. Therefore, in cross-experiments that would constitute formaldehyde and glycolaldehyde we observed a full consumption of the carbon material enriching specifically C5 sugars. As typical of formose reaction networks the conversion itself shows little selectivity, and biologically important carbohydrates such as ribose are only minor components. It has been shown, though, that phosphorylation of carbohydrates drastically influences the stability of reaction products and, hence, changes the formose network outcome [77, 78]. In our future experiments, we will, therefore, examine possibilities to realize the generation and phosphorylation of sugars simultaneously by employing Fe_3P since the corrosion of this meteorite material creates a phosphor oxyanion enriched milieu and, thus, supplies all the necessary ingredients for such a reactivity. Unlike any other catalyst in the context of the formose reaction network studied so far in literature this is a unique feature of Fe_3P . Schreibersite, also, belongs to the few likely members of a hadean mineral inventory capable of triggering this network besides examples such as $Al(OH)_3$, $Ca(OH)_2$ and borates [36, 72]. Furthermore, we showed that Fe_3P creates a reaction environment in which the

generation of carbohydrates as well as the formation of tar occur more slowly in comparison to published experiments [72]. Stabilizing effects of the phosphate (PO_4^{3-}), phosphite (HPO_3^{2-}) and iron(II) enriched environment will be the focus of future studies. In any event, our studies present indication that schreibersite could be involved in a prebiotic scenario that gives rise to enriched aqueous phases of accessible dissolved phosphorus and carbohydrates simultaneously. As those are significant ingredients for metabolism, schreibersite could be conceived as a trigger for chemical reaction networks to form and chemically evolve to complex self-sustaining systems.

5. Conclusion

In the present contribution, we established a separation method based on CE to monitor unbiasedly the corrosion process of schreibersite and report on the ability of the material to catalyze the formation of carbohydrates from prebiotic precursors in a formose type reaction. The method we present distinguishes itself from previously reported approaches as it does not require any pretreatment steps that are believed to adulterate the product distribution. This is due to the severe pH sensitivity of phosphorus oxyanions. The introduced method utilizes pH neutral conditions (pH 6.2) and is performed within less than 12 min. With it we could detect phosphite (HPO_3^{2-}), phosphate (PO_4^{3-}) and presumably diphosphate ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5^{2-}$). We, further, recorded their concentration profiles for corrosions performed at 20 °C and 80 °C and found that phosphite (HPO_3^{2-}) is the major component accumulating over time. Based on those findings, we tested the corrosion process in the presence of different organics aiming at triggering the formation of either polyphosphates or phosphorylated organic molecules. We, however, could not find any hints for the success in those reactions but observed in carbohydrate samples the formation of higher sugars. Further studies revealed that schreibersite basifies the water in which it is immersed which together with released Fe(II) cations catalyzes reactions in the formose reaction network. This reaction is a prebiotically route to biologically relevant sugars. We could show that all simple carbohydrates like formaldehyde (only in presence of organic co-catalyst), glycolaldehyde, glyceraldehyde and dihydroxyacetone are susceptible to the reaction conditions introduced by the corrosion of schreibersite. In the reaction samples that contained mixtures of the given feedstock molecules preferably C5 sugars such as the biologically relevant ribose were formed, though ribose was only a minor constituent. In conclusion, our results demonstrate that schreibersite efficaciously catalyzes the aldol reactions in the formose reaction network while creating a phosphorus enriched milieu at the same time. It is the only known member of the hadean eon mineral inventory to show that ability. Our findings, thus, implicate a prebiotic scenario in which phosphorus and sugar chemistry are connected. It poses one of the few instances in literature so far in which interplanetary material is directly involved in prebiotic chemistry on the early earth.

Acknowledgments

Generous financial support by the Max-Planck-Society is appreciatively acknowledged. SP thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a PhD fellowship. JS thanks the Alexander von Humboldt Foundation for a postdoctoral fellowship. Jacob Lucian Gorenflos López is acknowledged for support in developing the GC separation. The authors, further, thank Dr Steffen Schmidt (Professor Dr Bein, LMU) for conducting the SEM-EDX measurements.

Author contributions

SP and OT jointly designed the research project and experiments. SP performed, analyzed and evaluated all corrosion experiments. JS developed CE separation method and MH as well as SL developed GC separation method. JS and SP examined and evaluated the kinetics of the schreibersite corrosion in water and performed reactivity studies with organics. AH measured and evaluated XPS of Fe_3P . SP wrote the paper. OT initiated and oversaw the project.

ORCID iDs

S Pallmann  <https://orcid.org/0000-0002-4554-6512>

J Šteflová (neé Svobodová)  <https://orcid.org/0000-0002-3160-7257>

M Haas  <https://orcid.org/0000-0002-4712-7338>

O Trapp  <https://orcid.org/0000-0002-3594-5181>

References

- [1] Oparin A I 1924 *Origin of Life* (Moscow: Moskovskiy Rabochiy)
- [2] Haldane J B S 1929 *Rationalist Annu.* **148** 3–10
- [3] Miller S L 1953 *Science* **117** 528–9
- [4] Darwin Correspondence Project *Letter no. 7471* <http://www.darwinproject.ac.uk/DCP-LETT-7471> (Accessed: 2 May, 2018)
- [5] Borucki W J et al 2012 *Astrophys. J.* **745** 120
- [6] Borucki W J et al 2013 *Science* **340** 587–90
- [7] Patel B H, Percivalle C, Ritson D J, Duffy C D and Sutherland J D 2015 *Nat. Chem.* **7** 301–7
- [8] Ritson D and Sutherland J D 2012 *Nat. Chem.* **4** 895–9
- [9] Coggins A J and Powner M W 2017 *Nat. Chem.* **9** 310–7
- [10] Butlerow A 1861 *Ann. Chem. Pharm.* **120** 295–8
- [11] Meinert C et al 2016 *Science* **352** 208–12
- [12] Sponer J E et al 2016 *Chemistry* **22** 3572–86
- [13] Oró J 1960 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2** 407–12
- [14] Borquez E, Cleaves H J, Lazzano A and Miller S L 2005 *Orig. Life Evol. Biosph.* **35** 79–90
- [15] Benner S A, Kim H J and Carrigan M A 2012 *Acc. Chem. Res.* **45** 2025–34
- [16] Gibard C, Bhowmik S, Karki M, Kim E-K and Krishnamurthy R 2017 *Nat. Chem.* **10** 212–7
- [17] McCollom T M 2013 *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **41** 207–29
- [18] McCollom T M and Seewald J S 2007 *Chem. Rev.* **107** 382–401
- [19] Trifonov E N 2011 *J. Biomol. Struct. Dyn.* **29** 259–66
- [20] Shapiro R 2006 *Q. Rev. Biol.* **81** 105–26
- [21] Cleland C and Chyba C 2007 *Planets and Life: The Emerging Science of Astrobiology* ed W T I Sullivan and J A Baross (Cambridge: Cambridge University Press) pp 119–31
- [22] Ruiz-Mirazo K, Briones C and de la Escosura A 2014 *Chem. Rev.* **114** 285–366
- [23] Joyce G, Deamer D and Fleischaker G 1994 *Origins of Life: the Central Concepts* (Boston, MA: Jones and Bartlett)
- [24] Szostak J W 2012 *J. Biomol. Struct. Dyn.* **29** 599–600
- [25] Martin W, Baross J, Kelley D and Russell M J 2008 *Nat. Rev. Microbiol.* **6** 805–14
- [26] Huber C, Eisenreich W and Wächtershäuser G 2010 *Tetrahedron Lett.* **51** 1069–71
- [27] Yamagata Y, Watanabe H, Saitoh M and Namba T 1991 *Nature* **352** 516–9
- [28] Rode B M, Fitz D and Jakschitz T 2007 *Chem. Biodivers.* **4** 2674–702
- [29] Bada J L 2004 *Earth Planet. Sci. Lett.* **226** 1–15
- [30] Robertson M P and Miller S L 1995 *Nature* **375** 772–4
- [31] Shapiro R 1999 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96** 4396–401
- [32] Shapiro R 2002 *Orig. Life Evol. Biosph.* **32** 275–8
- [33] Lange H C and Heijnen J J 2001 *Biotechnol. Bioeng.* **75** 334–44
- [34] Rumble J R 2017 *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 98th edn (Boca Raton: CRC Press)
- [35] Rudnick R L and Gao S 2003 *Treatise on Geochemistry* ed R L Rudnick (Oxford: Elsevier) p 659
- [36] Hazen R M 2013 *Am. J. Sci.* **313** 807–43
- [37] Pasek M A, Gull M and Herschy B 2017 *Chem. Geol.* **475** 149–70
- [38] Gull M 2014 *Challenges* **5** 193–212
- [39] Schoffstall A M 1976 *Orig. Life Evol. Biosph.* **7** 399–412
- [40] Schoffstall A M, Barto R J and Ramos D L 1982 *Orig. Life Evol. Biosph.* **12** 143–51
- [41] Schoffstall A M and Laing E M 1985 *Orig. Life Evol. Biosph.* **15** 141–50
- [42] Saladino R, Botta G, Pino S, Costanzo G and Di Mauro E 2012 *Chem. Soc. Rev.* **41** 5526–65
- [43] Saladino R et al 2015 *Proc. Natl Acad. Sci.* **112** E2746–55
- [44] Costanzo G, Saladino R, Crestini C, Ciciriello F and Di Mauro E 2007 *J. Biol. Chem.* **282** 16729–35
- [45] Gull M, Zhou M, Fernandez F M and Pasek M A 2014 *J. Mol. Evol.* **78** 109–17
- [46] Reimann R and Zubay G 1999 *Orig. Life Evol. Biosph.* **29** 229–47
- [47] Lohrmann R and Orgel L 1971 *Science* **171** 490–4
- [48] Handschuh G J and Orgel L E 1973 *Science* **179** 483–4
- [49] Österberg R, Orgel L and Lohrmann R 1973 *J. Mol. Evol.* **2** 231–4
- [50] Epps D E, Nooner D W, Eichberg J, Sherwood E and Oro J 1979 *J. Mol. Evol.* **14** 235–41
- [51] Steinman G, Kenyon D H and Calvin M 1965 *Nature* **206** 707–8
- [52] Rao M, Eichberg M R and Oro J 1982 *J. Mol. Evol.* **18** 196–202
- [53] Ni F, Sun S, Huang C and Zhao Y 2009 *Green Chem.* **11** 569–73
- [54] Krishnamurthy R, Guntha S and Eschenmoser A 2000 *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **39** 2281–5
- [55] Kolb V and Orgel L E 1996 *Orig. Life Evol. Biosph.* **26** 7–13
- [56] Pasek M A and Lauretta D S 2005 *Astrobiology* **5** 515–35
- [57] Bryant D E et al 2009 *Int. J. Appl. Sci. Bioeng.* **8** 27–36
- [58] Geist V, Wagner G, Nolze G and Moretzki O 2005 *Cryst. Res. Technol.* **40** 52–64
- [59] Pasek M A, Dworkin J P and Lauretta D S 2007 *Geochim. Cosmochim. Acta* **71** 1721–36
- [60] Pasek M A, Harnmeijer J P, Buick R, Gull M and Atlas Z 2013 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110** 10089–94
- [61] Gull M et al 2015 *Sci. Rep.* **5** 17198
- [62] Bryant D E and Kee T P 2006 *Chem. Commun.* **2006** 2344–6
- [63] Pech H et al 2011 *J. Chromatogr. Sci.* **49** 573–81
- [64] Breslow R 1959 *Tetrahedron Lett.* **1** 22–6
- [65] Weiss A H, LaPierre R B and Shapira J 1970 *J. Catal.* **16** 332–47
- [66] Socha R, Weiss A and Sakharov M 1981 *J. Catal.* **67** 207–17
- [67] Tambawala H and Weiss A H 1972 *J. Catal.* **26** 388–400
- [68] Huskey W P and Epstein I R 1989 *J. Am. Chem. Soc.* **111** 3157–63
- [69] Kim H J et al 2011 *J. Am. Chem. Soc.* **133** 9457–68
- [70] Delidovich I V, Simonov A N, Taran O P and Parmon V N 2014 *ChemSusChem* **7** 1833–46

- [71] Simonov A N, Pestunova O P, Matvienko L G and Parmon V N 2007 *Kinet. Catal.* **48** 245–54
- [72] Iqbal Z and Novalin S 2012 *Curr. Org. Chem.* **16** 769–88
- [73] Matsumoto T, Yamamoto H and Inoue S 1984 *J. Am. Chem. Soc.* **106** 4829–32
- [74] Baly E C C 1924 *Ind. Eng. Chem. Res.* **16** 1016–8
- [75] Schwartz A W and De Graaf R 1993 *J. Mol. Evol.* **36** 101–6
- [76] Ricardo A, Carrigan M A, Olcott A N and Benner S A 2004 *Science* **303** 196
- [77] Müller D et al 1990 *Helv. Chim. Acta* **73** 1410–68
- [78] Simonov A et al 2007 *Kinet. Catal.* **48** 550–5
- [79] Doniach S and Sunjic M 1970 *J. Phys. C: Solid State Phys.* **3** 285
- [80] Jaros M, Hruska V, Stedry M, Zuskova I and Gas B 2004 *Electrophoresis* **25** 3080–5
- [81] Pirim C, Pasek M A, Sokolov D A, Sidorov A N, Gann R D and Orlando T M 2014 *Geochim. Cosmochim. Acta* **140** 259–74
- [82] Blaser B and Worms K H 1959 *Z. Anorg. Allg. Chem.* **301** 18–35
- [83] Thilo E and Heinz D 1955 *Z. Anorg. Allg. Chem.* **281** 303–21
- [84] Pietsch E M and R J 1965 *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. Phosphor Teil C* (Berlin: Verlag)
- [85] Cleaves H J 2008 *Precambrian Res.* **164** 111–8
- [86] de Marcellus P et al 2015 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112** 965–70
- [87] Goesmann F et al 2015 *Science* **349** aab0689
- [88] McCaffrey V P, Zellner N E, Waun C M, Bennett E R and Earl E K 2014 *Orig. Life Evol. Biosph.* **44** 29–42

Supporting Information

Schreibersite: an effective catalyst in the formose reaction network.

S Pallmann¹, J Šteflová (neé Svobodová)¹, M Haas^{1,2}, S Lamour^{1,2}, A Henß¹, O Trapp^{*,1,2}

¹ Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 5–13, 81377 München, Germany

² Max-Planck-Institut für Astronomie, Königstuhl 17, 69117 Heidelberg, Germany

Email: oliver.trapp@cup.uni-muenchen.de

Keywords: Schreibersite, phosphorus oxyanions, formose type reaction, carbohydrate, sugar, origin of life, meteorite

Table of contents

| | | |
|---|---|---|
| 1 | SEM-EDX Data of Synthetic Schreibersite Material | 2 |
| 2 | XPS Data of Synthetic Schreibersite Material | 3 |
| 3 | Calibration Data for Quantitative CE Analysis and Exemplary Electropherograms after 14 days at 80 °C and after 1 d at 150 °C..... | 4 |
| 4 | GC Separation of Reaction Products Obtained by Schreibersite Catalyzed Formose Reaction Network | 6 |
| 5 | References | 8 |

1 SEM-EDX Data of Synthetic Schreibersite Material

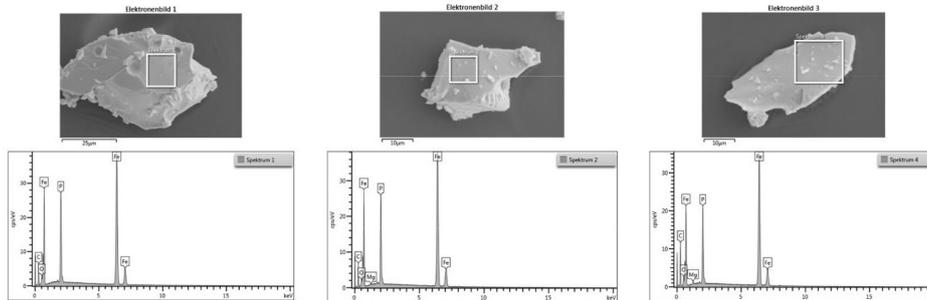


Figure S1. SEM-EDX data of synthetic Schreibersite material.

Table S1. Summary of the Schreibersite composition.

| Sample | Element | Atom (%) |
|--------|---------|----------|
| 1 | O | 5.77 |
| | P | 24.23 |
| | Fe | 69.99 |
| 2 | O | 4.68 |
| | Mg | 0.54 |
| | P | 23.62 |
| | Fe | 71.17 |
| 3 | O | 7.16 |
| | Mg | 1.70 |
| | P | 20.92 |
| | Fe | 70.23 |

Sample 1: $\text{Fe}_{2.89}\text{P}$

Sample 2: $\text{Fe}_{3.04}\text{P}$

Sample 3: $\text{Fe}_{3.36}\text{P}$

2 XPS Data of Synthetic Schreibersite Material

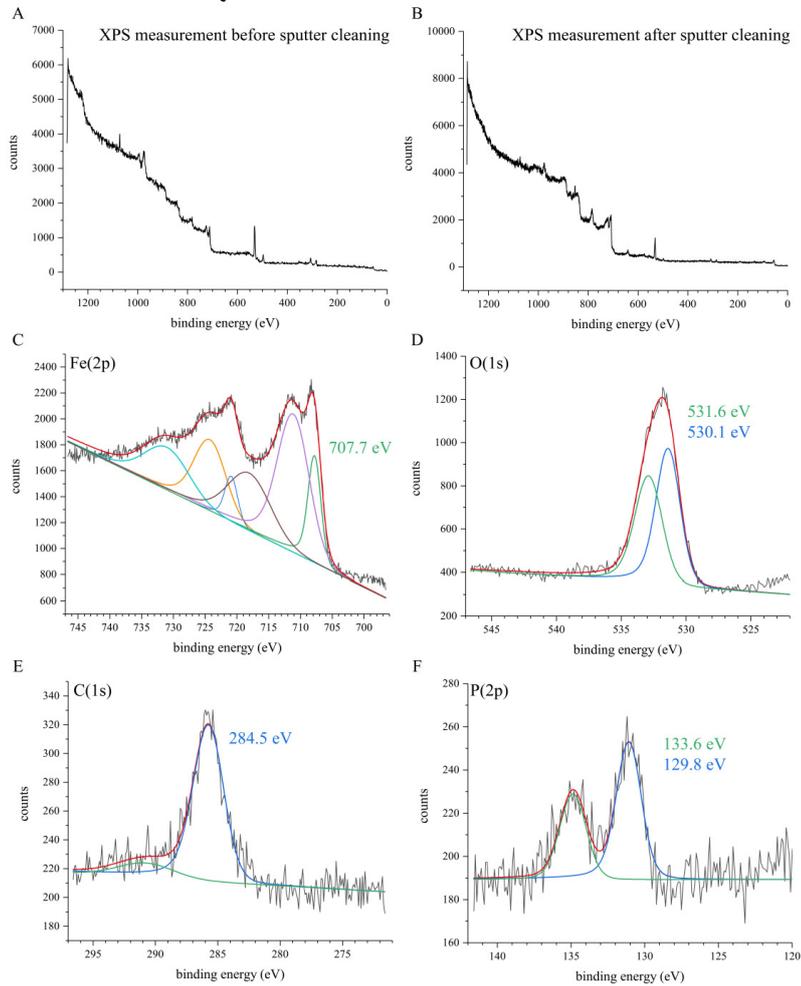


Figure S2. XPS data of synthetic Schreibersite material. Peaks were fitted with a Doniach-Sunjic line shape convoluted with a Gaussian and linear background subtraction for analysis. [1] In case of the iron spectrum it shall be noted that the analysis of first row transition metals and especially their oxides and hydroxides is demanding due to the complex and overlapping binding energies stemming from peak asymmetries, multiplet splitting, shake-up and plasmon loss structures. We, therefore, fitted based on the results of Biesinger *et al.* to determine the binding energy for the metallic iron constituent. [2] Our results match previously reported spectra on Fe_3P . [3] For details see experimental section of the paper.

3 Calibration Data for Quantitative CE Analysis and Exemplary Electropherograms after 14 days at 80 °C and after 1 d at 150 °C

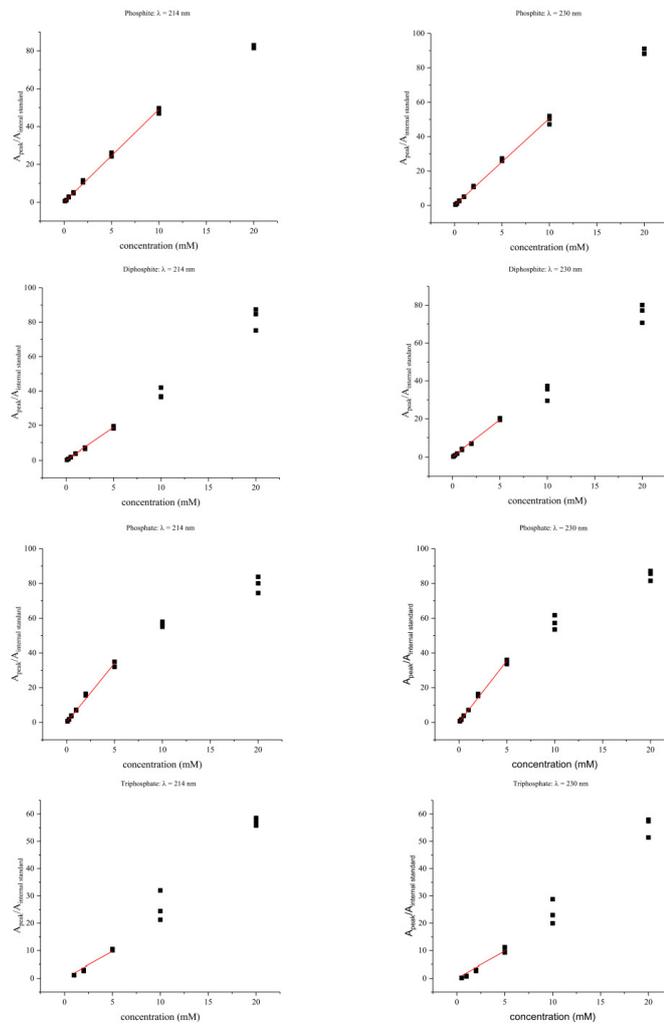


Figure S3. Calibration curves for determination of concentration of phosphate, pyrophosphate and phosphite. Intercept is set to 0. Measurements were performed as triplicates.

Table S2. Calibration data.

| Calibration | Slope (1/mM) | Error of slope (1/mM) | R ² |
|---------------------|--------------|-----------------------|----------------|
| Phosphate 214 nm | 7.089 | 0.093 | 0.99705 |
| Phosphate 230 nm | 6.797 | 0.132 | 0.99362 |
| Phosphite 214 nm | 5.063 | 0.052 | 0.99785 |
| Phosphite 230 nm | 5.031 | 0.083 | 0.99539 |
| Triphosphate 214 nm | 1.944 | 0.091 | 0.98260 |
| Triphosphate 230 nm | 1.960 | 0.109 | 0.96697 |
| Diphosphite 214 nm | 3.777 | 0.041 | 0.99800 |
| Diphosphite 230 nm | 3.886 | 0.048 | 0.99736 |

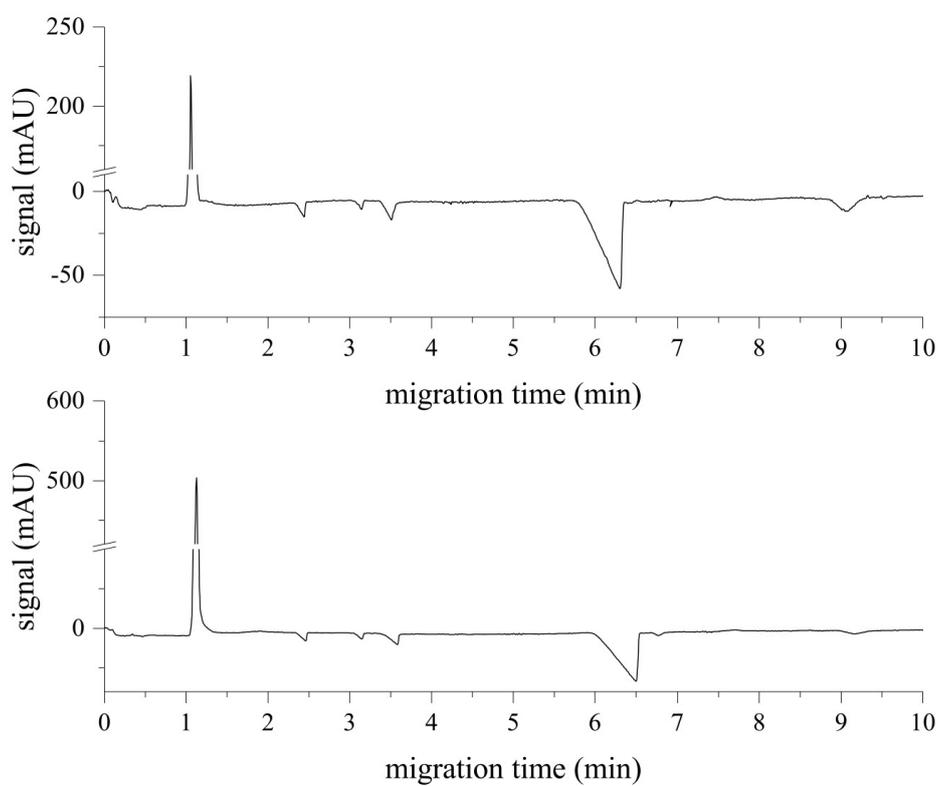


Figure S4. Electropherograms for the corrosion of schreibersite for 14 days at 80 °C (top) and for 1 day at 150 °C (bottom).

4 GC Separation of Reaction Products Obtained by Schreibersite Catalyzed Formose Reaction Network

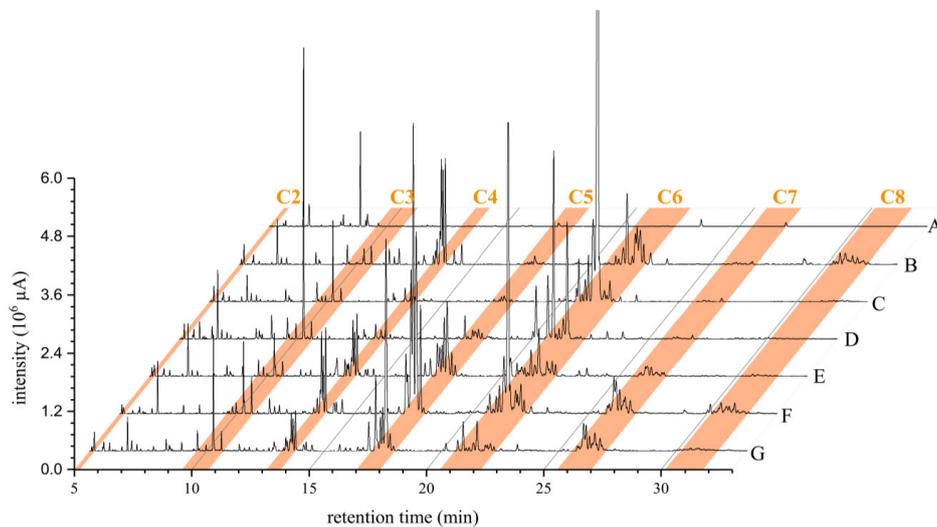


Figure S5. GC separation of schreibersite triggered formose reaction network in the presence of A) formaldehyde, B) glycolaldehyde, C) glyceraldehyde, D) dihydroxyacetone, E) formaldehyde and glycolaldehyde, F) glycolaldehyde and glyceraldehyde and G) glycolaldehyde and dihydroxyacetone.

Comparison of areas of carbohydrate peaks of blank and reaction samples corrected by an internal standard (Phenyl β -D-glucopyranoside) suggest an average conversion of 60 % into the given product distributions.

Table S3. Identified carbohydrates in the schreibersite triggered formose reaction network. Sugars in *italic* are ketoses in contrast to aldoses.

| #C | Schreibersite corrosion with | formaldehyde | glycolaldehyde 1d | glycolaldehyde 7 d | glyceraldehyde | dihydroxyacetone | formaldehyde + glycolaldehyde | glycolaldehyde + glyceraldehyde | glycolaldehyde + dihydroxyacetone |
|----|------------------------------|--|-------------------|--------------------|----------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 2 | Glycolaldehyde | - | x | - | x | x | x | x | X |
| 3 | Glyceraldehyde | - | - | - | x | x | x | x | X |
| | Dihydroxyacetone | - | x | - | x | x | x | x | x |
| 4 | Erythrose | - | X | X | X | X | X | X | X |
| | Threose | - | X | X | X | X | X | X | X |
| | Erythrulose | - | X | X | X | X | X | x | X |
| 5 | Ribose | - | X | X | X | X | x | X | X |
| | Arabinose | - | X | X | X | X | X | X | X |
| | Xylose | - | X | X | X | X | X | X | X |
| | Lyxose | - | x | X | X | X | X | X | X |
| | Ribulose | Not unambiguously identified. Either of them or both are constituents. | | | | | | | |
| | Xylulose | | | | | | | | |
| 6 | Allose | - | X | X | - | - | - | x | x |
| | Altrose | - | X | X | - | - | X | X | x |
| | Glucose | - | X | X | X | x | X | X | x |
| | Mannose | - | X | X | X | - | X | X | x |
| | Gulose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Idose | - | X | X | X | - | x | X | x |
| | Galactose | - | X | X | X | - | X | X | X |
| | Talose | - | X | X | X | x | X | x | X |
| | Psicose | - | x | x | x | x | X | x | x |
| | Fructose | Not unambiguously identified. Either of them or both are constituents. | | | | | | | |
| | Sorbose | | | | | | | | |
| | Tagatose | - | x | x | x | x | x | x | x |

5 References

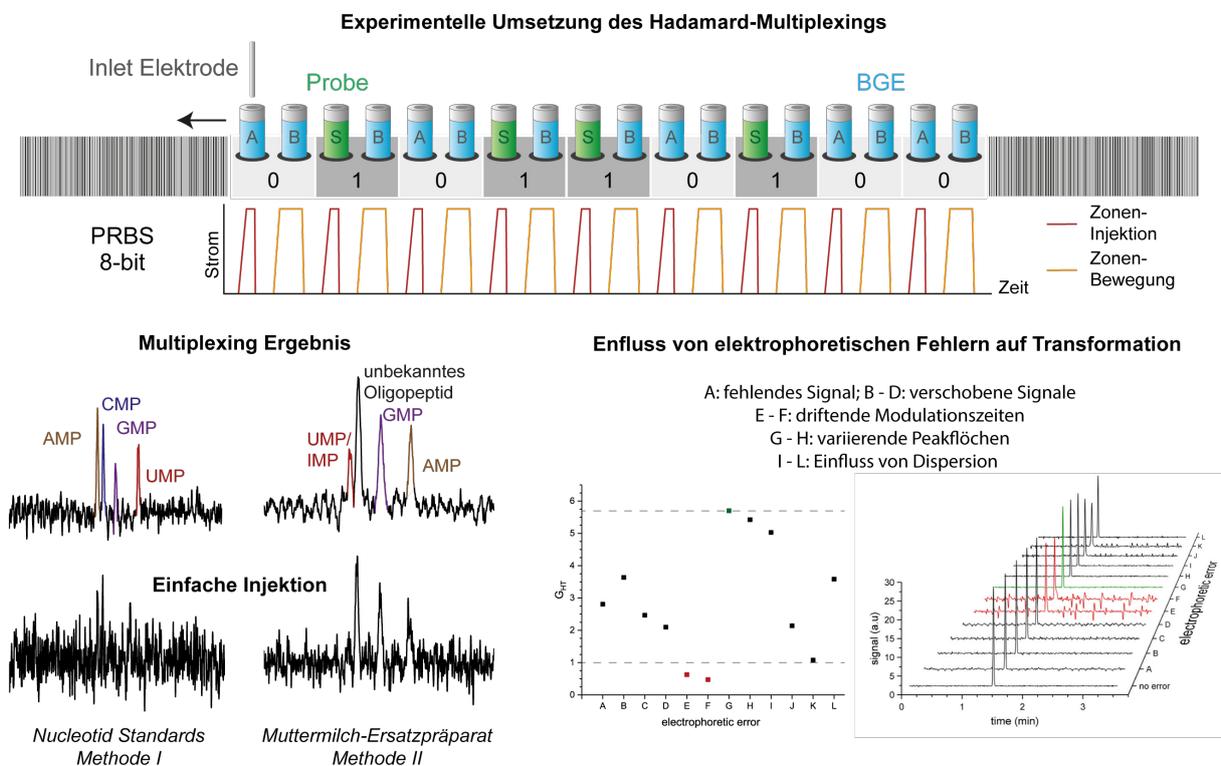
- [1] Doniach S and Sunjic M 1970 *JPhC* **3** 285
- [2] Biesinger M C, Payne B P, Grosvenor A P, Lau L W M, Gerson A R and Smart R S C 2011 *Appl. Surf. Sci.* **257** 2717-30
- [3] Pirim C, Pasek M A, Sokolov D A, Sidorov A N, Gann R D and Orlando T M 2014 *Geochim. Cosmochim. Acta* **140** 259-74

5.3. Direkte Hadamard-Transformations-Kapillarzonelektrophorese ohne instrumentelle Modifikationen

Sebastian Pallmann, Alexander Florian Siegle, Jana Šteflová (neé Svobodová) und Oliver Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8445-8453.³¹⁹

Kurzzusammenfassung

In der genannten Publikation wird durch die Autoren erstmalig eine Vorgehensweise beschrieben, mit deren Hilfe das auf Hadamard-Transformation basierende Multiplexing auf kommerziellen UV-Kapillarelektrophorese-Instrumenten ohne zusätzliche Hardware-Modifikationen realisiert werden kann. Dies wurde zum einen durch eine abwechselnde Folge von Zoneninjektion und -bewegung von Probe und Hintergrundpuffer (BGE) und zum anderen durch die Auftrennung langer Injektionsfolgen in kürzere Sequenzen erreicht, die anschließend Computer-gestützt wieder zusammengefügt werden. Auf diese Weise konnten Modulationen mit einer Länge von bis zu 8-bit umgesetzt und dabei Faktoren der Intensitätssteigerungen von bis zu 6.9 (theoretisch möglich 8.0) erreicht werden.



In der Publikation werden ferner experimentelle und simulative Studien zur Untersuchung der eintretenden Effekte bei wiederholter Unterbrechung des Stroms während der Analyse vorgestellt. Insbesondere die Änderungen des elektroosmotischen Flusses wurde als eine signifikante Störgröße identifiziert. Zum erweiterten Verständnis der Einflüsse von

Veröffentlichte Arbeiten

elektrophoretischen Fehlern auf die Hadamard-Transformation beinhaltet die Publikation darüber hinaus theoretische und simulative Studien. Dabei wurde Modulationszeitendrifts zwischen den verkürzten Sequenzen als am schwerwiegendsten erkannt. Zusätzlich wird die Anwendung der vorgestellten Technik auf eine biologische Probe mit komplexer Matrix demonstriert. So wurde am Beispiel eines Muttermilch-Ersatzpräparates die Anwendbarkeit der Hadamard-Transformation-Kapillarzonenelektrophorese validiert.

Autorenbeitrag

Das Forschungsvorhaben wurde von OT, SP, AS und JS gemeinschaftlich entworfen. SP führte alle Experimente, Datenbearbeitungen und -auswertungen durch. JS optimierte die Trennung für die Analyse des Muttermilchpräparats und hat in diesem Fall die Multiplexing-Daten aufgenommen. Datenverarbeitung und -auswertung übernahm SP. SP und AS bewerteten die Ergebnisse und entwickelten die Methode. Basierend auf Arbeiten von AS untersuchte SP die Auswirkungen von temporalen Fehlern auf die Hadamard-Transformation. SP hat die Publikation geschrieben.

Lizenz

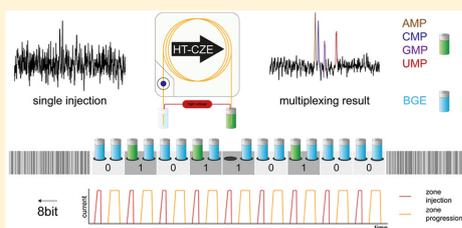
Wiedergegeben mit Erlaubnis nach Sebastian Pallmann, Alexander Florian Siegle, Jana Šteflová (neé Svobodová) und Oliver Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8445-8453. Copyright 2018 American Chemical Society.

Direct Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis without Instrumental Modifications

Sebastian Pallmann,^{†,‡} Alexander F. Siegle,[†] Jana Šteflová,^{†,§} and Oliver Trapp^{*,†,‡,§}[†]Ludwig-Maximilian University Munich, Faculty for Chemistry and Pharmacy, Butenandtstrasse 5-13, 81377 Munich, Germany[‡]Max-Planck-Institute for Astronomy, Königstuhl 17, 69117 Heidelberg, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: We report the first successful implementation of a multiplexing method on a standard capillary electrophoresis system with UV detection that is independent of additional hardware. This was achieved using the Hadamard transform approach and employing vial exchange and voltage suspensions for translation of pseudorandom binary sequence elements into sample and background electrolyte injections of a capillary zone electrophoresis separation. Sequences exceeding peak capacity of the capillary were subdivided into shorter subsequences measured successively and realigned afterward based on EOF marker or analyte peaks. This way, we realized and deconvoluted modulation sequences as long as 8-bit (255 injections) for two systems containing either AMP or a mixture of the nucleotides (A,C,G,U)MP resulting in electropherograms of considerably improved signal-to-noise ratio. We achieved factors of intensity enhancement of around 6.9 and 5.2, respectively (theoretical maximum 8.0). This contribution, further, presents experimental and simulation studies on the effects on zones during injection and separation when experiencing voltage suspensions. Besides analysis of EOF behavior and influence of diffusion dispersion, we also provide data on the significance of specific electrophoretic errors such as peak position shift, inconsistent sample injection, and peak broadening on the quality of the inverse Hadamard transform. Moreover, the application of our approach to the practical analysis of a milk sample is described. The results demonstrate the applicability of multiplexing on unmodified standard CE instrumentation and establish a new suitable methodology to enhance the low sensitivity of on-column UV detection in capillary electrophoresis.



Capillary electrophoresis (CE) is established as a powerful separation method due to its superior separation efficiency combined with high resolution, broad analyte applicability, short analysis time, and particularly low sample consumption.^{1,2} However, one of the biggest drawbacks lies with the commonly used on-column UV detection. As a result of the short optical path length restricted by the capillary diameter, sensitivity is on average 2 orders of magnitude lower than in high performance liquid chromatography (HPLC).³ Detection limits in CE usually amount to 10^{-6} M.¹

For addressing the lack in sensitivity, different approaches have been developed that roughly divide into hardware solutions and preconcentration strategies. The former includes new designs of detection windows with longer light paths such as Z-,⁴ bubble-,⁵ or rectangularly shaped capillaries⁶ as well as new means of detection like amperometry⁷ or laser-induced fluorescence (LIF)^{8,9} with limits of detection (LOD) of 10^{-8} M and 10^{-12} M,¹ respectively. The latter comprises a variety of different stacking methods^{10,11} as well as two-dimensional CE setups employing isotachopheresis^{12–14} that both allow for an improved signal-to-noise ratio (SNR).

Another approach to improve sensitivity in separation science is by use of multiplexing techniques.^{15,16} Those include

mathematical strategies like Fourier (FT) or Hadamard transform (HT) which are already well-established in the literature for various kinds of analytical tools, e.g. gas chromatography (GC),^{17–22} LC,^{23–28} ion mobility,^{29,30} and mass spectrometry (MS).^{31–35} In separation applications, the modulation of the input information—the analyte signal—is achieved by means of pseudorandom binary sequences (PRBS) that consist of defined consecutions of “1” and “0” coding for the injection of sample and blank, respectively.^{36–41} Their number of elements m is denoted by the exponent n (bit) according to $m = 2^n - 1$. Cross-correlation of the overlapped detector signal with the input sequence allows, subsequently, for the deconvolution of the conventional chromatographic information resulting in an increased SNR.^{42–46} The principles of Hadamard transform and cross-correlation techniques have been described in detail in the literature.^{15,16,18,19,42}

The HT approach has been realized in modes of CE such as capillary zone electrophoresis (CZE),^{47,48} micellar electrokinetic chromatography (MEKC),⁴⁹ and microchip CE^{50–53}

Received: March 5, 2018

Accepted: June 9, 2018

Published: June 10, 2018

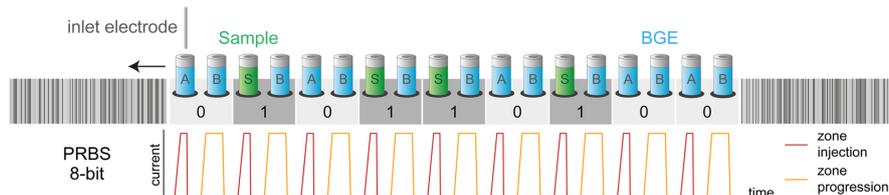


Figure 1. Implementation of HT approach in CZE through vial exchange at inlet and voltage suspensions for translation of PRBS elements into sample (1) and BGE (0) injections. Injected zones are promoted in the capillary by a second phase of voltage application. Thus, each PRBS element consists of two injection cycles employing three vials: Sample S and BGE A for zone injection and BGE B for zone progression.

using a variety of different detectors such as UV,^{54–57} LIF,^{52,58,59} and amperometry.⁵³ Imasaka was the first to utilize HT-CZE in combination with fluorescence detection to expand the LOD of analytes into the subnano- and even subpicomolar scale.^{49,60–63} However, such approaches generally lack common accessibility. That is because they rely on additional custom-made injectors in order to perform alternating sample and blank injections without having to disconnect the system from continuous voltage. Such hardware typically comprises pneumatic autosamplers,^{3,55} micromachined inlet ports, or switches of various shapes^{47,56,57,64} and setups for optical gating.^{58,60} To our knowledge, there has yet only been one research report by Seiman and co-workers⁶⁵ that examined cross-correlation CE without additional hardware and investigated effects of repeated voltage suspensions. They realized 6-bit PRBS and SNR improvements of 2.8 (4.0 theoretical maximum), however, only with a single analyte present. Extension of the number of analytes in the experiments led to no SNR improvements and nonevaluable data.

Since we previously reported on the successful implementation of high-throughput multiplexing gas chromatography^{66,67} as well as of HT encoded multiplexing to standard HPLC instrumentation by use of macro control avoiding custom-made injectors,^{68–70} the results of Seiman et al. encouraged us to extend our studies onto HT-CZE. Here, we present our strategy to realize multiplexing on commercially available CE equipment achieving considerable improvements in UV sensitivity independent of additional hardware or preconcentration strategies. We describe the physical effects that go along with multiple injections including voltage suspensions and how to compensate for them.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Taurine (99%), piperidine (99.5%), dichloromethane (CH_2Cl_2) (99.8%), IMP disodium salt hydrate (99%), and AMP disodium salt (99%) were purchased from Sigma-Aldrich. GMP disodium salt (98%), UMP disodium salt (99%) and CMP disodium salt (99%) were supplied by abcr. Chemicals were used as received. Water was deionized (DI) by a VWR Puranity PU 15 (VWR, Leuven, Germany). As multicomponent matrix sample First Infant Milk Kendamil powder (Kendamil Nutricare Ltd. Kendal, Great Britain) was used.

Apparatus and Experimental Setup. HT experiments were performed on a commercially available Agilent CE 7100 system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) operated by the OpenLAB CDS Chemstation Rev. C. 01.07 SR3. All measurements utilized bare fused silica capillaries (ID 50

μm , OD 360 μm) bought from MicroQuartz Munich (Munich, Germany) and ran at 25 °C. The background electrolyte (BGE) consisted of 40 mM taurine and 20 mM piperidine (pH 9.1, ionic strength (IS) 20 mM). Sample concentrations were either 1 μM or 10 μM diluted in BGE from nucleotide stock solutions of 10 mM in water. A dilution in BGE is essential to avoid any conductivity differences that cause variations in analyte velocities and consequently alters peak positions. Such temporal errors compromise the deconvolution. Data was collected at an acquisition rate of 5 Hz, 10 Hz, or 40 Hz. The detector wavelength was set to 260 nm with a bandwidth of 5 nm and referenced to 295 nm with a 10 nm bandwidth.

N-bit PRBS are derived from Hadamard matrices by means of a virtual shift register⁷¹ and are devised by the software mpXplorer also performing the inverse Hadamard transform for deconvolution. Elements “1” and “0” of the PRBS are translated into injection of sample and buffer, respectively, and were realized by vial exchange and voltage suspension. To space the elements in the capillary evenly, injections were followed by the application of voltage to progress the zones (cf. Figure 1). The time interval of that process is the modulation time Δt . Since modulation times were found to be irregular, accurate Δt was determined from intervals of EOF or analyte peaks fitted by the Gaussian or Haarioff–Van der Linde function (HVL), respectively. PRBS exceeding the capacity of the capillary were subdivided into shorter subsequences and measured successively. In between subsequences, the capillary was flushed with BGE. After the measurement of a complete sequence, buffer vials were replenished, and the capillary was conditioned. Collected data was subject to baseline correction, and subsequences were regrouped according to the corresponding PRBS using EOF or analyte peaks as marker times.

HT-CZE experiments were conducted in two different setups denoted as *setup I* and *setup II*. For *setup I/II* a capillary of 100/50 cm and 91.5/41.5 cm total and effective length, respectively, was used. Conditioning comprised sequential flushing with DI water (5/3 min), 0.1 M NaOH (10/5 min), DI water (5/3 min), and BGE (10/5 min). Separation was performed under constant voltage/current using 30 kV/13 μA . Electrokinetic injection and zone progression was executed with 30 kV/13 μA for 5/5 s and 20/10 s (Δt), respectively.

For the analysis of milk powder (*setup III*), a $\mu\text{SIL-FC}$ capillary (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with 64.5 cm total and 56 cm effective length was employed. Separation was performed in negative mode at $-13 \mu\text{A}$ constant current. Sample preparation followed published protocols.^{72,73} In short, 100 mg of milk powder was dissolved in 0.5 mL of BGE, and proteins as well as lipids were extracted with 0.5 mL of CH_2Cl_2 . For liquid separation, the sample was

centrifuged at 12000 rpm for 5 min. 30 μL of the aqueous phase was diluted to 500 μL using BGE and subjected to an ultracentrifuge filter of 3 kDa by Amicon Ultra (12000 rpm for 20 min). Peak assignments are based on spiking and mobility determination.

Software. Peakmaster 5.3 Complex was used to optimize electrophoretic separations.⁷⁴ Baseline corrections, peak and data fitting were performed in OriginPro 2017 SR2 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Analysis of electropherograms and SNR determinations were done in CEval 0.6 g-devel.⁷⁵ Simul 5 was employed to simulate electrophoretic separations in HT mode.⁷⁶ Microsoft Office Excel 2016 and Matlab R2016b (Mathworks, USA) were used to generate HT electropherograms of certain features. HT was performed by the in-house developed program mpXplorer written in Delphi (Embarcadero Technologies, South San Francisco, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

System Setup and Optimization. Seiman and co-workers⁶⁵ studied in their cross-correlation approach a system at a relatively high pH of 8.46 with a naturally strong EOF that they argued was subject to drifting. Resulting temporal errors in HT were deemed responsible for unsuccessful deconvolution outcomes. Inspired by their results and the effects observed, we investigated a system also set in a high pH regime where the EOF is difficult to control. Our set of analytes were (A,C,G,U)MP. Typical separation conditions for those nucleotides are an 8 mM phosphate buffer at pH 9.79 with 25 kV at 25 °C. With an analysis time of about 5 min, limits of detection (LOD) are 2–4 mg/L.⁷⁷

Starting from those conditions, we preoptimized the system using the Peakmaster 5.3 Complex software and tested the buffers of choice in single- and multiple-injection experiments. We observed that with most BGE compositions spikes appeared randomly in the electropherograms increasing in number with higher detection acquisition rates. Seiman and co-workers, also, reported on the occurrence of such interferences that likely are the result of inhomogeneities at the surface of the electrodes after repeated dipping in buffer vials. We solved that issue by choosing the BGE with the lowest abundance of spikes (taurine/piperidin 40/20 mM) and by employing a reference wavelength that, in addition, compensates for baseline drifts.

Initially driven to perform as many injections as possible depending on the length of the chosen *n*-bit sequences, we optimized the system toward the highest possible peak capacity.

This was achieved through increase to maximum voltage of 30 kV and choosing a capillary length of 100 cm (91.5 cm effective length). Separation time was around 17 min. This *setup 1* was characterized to have a peak capacity of 320 (based on AMP), theoretically allowing sequences of up to 8-bit (255 elements) to be performed. Due to restricted modulation time intervals, the real limit, however, was found to be 6-bit (63 elements). In order to realize higher PRBS, we, therefore, tested subdividing sequences into shorter subsequences (compare Table S1 in Supporting Information [SI]) and report, here, the first successful application of that approach in a multiplexing technique. After sequential measurement of those subsequences, the detector signal can be realigned to the respective positions of either analyte or EOF peaks. The resulting cut-together signal can be treated and deconvoluted like the original *n*-bit sequence of a higher length. This allows

us to realize sequences of up to 8-bit on an unmodified CE instrumentation. It shall be noted that this procedure requires data of the same quality. Significant EOF changes, unstable injections, or varying currents will create temporal inconsistencies that can cause correlation noise and compromise results.

Such discrepancy in velocities of zones also occurs when hydrodynamic injections are employed. When performing HT-CZE, PRBS elements “1” and “0” are translated into analyte and no-analyte or buffer injections, respectively. After introduction of the zones they need to be promoted in the capillary before a new zone can be injected (cf. Figure 1). If zone injection and progression are realized hydrodynamically, the zones injected first will be placed further away from the inlet than those introduced last. Hence, the effective length differs for each zone, resulting in uneven peak-to-peak time intervals of analytes. Yet, a way to utilize hydrodynamic injections in HT is to stop the separation before the first zone reaches the detector and pressure the zones out. We found this pressure-assisted approach, however, not useful, as the pressure application was neither stable nor repeatable and dispersion considerably minimized peak capacity.

Therefore, zone injection and progression were realized electrokinetically. Duration of injection was optimized to the lowest time value possible that still allowed for a high repeatability: 5 s with the present instrumentation. For zone progression, we chose a time interval that resulted in baseline separated peaks of consecutive zones of the same analyte. For *setup 1*, this was 20 s. In total, the modulation time meaning the interval between two consecutive PRBS elements or sample injections amounted to 25 s. However, we observed that Δt was significantly lower and not constant in experiments. On average, Δt was found to be around 16 s. We cannot give reasons for that time deficit. There are, though, particularities in the software control for injections that we speculate to be responsible for it. Injections are controlled and corrected by an internal algorithm of the software so that areas below the function of voltage/current against time are uniform. To achieve this, time intervals might be shortened by the software depending on the speed of current build up. Such adjustments could also be connected with the fact that electric field is applied in the form of a ramp. We found that this ramp is only active when vials change on the inlet position. Repeated voltage application in the same vial is not performed with a ramp. This, however, is the case when after the buffer injection (“0”) the zone progression step follows utilizing also a buffer filled vial. As a result, we could not realize the buffer injection and zone progression from the same buffer vial since “0” elements would have been repeatedly treated differently from PRBS elements “1” that require a vial exchange and experience the voltage ramp (see Figure 1). Besides those proposed technical reasons for the time deficit, we observed that Δt is, also, dependent on the EOF.

Repeatability. Multiplexing methods are based on the modulation of a repeatedly introduced input signal of constant quality. Even though there are procedures to analyze convoluted data from varying information as well,⁶⁸ in its general application HT requires uniform peak features (area, height, full width at half-maximum [fwhm]) and constant time differences between PRBS elements. Therefore, we performed a repeatability assay by measuring a given sequence of 53 elements as a quintuplet to assess the quality of the data to be used in HT. The results are shown in Figure 2. Electrophero-

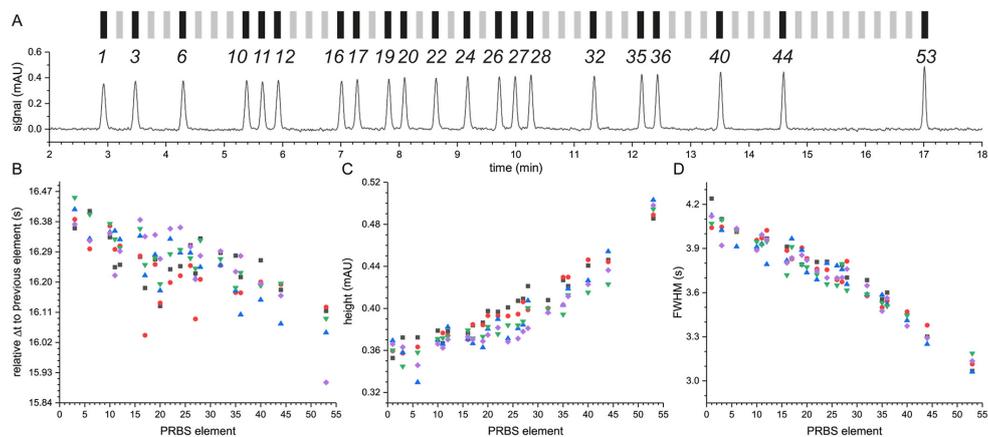


Figure 2. Repeatability assay. A defined sequence (cf. Figure S1 in the SI) was measured as a quintuplet. Black bars denote sample injections (here: AMP); gray bars symbolize BGE injections. Each color codes for one experiment. (A) Electropherogram with denoted PRBS elements of peaks; *setup I* and data acquisition rate 5 Hz. (B) Δt for each PRBS element. Values for (C) peak heights and (D) fwhm.

grams can be found in Figure S1 in the SI. Even though we observed an increase in the EOF (cf. Figure S1 in SI), we found that linear regression of migration times as a function of PRBS elements gave excellent coefficients of determination R^2 (cf. Figure S2 and Table S2 in the SI), conveying a high degree of uniformity. Slopes of functions (equaling Δt) were determined to be on average (16.2504 ± 0.0075) s. However, when we compared the modulation time of each consecutive element “1” corrected by the number of buffer injections that preceded, a decreasing trend became apparent (Figure 2B) that in total amounts to a change of 0.3 s for Δt . In contrast to the results of linear regression, that deviation signifies temporal inconsistency.

Further, we observed that peak heights are decreasing and fwhm are increasing over the course of a PRBS (Figure 2C and 2D) which added up to the dissatisfactory quality of the data. We ascribed these changes to diffusion dispersion occurring when injected zones experience voltage suspensions. Zones introduced into the capillary first experience voltage suspensions more often and can diffuse more than those injected last. The gradual course is a sign of the additive nature of this effect. In order to confirm that the observed inconsistencies of peak features are caused by diffusion and, further, to examine if injected zones influence the electric field strength and, consequently, change the velocity of following zones, we performed simulations of a 4-bit sequence using the software Simul 5 (see Figure S3 in the SI). Our simulations show that, due to voltage suspensions during vial exchange, zones are subject to diffusion dispersion to an extent dependent on the number of electricity breaks they encounter. As a result, zones injected later are higher and sharper. A vial handler that operates faster would, consequently, minimize such inconsistencies in peak forms. In the case of influences of zones on the electric field, we did not find any indications for mutual dependencies as is manifested in the constant Δt values observed.

We, therefore, concluded that HT-CZE needs to be realized in fast separations when temporal deviations become

irrelevantly small compared to Δt . As a result, we changed the setup to a capillary of half the length and one-third the separation time in which peaks are sharper and the diffusion dispersion is less prominent (*setup II*). However, the peak capacity is smaller. With our approach of subdividing longer PRBS into shorter subsequences, peak capacity was not a limiting factor. We, also, changed the CE mode from constant voltage to constant current to ensure ion velocities to remain precisely uniform.

Influence of the EOF. As mentioned before, programmed and observed modulation time Δt were found to be different. We, therefore, routinely determined the modulation time from analyte peak intervals. In theory, the modulation time should be independent of which analyte peak is used for its determination. However, when we chose to use DMSO as EOF and Δt marker, we found that peak intervals differed depending on the analyte as reference. We, hence, analyzed the peak intervals Δt for DMSO, AMP, and UMP in a mixture sample.

Results for a triplicate study are shown in Table 1. The determined Δt values exhibit significant differences. Such a

Table 1. Modulation Time Δt Determined from the Peak Distance of Respective Analytes of a 4-Bit Sequence

| # | $\Delta t(\text{EOF})$ [s] | $\Delta t(\text{AMP})$ [s] | $\Delta t(\text{UMP})$ [s] |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 6.714 ± 0.007 | 6.987 ± 0.028 | 7.169 ± 0.056 |
| 2 | 6.724 ± 0.008 | 6.983 ± 0.024 | 7.195 ± 0.070 |
| 3 | 6.719 ± 0.007 | 6.963 ± 0.009 | 7.062 ± 0.019 |

divergence can only be explained by a changing EOF mobility over elements in PRBS. We determined the average EOF mobility that a zone encounters throughout the HT-CZE measurement by using the dependency of EOF mobility and EOF-analyte time interval as expressed in eq 1:

$$\mu_{\text{EOF}} = -\frac{\mu_{\text{XMP}}}{2} + \sqrt{\frac{\mu_{\text{XMP}}^2}{4} - \frac{t_{\text{capillary}}^{\text{detector}}}{(t_{\text{XMP}} - t_{\text{EOF}})U}} \mu_{\text{XMP}} \quad (1)$$

An exemplary experiment and the results of that study are depicted in Figure 3. Experiments were done in triplicate. Our

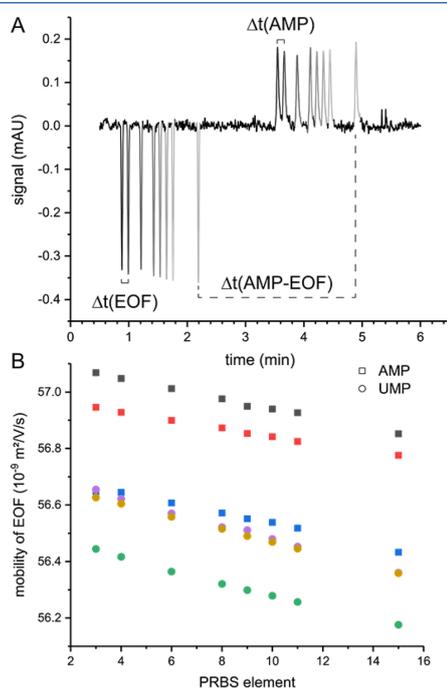


Figure 3. Analysis of EOF changes during injection of a 4-bit sequence (*setup II*) with DMSO as EOF marker. AMP/UMF concentration: 10 μM. (A) Representative electropherogram with only AMP as analyte. Shades of gray indicate pairs of matching EOF and analyte peak. (B) Gradual decrease of EOF mobility in dependence of sequence element. Triplicates are color coded.

investigation confirms that each zone experiences an overall different average EOF during HT-CZE measurements on the order of 0.2 units. As a result, average velocities of analytes change and with that the peak intervals. This not only affects the modulation time Δt to be different for each analyte but it also causes temporal discrepancies with peak-to-peak intervals of unlike analytes (cf. Figure S4 in the SI). Therefore, it must be highlighted that with standard CE equipment HT-CZE with samples of more than one analyte will always give less good results than when only one analyte is employed. There are more temporal errors to accumulate that will inflict correlation noise in the inverse HT. This suggests why there were no SNR improvements achieved for more than one analyte in previously reported work.⁶¹ In a system, though, where EOF is monitored and separation is achieved fast and with sharp peaks, the deleterious effects of EOF fluctuations can be kept small. In the case of varying Δt values, the experimenter should choose the modulation time interval for deconvolution that corresponds to the analyte with the highest intensity as correlation noise scales with signal height.

As another result of the variable modulation times Δt , it becomes essential to either measure the HT electropherograms at a detector acquisition rate of at least 100 Hz or interpolate the data to the mentioned frequency. That is because the product of the frequency of the recorded data and Δt —the sum of the data points of each PRBS element—always must be an integer. To account for two decimals in Δt , it is, therefore, necessary to increase the number of data points to at least 100 Hz.

The significance of this effect is exemplified in Figure S5 in the SI. As in Agilent instrumentation the adjustment of the sampling frequency is realized by smoothing of the data according to a centered moving average with Gaussian weights, noise can be reduced or enhanced by choosing lower or higher response times, respectively.⁷⁸ It is, therefore, recommended to measure the electropherograms at default or the user's preferential response time and interpolate the data afterward to 100 Hz. This way the data quality is not compromised. A Matlab script for that purpose can be found in the SI.

Realization of HT Approach. With the understanding of the effects during voltage suspension and the approach of

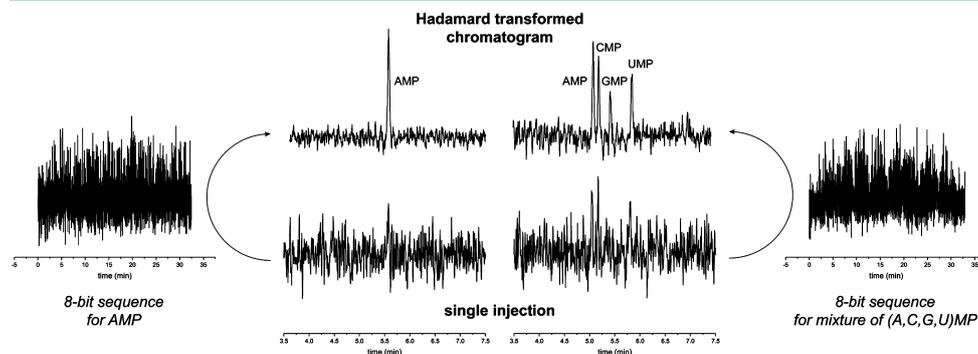


Figure 4. Realization of HT-CZE employing an 8-bit sequence for two samples consisting either of AMP (left half) or the mixture of the four nucleotides (A,C,G,U)MP (right half and in order of migration time). Measurements were performed with *setup II* and a data acquisition rate of 10 Hz. Concentrations of nucleotides were 1 μM or approximately 0.4 mg/L.

dividing PRBS into subsequences, we successfully realized the HT in CZE performing PRBS of up to 8-bit for two samples consisting of either AMP as analyte or the mixture of the four RNA nucleotides (A,C,G,U)MP (Figure 4).

In the performed HT-CZE measurements, concentrations of the nucleotides were 1 μM or about 0.4 mg/L and, thus, about 5 to 10 times lower than the LOD of the standard CE separation method.⁷⁷ Comparison of the electropherograms of the single injection and HT result shows the considerable gain in SNR that can be achieved. All analytes become detectable. However, it is also apparent that the attained enhancement in sensitivity differs for the one-analyte-only (I) and mixture (II) system. As discussed before, fluctuations of the EOF affect systems with a greater number of analytes to a higher extent leading to more temporal discrepancies and, consequently, reducing the quality of the inverse HT. Therefore, the SNR of AMP in system I was found to be 3.9, whereas in system II only 2.9 was achieved. SNR obtained for CMP, GMP, and UMP are 2.6, 1.5, and 2.2. In order to evaluate the quality of the transformation, we, also, determined the factor of enhancement G_{HT} which is defined as the fraction of the SNR of the HT and of the single injection. In the case of an 8-bit sequence, the theoretical maximum of G_{HT} is 8.0. Since the SNR of the single injections is below 1 in our experiments and cannot be determined with accuracy, we simulated HT experiments with optimized peak parameters and without temporal errors so that the outcome of their inverse HT can be treated as the theoretically best result. When comparing simulated and experimental data in relation to one another, G_{HT} becomes accessible. Detailed information and electropherograms can be found in the SI (Matlab Script and Figure S6). With this approach, we evaluated G_{HT} to be approximately 6.9 and 5.2 for the systems I and II, respectively. We assign the adverse effects of EOF fluctuations and dispersion by voltage suspension to be responsible for loss in G_{HT} . We, further, showed that peak features such as shape are not impaired by our approach. Also, relative signal intensities of the four analytes match those of single injections of higher concentration (cf. Figure S7A in the SI). The observable differences in the intensities for the four nucleotides are believed to be connected to the purity of the purchased chemicals, especially in the case of GMP, and different diffusion coefficients resulting in uneven fwhm and heights.

Multicomponent Matrices. In order to demonstrate the applicability of our HT approach, we investigated an infant milk powder sample for the presence of nucleotides. Since such a complex sample comes with a multicomponent matrix, we changed our initial experimental setup. Instead of using a bare fused silica capillary in positive mode, we employed a fluorocarbon coated capillary in negative mode providing a naturally smaller and more stable EOF suitable for biological samples. Detailed information on the multicomponent *setup III* are given in the experimental section. In preliminary investigations, we observed that a concentrated sample causes unequal but reproducible modulation time intervals Δt depending on the number of buffer injections (PRBS elements "0") in front of the sample zone. An exemplary HT electropherogram and determined Δt are given in the Supporting Information (Figure S8 and Table S3). This effect can be explained by the change of conductivity induced by the matrix.

Matrix molecules can either increase or decrease the conductivity of the sample depending on their physicochemical

characteristics resulting in a decreased or increased local electric field, respectively. Consequently, velocities of the analytes differ and cause temporal inaccuracies in the final peak positions. Inverse HT will eventually lead to errors manifesting in additional noise. However, this effect wears off in diluted samples where the conductive influence of the matrix becomes small. If the matrix effect cannot be subdued, a reproducible HT result cannot be expected. Figure 5 shows the result of a

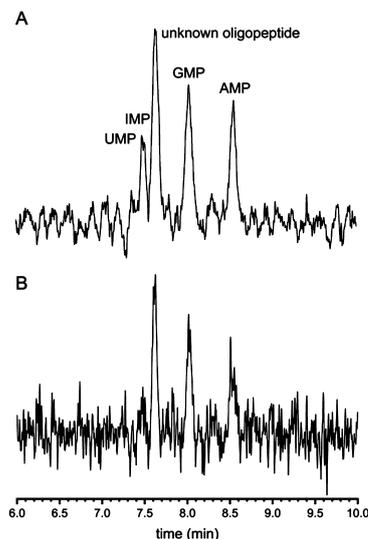


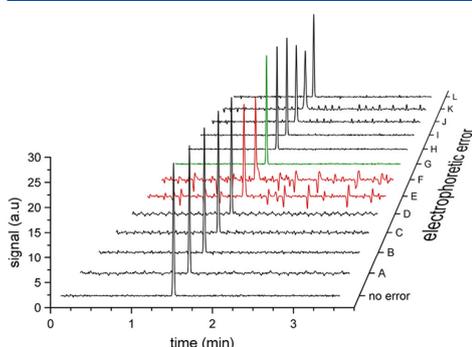
Figure 5. CZE separation of nucleotides in a milk sample. (A) Deconvoluted 8-bit HT measurement performed under *setup III*. (B) Single injection of sample under the same conditions.

single injection and 8-bit HT measurement obtained for an infant milk sample pretreated according to a standard protocol. In the single injection electropherogram (cf. Figure 5B) three peaks of very low intensity are detected corresponding to an unknown compound (likely oligopeptide) and (G,A)MP. In the HT electropherogram, not only the intensity of the peaks is improved considerably but also two overlapping peaks for UMP and IMP become detectable. However, it can be noted that the baseline contains distinct short-term noise which likely is caused by temporal inaccuracy as a result of conductivity fluctuations through the matrix. It shall be highlighted that under HT conditions the resolution of the separation is conserved as peak shapes and relative intensity match the single injection electropherogram.

Effects of Electrophoretic Errors on HT-CZE. We verified that the realization of HT by vial exchange and voltage suspension comes with EOF inconsistencies and discriminative diffusion dispersion. We were, moreover, interested in to what extent individual electrophoretic errors impair the results of the deconvolution process to identify the most significant parameters. For that purpose, we simulated electropherograms of a 7-bit sequence in Matlab with distinct adverse features and after inverse HT compared the resulting G_{HT} . Studied errors and the results are given in Table 2 and

Table 2. Signal Enhancements G_{HT} for Electrophoretic Errors in a 7-Bit Sequence (theoretic maximum 5.7)

| # | Electrophoretic error | G_{HT} |
|---|--|----------|
| A | One peak missing | 2.8 |
| B | One peak shifted by 0.5 s | 3.6 |
| C | One peak shifted by 1.0 s | 2.5 |
| D | One peak shifted by 3.0 s | 2.1 |
| E | One subsequence with $\Delta t + 0.05$ s | 0.6 |
| F | One subsequence with $\Delta t + 0.10$ s | 0.5 |
| G | Areas with RSD of 0.25% | 5.7 |
| H | Areas with RSD of 2.50% | 5.4 |
| I | Diffusion dispersion: additive 0.1% | 5.0 |
| J | Diffusion dispersion: additive 0.5% | 2.1 |
| K | Diffusion dispersion: additive 1.0% | 1.1 |
| L | Diffusion dispersion: additive 1.0% but divided up into 4 subsequences | 3.6 |

Figure 6. For entries I–L, additive value % refers to the discriminative diffusion dispersion where each consecutive**Figure 6.** Effect of electrophoretic errors on HT for a 7-bit sequence. (A) One peak missing. One peak shifted by (B) 0.5 s, (C) 1.0 s, or (D) 3.0 s. A higher modulation time Δt for one subsequence by (E) 0.05 s or (F) 0.1 s. Areas with RSD of (G) 0.25% or (H) 2.50%. Diffusion dispersion for each zone additively by a factor of (I) 0.1%, (J) 0.5%, and (K) 1%. (L) K but divided into 4 subsequences.

peak is broader than its predecessor by the given value. Figure S9 in the [Supporting Information](#), additionally, provides comparative results of the same simulations, but without background noise to allow an unadulterated look on the effect of the errors on the HT.

This study allowed us to identify that temporal errors such as missing or shifted peak(s) have the strongest influence on the quality of the inverse HT, whereas fluctuations in areas (see entry G and H in [Table 2](#)) as through injection instabilities are neglectable. The most deleterious effect is caused by a subsequence with a marginally altered Δt even to the extent of worsening the initial SNR (see [Table 2](#) entry E and F). Therefore, it must be ensured that subsequences are run under the same conditions. We found conditioning of the capillary with BGE to be sufficient for that. Usage of NaOH flushes were disadvantageous as the capillary's surface chemistry and the EOF mobility were altered. Comparison of entries K and L of [Table 2](#) shows that the approach of subdividing PRBS is beneficial as it lessens the effects of the

inherent diffusion during vial exchange and voltage suspension. As diffusion dispersion works additively in this setup, longer PRBS accumulate more deviations in peak parameters than shorter ones.

Benefits and Limitations. Our study on the effects of electrophoretic errors in the HT approach has shown that one of the weaknesses of multiplexing lies with the prerequisite of stable and reproducible runs. Conductivity deviations as through concentrated samples, multicomponent matrices, or buffer mismatches will lead to temporal shifts of peak intervals and impair the deconvolution result. HT is, thus, limited to samples of dilute analytes. As a result of the demand for conductive uniformity, it is presently not feasible to perform HT under stacking conditions. This attenuates the advantage of multiplexing techniques to be a third orthogonal strategy in sensitivity enhancement besides preconcentration strategies and hardware modifications. As HT is only a mathematical principle applied to chromatographic runs, it naturally comes with the benefit that it is independent of the physicochemical properties of the analytes. HT inherently will not invoke any bias toward the analytes and, therefore, is generally applicable in contrast to detectors or extraction protocols that are only suitable for a distinct kind of molecules. It, also, does not influence resolution or peak features (width, height, and symmetry) unlike stacking and averaging. The latter, specifically, is inapt to be used in CE at all, as achieving a high number of consecutive runs with conserved migration times is unattainable.⁷⁹ Figure S7 in the SI visualizes the corrupt results obtained when averaging 50 consecutive electrophoretic runs for the separation of the nucleotide standard mix. HT, on the other hand, increases the total run time in comparison to other strategies for enhancement. In the present study, the run time is prolonged by a factor of 8. It, also comes with additional computational time. However, the total time needed for injections could be eventually reduced with the new types of vial handler or injection strategies. In general, implementation of HT in standard instrumentation currently lacks convenience as injection patterns have to be programmed manually and additional data treatment after the HT sequence is required. That is why we are focused on developing an integrated software that will not only automatically perform the realignment of subsequences but that will also correct for positioning deviations in the electropherogram. Such an adaptive algorithm for the correction of the correlated PRBS is under development to allow for a further robust software implementation of HT.

CONCLUSION

In the present contribution, we established a methodology to successfully realize HT on commercially available and unmodified CE equipment with a diode array detector (DAD). This allows users of our approach to obtain electropherograms in a CZE separation with enhanced SNR independently of additional equipment. PRBS of sample and BGE injections were realized by vial exchange at the inlet port while the system was allowed to experience voltage interruptions. We showed that this approach intrinsically triggers EOF fluctuations and a discriminative diffusion dispersion. In order to attenuate resulting irregularities in shape and migration times of peaks as well as to realize PRBS exceeding peak capacity, we introduced the approach of subdividing sequences into shorter subsequences that were measured consecutively and reassembled based on EOF

marker or analyte peaks. With that strategy, we deconvoluted PRBS of up to 8-bit for a system of either AMP or (A,C,G,U)MP achieving enhancements in signal intensities of 6.9 and 5.2, respectively (8.0 theoretical maximum). Our approach, thus, allows for a robust and safe detection of analytes below the LOD of conventional CE techniques without the need for additional hardware or preconcentration strategies. We, also, showed the applicability of our approach in the detection of nucleotides in milk. Furthermore, we identified temporal shifts of individual peaks and of modulation time intervals of subsequences to be the most influential errors to corrupt the deconvolution result. With this information and discussed prerequisites such as required data frequency, we contribute to the straightforward application of our method in standard laboratories. This way, CE users are offered an alternative, inexpensive, and hardware-free option to lower their LODs using the instrumentation they already have.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.8b01010.

Supplementary figures, tables and Matlab scripts (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: oliver.trapp@cup.uni-muenchen.de.

ORCID

Oliver Trapp: 0000-0002-3594-5181

Present Address

§Charles University, Faculty of Science, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Hlavova 8, 128 40 Prague 2, CZE.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Generous financial support by the Max-Planck-Society is gratefully acknowledged. S.P. thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a Ph.D. fellowship. The authors thank Dr. Vlastimil Hruska, Agilent Technologies, Germany, for helpful discussions.

■ REFERENCES

- (1) Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary electrophoresis: principles and practice*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (2) Grossman, P. D.; Colburn, J. C. *Capillary electrophoresis: Theory and practice*; Academic Press, 2012.
- (3) Seiman, A.; Kaljurand, M.; Ebber, A. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *589*, 71–75.
- (4) Chervet, J. P.; Van Soest, R. E. J.; Ursem, M. J. *Chromatogr. A* **1991**, *543*, 439–449.
- (5) Xue, Y.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3575–3580.
- (6) Tsuda, T.; Sweedler, J. V.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2149–2152.
- (7) Wallingford, R. A.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1762–1766.
- (8) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1298–1302.
- (9) Gassmann, E.; Kuo, J. E.; Zare, R. N. *Science* **1985**, *230*, 813–814.
- (10) Beckers, J. L.; Bocek, P. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2747–2767.
- (11) Urbanek, M.; Krivankova, L.; Bocek, P. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 466–485.
- (12) Mikuš, P.; Maráková, K.; Marák, J.; Planková, A.; Valášková, L.; Havránek, E. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4561–4567.
- (13) Mikuš, P.; Veizerová, L.; Piešťanský, J.; Maráková, K.; Havránek, E. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 1223–1231.
- (14) Piešťanský, J.; Maráková, K.; Veizerová, L.; Galba, J.; Mikuš, P. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *826*, 84–93.
- (15) Griffiths, P. R. *Transform Techniques in Chemistry*; 1978.
- (16) Marshall, A. G. *Fourier, Hadamard, and Hilbert Transforms in Chemistry*; 1982.
- (17) Smith, H. C. *Chromatographia* **1970**, *3*, 515.
- (18) Annino, R.; Bullock, L. E. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1211–1227.
- (19) Kaljurand, M.; Koel, M.; Küllik, E. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *239*, 317.
- (20) Kaljurand, M.; Küllik, E. J. *Chromatogr.* **1979**, *171*, 243.
- (21) Valentin, J. R.; Carle, G. C.; Phillips, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1035.
- (22) Villalanti, D. C.; Burke, M. F.; Phillips, J. B. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 2222–2225.
- (23) Engelsma, M.; Kok, W. T.; Smit, H. C. J. *Chromatogr.* **1990**, *506*, 201–210.
- (24) Kaljurand, M.; Urbas, E.; Haldna, U. *Chromatographia* **1992**, *34*, 417–420.
- (25) Laeven, J. M.; Smit, H. C.; Kraak, J. C. *Anal. Chim. Acta* **1983**, *150*, 253.
- (26) Lub, T. T.; Smith, H. C.; Poppe, H. J. *Chromatogr.* **1978**, *149*, 721–733.
- (27) Mars, C.; Smit, H. C. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *228*, 193.
- (28) Smit, H. C.; Lub, T. T.; Vloon, W. J. *Anal. Chim. Acta* **1980**, *122*, 267.
- (29) Clowers, B. H.; Siems, W. F.; Hill, H. H.; Massick, S. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 44.
- (30) Szumlas, A. W.; Ray, S. J.; Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4474–4481.
- (31) Brock, A.; Rodriguez, N.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3735.
- (32) Fernández, F. M.; Vadillo, J. M.; Kimmel, J. R.; Wetterhall, M.; Markides, K.; Rodriguez, N.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1611.
- (33) Trapp, O.; Kimmel, J. R.; Yoon, O. K.; Zuleta, I. A.; Fernandez, F. M.; Zare, R. N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6541.
- (34) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282.
- (35) Kimmel, J. R.; Yoon, O. K.; Zuleta, I. A.; Trapp, O.; Zare, R. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1117–1130.
- (36) Cheng, C. C.; Chang, H. W.; Uchimura, T.; Imasaka, T.; Kaneta, T.; Lin, C. H. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 626.
- (37) Cheng, Y. K.; Lin, C. H.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, S274.
- (38) Cheng, Y. K.; Lin, C. H.; Kuo, S.; Yang, J.; Hsiung, S. Y.; Wang, J. L. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1220*, 143.
- (39) Fan, G. T.; Yang, C. L.; Lin, C. H.; Chen, C. C.; Shih, C. H. *Talanta* **2014**, *120*, 386.
- (40) Fan, Z.; Lin, C. H.; Chang, H. W.; Kaneta, T.; Lin, C. H. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 755.
- (41) Lin, C. H.; Kaneta, T.; Chen, H. M.; Chen, W. X.; Chang, H. W.; Liu, J. T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5755.
- (42) Annino, R.; Grushka, E. J. *Chromatogr. Sci.* **1976**, *14*, 265.
- (43) Fister, J. C.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4460.
- (44) Laeven, J. M.; Smit, H. C.; Kraak, J. C. *Anal. Chim. Acta* **1987**, *194*, 11–24.
- (45) Phillips, J. B.; Burke, M. F. *J. Chromatogr. Sci.* **1976**, *14*, 495.
- (46) Wong, J. W. H.; Durante, C.; Cartwright, H. M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5655.
- (47) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4421–4425.
- (48) Braun, K. L.; Hapuarachchi, S.; Fernandez, F. M.; Aspinwall, C. A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1628–1635.

- (49) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 328–334.
- (50) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*.
- (51) Hata, K.; Kichise, Y.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1765–1768.
- (52) Fister, J. C.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4460–4464.
- (53) Guichard, R.; Schwarz, M. A. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3151–3159.
- (54) McReynolds, J. A.; Gao, L.; Barber-Singh, J.; Shippy, S. A. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 128–136.
- (55) Kuldvee, R.; Kaljurand, M.; Smit, H. C. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 169–174.
- (56) van der Moolen, J. N.; Louwerse, D. J.; Poppe, H.; Smit, H. C. *Chromatographia* **1995**, *40*, 368.
- (57) van der Moolen, J. N.; Poppe, H.; Smit, H. C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4220.
- (58) Braun, K. L.; Hapuarachchi, S.; Fernandez, F. M.; Aspinwall, C. A. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3115–3121.
- (59) Kaneta, T.; Kosai, K.; Imasaka, T. *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 1659–1661.
- (60) Kaneta, T.; Yamaguchi, Y.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5444–5446.
- (61) Kaneta, T.; Kosai, K.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2257–2260.
- (62) Kaneta, T.; Kosai, K.; Imasaka, T. *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 1659–1661.
- (63) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 178–182.
- (64) Gao, L.; Patterson, E. E., II; Shippy, S. A. *Analyst* **2006**, *131*, 222–228.
- (65) Seiman, A.; Reijenga, J. C. *Procedia Chem.* **2010**, *2*, 59–66.
- (66) Trapp, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5609.
- (67) Trapp, O. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6640.
- (68) Siegle, A. F.; Trapp, O. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 3839–3844.
- (69) Siegle, A. F.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11932–11934.
- (70) Siegle, A. F.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10828–10833.
- (71) Harwit, M.; Sloane, N. J. A. *Hadamard Transform Optics*; 1979.
- (72) Klampfl, C. W.; Andersen, L.; Haunschild, M.; Himmelsbach, M.; Buchberger, W. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1743–1746.
- (73) Xiao, G.; Xiao, H.; Zhu, Y.; You, Y. *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *94*, 591–602.
- (74) Jaros, M.; Hruska, V.; Stedry, M.; Zuskova, I.; Gas, B. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3080–3085.
- (75) Dubsky, P.; Ordogova, M.; Maly, M.; Riesova, M. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1445*, 158–165.
- (76) Hruska, V.; Jaros, M.; Gas, B. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 984–991.
- (77) Chen, X. J.; Yang, F. Q.; Wang, Y. T.; Li, S. P. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2092–2105.
- (78) Wahab, M. F.; Dasgupta, P. K.; Kadjo, A. F.; Armstrong, D. W. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *907*, 31–44.
- (79) Zawatzky, K.; Lin, M.; Schafer, W.; Mao, B.; Trapp, O.; Welch, C. J. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1465*, 205–210.

Supporting Information

Direct Hadamard Transform Capillary Zone Electrophoresis without Instrumental Modifications

Sebastian Pallmann, Alexander F. Stegle, Jana Šteflová (née Svobodová), and Oliver Trapp*

Ludwig-Maximilian University Munich, Faculty for Chemistry and Pharmacy, Butenandtstr. 5-13,
81377 Munich, Germany

*Corresponding author: oliver.trapp@cup.uni-muenchen.de

Table of contents:

| | |
|------|---|
| S-2 | Table S1. Subsequences for 8-bit PRBS. |
| S-2 | Figure S1. Quintuplet of repeatability study of a defined subsequence. |
| S-3 | Figure S2. Linear regression of migration times dependent on respective PRBS elements of quintuplet measurement. |
| S-3 | Table S2. Data on linear regression of migration times dependent on respective PRBS elements of quintuplet measurement. |
| S-4 | Figure S3. Effect of diffusion dispersion during vial exchange on peak features. |
| S-4 | Figure S4. Change of EOF over 50 measurements and dependence of time differences between respective nucleotides on EOF mobility. |
| S-5 | Figure S5. Significance of acquisition rate. |
| S-5 | Matlab Script for interpolating chromatographic data from a given frequency to any desired frequency. |
| S-6 | Matlab Script for simulating electropherograms with gaussian shaped peaks and white noise background. |
| S-9 | Figure S6. Comparison of simulated and experimental data for determination of enhancement factor G_{HT} . |
| S-10 | Figure S7. Single injection of concentrated nucleotide standard mix and comparison of the results for averaging approach over 50 measurements. |
| S-11 | Figure S8. Matrix effect for 4-bit sequence of concentrated milk sample. |
| S-12 | Figure S9. Deconvoluted electropherograms of simulated measurements with specific errors. |
| S-13 | Guide on how to apply HT to CZE. |

Table S1. Subsequences for an 8-bit PBRS. Sequence was cut in 8 parts of equal size matching the peak capacity of *setup II*.

| Part | Sequence |
|------|----------------------------------|
| 1 | 00011100010010111000000110010010 |
| 2 | 01101110010000010101101101011001 |
| 3 | 01100001111101101111010111010001 |
| 4 | 00001101100011110011100110001011 |
| 5 | 01001000101001010100111011101100 |
| 6 | 11110111111010011001101010001100 |
| 7 | 00011101010101111100101000010011 |
| 8 | 1111110000101111000110100000001 |

Figure S1. Quintuplet of repeatability study performing the sequence: 10100100011100011011010101110001001100010001000000001. Measurements were conducted with the experimental *setup I*. Data acquisition rate was 5 Hz. The clear shift of migration time is caused by increasing EOF mobilities.

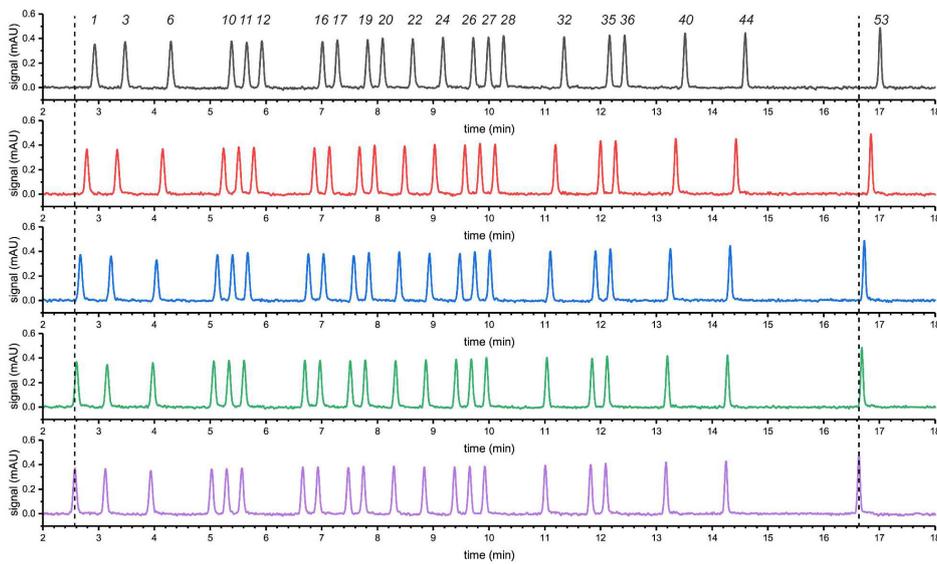


Figure S2. Linear regression of migration times dependent on respective PRBS elements of quintuplet measurement for repeatability study depicted in Figure S1. Regression was performed in OriginPro 2017.

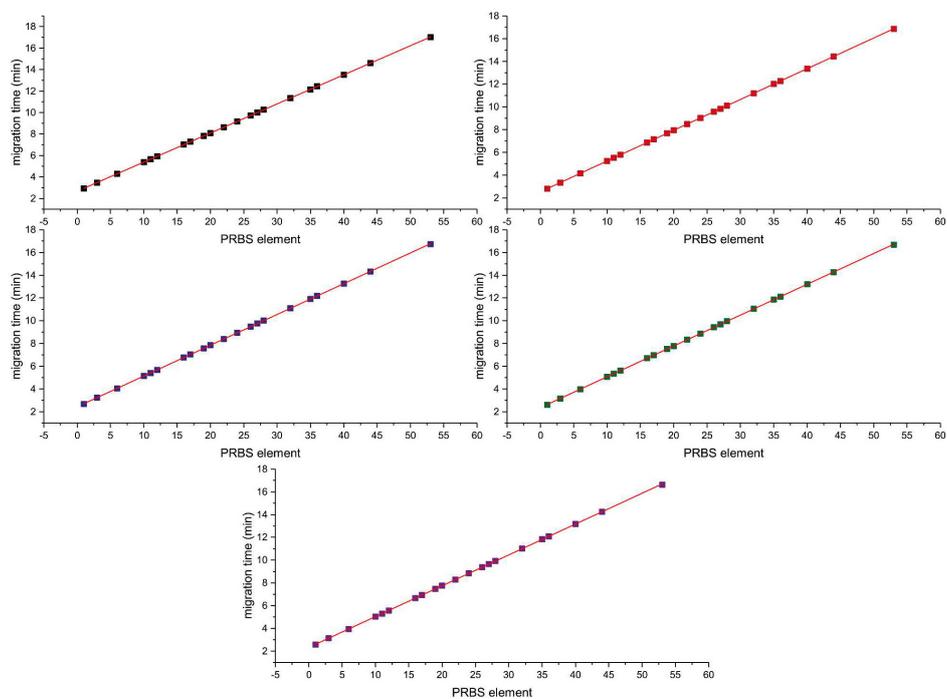


Table S2. Data on linear regression of migration times dependent on respective PRBS elements of quintuplet measurement for repeatability study depicted in Figure S1.

| Measurement Identifier | Slope [s] | Error of Slope [s] | R ² of Linear Regression |
|------------------------|-----------|--------------------|-------------------------------------|
| black | 16.257 | 0.007 | 1 |
| red | 16.223 | 0.007 | 1 |
| blue | 16.240 | 0.013 | 0.99999 |
| green | 16.264 | 0.011 | 0.99999 |
| violet | 16.268 | 0.016 | 0.99998 |

Figure S3. Effect of diffusion dispersion during vial exchange on peak features. A) Simulation of a 4-bit sequence with $\mu(\text{EOF}) = 60.515 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}/\text{s}$, $\Delta t = 16 \text{ s}$ (5 s injection; 11 s zone progression) and $t(\text{Diffusion}) = 10 \text{ s}$ in between vials. Peaks are denoted by their respective PRBS element. Normalized B) heights, C) FWHM and D) relative Δt values.

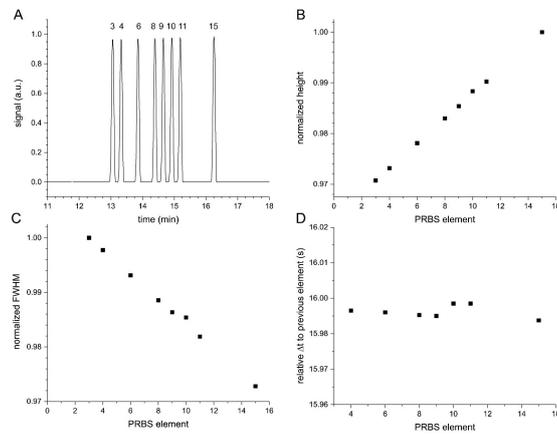


Figure S4. Change of EOF over 50 measurements in *setup 1* and dependence of time differences between respective nucleotides on EOF mobility. Data acquisition rate was 40 Hz. Migration order: AMP, CMP, GMP, UMP. A shifting EOF does not only adversely affect the time difference of same-analyte peaks in a multiplexing experiment (cf. Figure 2 in manuscript) but also causes an alteration in different-analyte peak distances. The further analyte peaks are set out from each other, the stronger their time difference is corrupted by EOF changes. Compare slopes of $\Delta t(\text{AMP-CMP})$ and $\Delta t(\text{AMP-UMP})$. Consequently, samples of higher complexity inherently accumulate more temporal discrepancies.

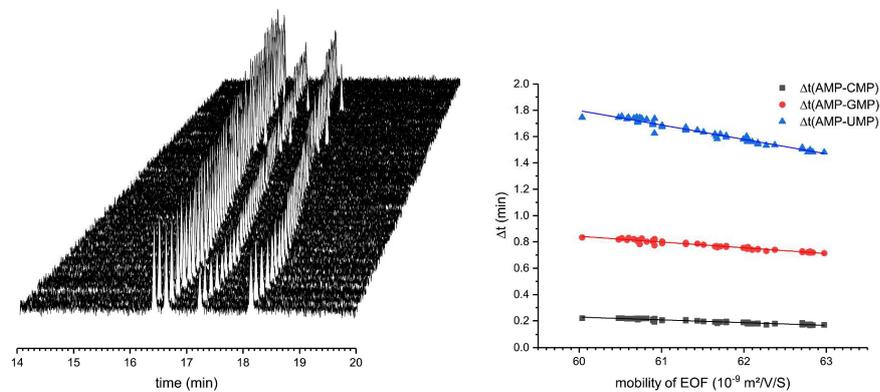
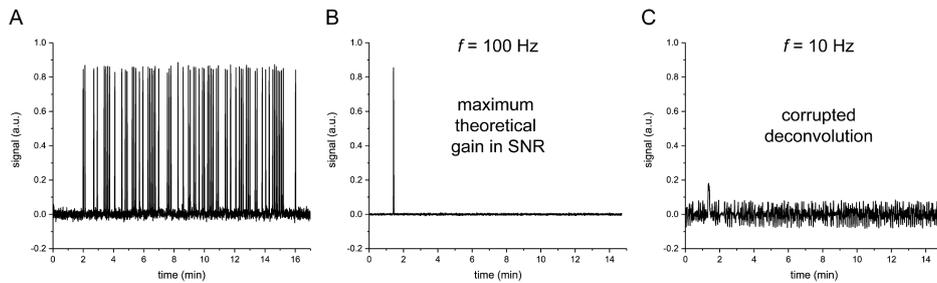


Figure S5. Significance of acquisition rate. In order to properly correlate an electropherogram of a specific number of data points with a PRBS of a defined modulation interval, the product of data acquisition rate f and modulation time Δt has to be an integer. If it is not, the value can be rounded computationally but corresponds then to a different Δt and results in correlation noise. A) Simulated 7-bit sequence with $\Delta t = 6.95$. B) Deconvoluted when $f \cdot \Delta t = 100 \text{ Hz} \cdot 6.95 \text{ s} = 695$. C) Deconvoluted when $f \cdot \Delta t = 10 \text{ Hz} \cdot 6.95 \text{ s} = 69.5 \approx 70$ and corresponding to $\Delta t = 7.00 \text{ s}$.



Matlab Script for interpolating chromatographic data from a given frequency to any desired frequency.

Input Parameters:

- f - desired frequency [Hz]
- a - start time of electropherogram [min]
- b - end time of electropherogram [min]

Code:

```
format long;
f = 100;
a = 0;
b = 60;
Data = load('DATAFILE.csv');
x=Data(:,1);
v=Data(:,2);
xq=a:1/(f*60):b;
xq2=xq';
vq=interp1(x,v,xq2,'spline');
finaldata=[xq2 vq];
dlmwrite('NEW-DATAFILE.csv',finaldata,'precision',%.10f);
```

Matlab Script for simulating electropherograms with gaussian shaped peaks and white noise background.

The code allows to create gaussian shape peak profiles according to the input parameters "position", "area" and "FWHM" for each peak with and without white background noise of adjustable strength. As a result of the fact that peaks could be satisfyingly characterized with a Gaussian profile in the given separation, the more complex and accurate Haarhoff-Van der Linde function (HVL) was not used for simulation. It is highlighted, though, that HT is independent on the input function. HVL functions will be deconvoluted to HVL functions. Typical values for a 7-bit sequence are used in the given code.

Input Parameters:

| | | |
|------------|---|--|
| k, l, m | - | line number of input file with the data for position (k), width (l) and area (m) of peaks [] |
| bit | - | desired sequence length [] |
| h | - | number of analytes in system [] |
| f1 | - | frequency of data points on time axis [Hz] |
| tmax | - | maximum time value of time axis [min] |
| db | - | noise value for background [] |
| f | - | desired frequency of data points of final interpolated electropherogram [Hz] |
| y_A | - | minimum y value for plotting [min] |
| y_B | - | maximum y value for plotting [min] |
| name_data | - | name for final data with background [] |
| name_data2 | - | name for final data without background [] |

Code:

```
format long;
import = 'DATAFILE.csv';
k = 0;
l = 1;
m = 2;
bit = 7;
h = 4;
f1 = 3;
tmax = 17;
db = -43;
```

```
f = 100;
y_A = -0.05;
y_B = 0.5;
name_data = 'name.csv';
name_data2 = 'name.csv';
t = 0:1/(f*60):tmax;
n = (2^bit)/2;
mean = [csvread(import,k,0,[k,0,k,h*n-1])];
width = [csvread(import,l,0,[l,0,l,h*n-1])];
A = [csvread(import,m,0,[m,0,m,h*n-1])];
Peaks = [];
sz1 = size(t,2);
sz2 = size(mean,2);
bcg = wgn(sz1,1,db);
for I = 1:sz2
    y = sz2*(A(i)/(width(i)*sqrt(pi/2)))*exp(-2*((t-mean(i))/width(i)).^2);
    peaks2(:,i) = y;
end
peaks=peaks2+bcg;
Sum=sum(peaks,2)./sz2;
intermediate=[t;Sum'];
Data=intermediate';
Sum2=sum(peaks2,2)./sz2;
intermediate2=[t;Sum2'];
Data2=intermediate2';
x=Data(:,1);
v=Data(:,2);
xq=0:1/(f*60):tmax;
xq=xq';
vq=interp1(x,v,xq,'spline');
finaldata=[xq vq];
```

```
x2=Data2(:,1);
v2=Data2(:,2);
xq2=0:1/(f*60):tmax;
xq2=xq2';
vq2=interp1(x2,v2,xq2,'spline');
finaldata2=[xq2 vq2];
dlmwrite(name_data,finaldata,'precision', '%.10f');
dlmwrite(name_data2,finaldata2,'precision', '%.10f');
plot(t,Sum);
ylim([y_A,y_B]);
xlim([0,tmax]);
figure;
plot(t,Sum2);
ylim([y_A,y_B]);
xlim([0,tmax]);
```

Figure S6. Comparison of simulated and experimental data for the determination of the enhancement factor G_{HT} . Simulation parameters were adjusted to match experimental data. After deconvolution, the experimental data was referenced to the result of the error-free simulations. With that approach, G_{HT} becomes accessible when as a result of high dilution the SNR cannot be determined accurately. Furthermore, simulations always consisted of two versions: one with and one without background. While the former was used for reference (determination of signal-to-noise ratio of theoretically best result), the latter served as control data in order to check for a flawless deconvolution. Experimental data was acquired from 8 aligned subsequences measured in *setup II* and with a detection frequency of 10 Hz. A) Comparison of 8-bit electropherograms of AMP system. B) Comparison of deconvoluted data for AMP system. C) Comparison of 8-bit electropherograms of mixture system. B) Comparison of deconvoluted data for mixture system.

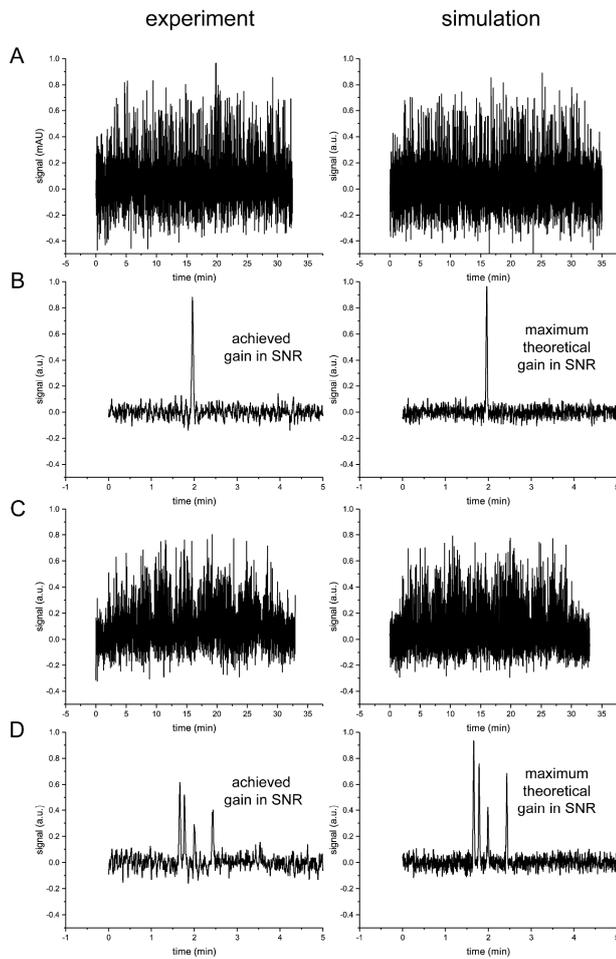


Figure S7. Single injection of a concentrated nucleotide standard mix and comparison of results for averaging approach over 50 measurements shown in figure S3. A) Electropherogram of the single injection of a mixture sample with the 4 nucleotides (A,C,G,U)MP. Measurement ran with *setup I*, 10 μ M analyte concentration and a data acquisition rate of 40 Hz. B) Averaging for all electropherograms without any referencing. C) Averaging for all electropherograms referenced to the migration time of AMP. SNR is improved while peak features are not conserved such as peak height, symmetry and width to the extent of generating artificial peak shapes for (G,U)MP. This appearance is due to unequal peak distances under different EOF mobilities.

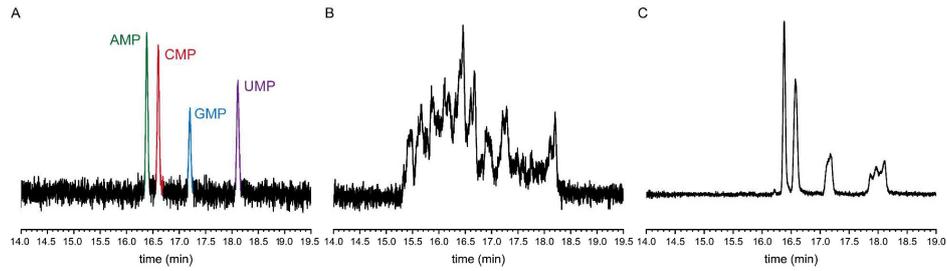


Figure S8. Electropherogram of 4-bit sequence of concentrated milk sample. The modulation time Δt was determined for intervals a – g of sample injections and are given in the table. The results show that sample injections without intermediate buffer injections (a,d,e,f) have significantly smaller modulation times. It can be concluded that the matrix must cause a decrease of the conductivity and, thus, an acceleration of the zones. This effect is enhanced with zones that are in closer vicinity to each other. Data was acquired under *setup III*. The depicted electropherogram was obtained at 295 nm to observe only two analytes and allow for an unadulterated determination of Δt .

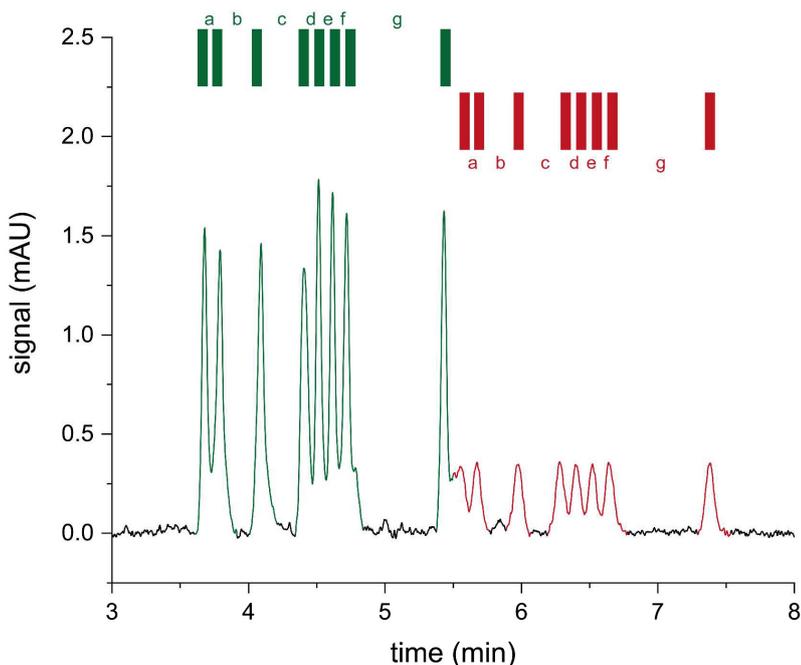
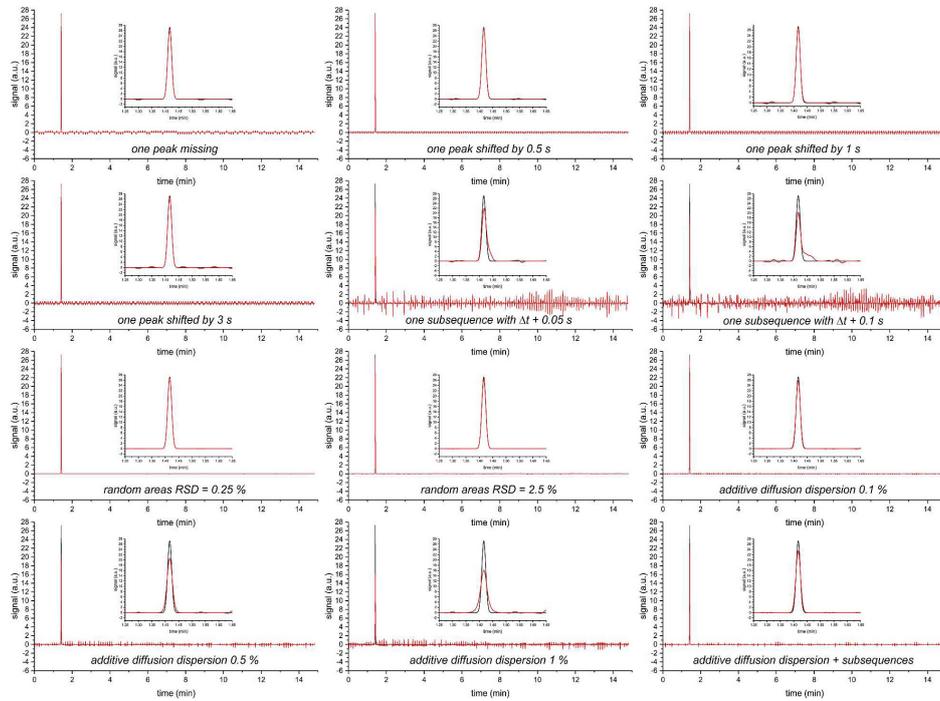


Table S3. Modulation time intervals Δt for peak intervals a – g shown in Figure S8. Data was collected under *setup III*.

| Modulation time Δt for interval | Δt for green analyte | Δt for red analyte |
|---|------------------------------|----------------------------|
| a | 6.57 | 8.47 |
| b | 9.06 | 8.87 |
| c | 9.64 | 9.30 |
| d | 6.20 | 7.22 |
| e | 6.03 | 7.07 |
| f | 6.21 | 7.44 |
| g | 10.7 | 11.0 |

Figure S9. Deconvoluted electropherograms of simulated measurements with specific errors. The overlay of the deconvoluted electropherograms for each electrophoretic error (red) and the error-free sequence (black) is shown.



Guide on how to apply HT to CZE.

1. Single Injection Optimization

- 1.1. Optimization of separation conditions to shortest run times possible while maintaining necessary resolution
- 1.2. Screening for suitable reference wavelengths to stabilize baseline and to avoid any gaps, jumps or spikes within the electropherogram

2. HT Conditions

2.1. Conditioning of capillary

- 2.1.1. Conditioning as required by single injection setup
- 2.1.2. Checking for stable EOF conditions (preferably use extreme conditions such as $\text{pH} < 2$ and $\text{pH} > 11$ where the EOF is naturally more stable; further dynamic or covalent surface coatings can allow for a higher control over the EOF; so do capillaries made from fluorocarbon coated capillaries)
- 2.1.3. No rinsing with NaOH during HT measurements; (re-)conditioning only by BGE flush

2.2. Injections

- 2.2.1. Usage of electrokinetic injections
- 2.2.2. Short sample injection time are preferable to fit in as many peaks as possible (5 to 10s)
- 2.2.3. Zone progression should be whole multiple of the sample injection time for sufficient partitioning of zones

2.3. Run Conditions

- 2.3.1. Usage of constant current
- 2.3.2. Examination of voltage profiles: voltage profiles should be sharp and should not show an initial gradual phase towards constant conditions. That implies conductivity modulations by the zones and results in varying zone velocities.
- 2.3.3. Sample preparation in BGE. It is a prerequisite that the sample is highly dissolved in BGE to avoid zones of different conductivity in the capillary. They would otherwise cause variations in the velocity of the analytes and temporal differences of their respective peak positions in the overlapped electropherogram. Such errors compromise the deconvolution.

2.4. PRBS

- 2.4.1. Generation of PRBS by mpXplorer
- 2.4.2. Validation of EOF stability by determination of modulation time intervals for each peak.
- 2.4.3. Modulation time determination only needs to be done once

3. Data Treatment

3.1. Baseline Correction

- 3.1.1. Usage of reference wavelength simplifies or obsoletes further corrections
- 3.1.2. Correction of baseline by appropriate computer program

3.2. Re-alignment of subsequences

- 3.2.1. Referencing subsequences to their respective position using a practical peak (EOF or analyte peak that can be determined unambiguously; check also in other wavelengths)
- 3.2.2. Simulation of artificial HT peak sequence by the given MATLAB script can be used conveniently for matching the subsequences to their respective position

3.3. Interpolation of Data

- 3.3.1. Data rate should be at least 100 Hz. As detector data acquisition rates already have impact on SNR through program-based data smoothing, it is recommended to interpolate the user's preferential detector frequency to 100 Hz after HT measurement. This way the data quality is not compromised. A MATLAB script for doing so is part of this supporting information.

3.4. Deconvolution

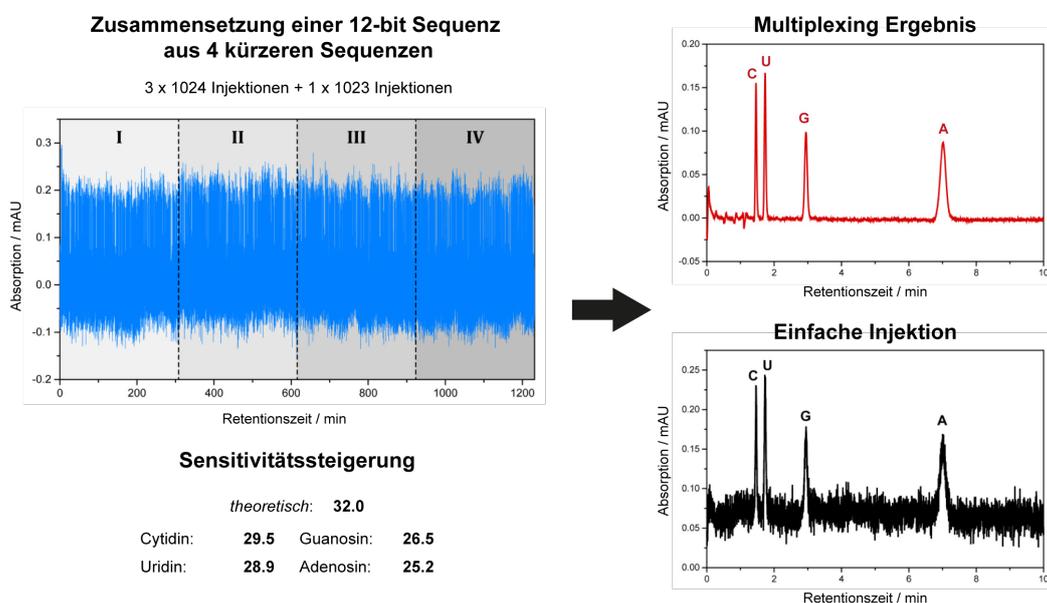
- 3.4.1. Performing of data deconvolution by mpXplorer

5.4. Signifikante Verbesserung in der Empfindlichkeit in der Hadamard-Transformations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durch Anwendung langer Modulationssequenzen, die aus Sequenzen kleinerer Ordnung konstruiert sind

Alexander Florian Siegle, **Sebastian Pallmann** und Oliver Trapp, *J. Chromatogr. A*, **2018**, *1575*, 34-39.³²⁰

Kurzzusammenfassung

In der bestehenden Anwendung des Hadamard-basierten Multiplexings in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie konnten pseudo-zufällige binäre Sequenzen mit Längen größer als 10-bit bisher nicht sinnvoll eingesetzt werden, da zum einen die kommerziellen Autosamplern nicht ausreichend internen Speicher besitzen, um die Abfolge tausender Injektionen durchführen zu können, und zum anderen längere Sequenzen anfälliger für sich aufsummierende chromatographische Fehler sind. In der hier wiedergegebenen Publikation wurde das Prinzip der Unterteilung von PRBS in kürzere Injektionsfolgen und anschließender Computergestützter Rekombination für die HPLC exploriert und die beschriebenen Limitationen erfolgreich adressiert. So konnten für verschiedene Proben Sensitivitätssteigerungen um Faktoren der Größenordnung zwischen 20 und 30 erreicht werden. Nach dem besten Wissen der Autoren sind solche signifikanten Verbesserungen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses für Hadamard-Transformation-Experimente vorher noch nicht erreicht worden. Die Länge der Injektionssequenzen auf der anderen Seite limitiert den Probendurchsatz.



Veröffentlichte Arbeiten

Autorenbeitrag

Motiviert von den Ergebnissen zur Publikation „Sebastian Pallmann, Alexander Florian Siegle, Jana Šteflová (neé Svobodová) und Oliver Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8445-8453.“ haben OT, AS und SP das Forschungsvorhaben in der hier wiedergegebenen Publikation gemeinschaftlich entwickelt. AS führte die Messungen, Datenverarbeitung und -auswertung durch. AS und SP diskutierten die Ergebnisse. AS schrieb die Publikation.

Lizenz

Basierend auf der Veröffentlichungsvereinbarung mit dem Verlag Elsevier, unter welchem das Journal of Chromatography A herausgegeben wird, halten die Autoren die Lizenz, den genannten Beitrag für persönliche Zwecke einschließlich der Verwendung in der Dissertation zu nutzen.



Significant sensitivity enhancement in Hadamard transform high-performance liquid chromatography by application of long modulation sequences constructed from lower order sequences

Alexander F. Siegle, Sebastian Pallmann, Oliver Trapp*

Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 5-13, 81377 München, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2018

Received in revised form 21 August 2018

Accepted 31 August 2018

Available online 1 September 2018

Keywords:

Hadamard transform
Signal-to-noise ratio
Liquid chromatography
Multiplexing
Limit of detection
Sensitivity

ABSTRACT

Hadamard encoding, utilizing pseudo-random injection sequences with n -bit (2^n-1) elements, is applied in analytical sciences to enhance the signal-to-noise ratio (S/N) of weak analyte signals. We have developed a software approach that allows using Hadamard encoding on standard HPLC systems. This strategy is only limited by the number of instructions that can be transmitted to the autosampler and its performance degrades if an accumulation of chromatographic irregularities occurs while applying long modulation sequences. Here we demonstrate that such sequences (>4000 elements) can be subdivided into suitable subsequences, which can be independently executed. The measured subchromatograms are subsequently realigned and deconvoluted yielding a chromatogram with increased S/N. This opens an avenue to achieve unprecedented sensitivity gains. In the analysis of highly diluted nucleoside samples an S/N enhancement of up to 30-fold was observed. Furthermore, we applied the method to a sample containing the antibiotic drug fidaxomicin and found a significant sensitivity improvement that strongly depends on the applied elution conditions.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sensitive analytical techniques are required for detection and quantification of trace analytes in many fields such as environmental sciences, pharmacokinetics or impurity analysis of pharmaceutical compounds. This often necessitates pretreatment of the sample to enrich the compound of interest. A mathematical way to address the sensitivity issue in separation sciences is based on modulating the sample injection according to pseudo-random binary sequences (PRBS) derived from Hadamard matrices. The hereby obtained multiplexed data is usually highly convoluted and can be decoded either by inverse Hadamard transform or by cross-correlating PRBS and multiplexed chromatogram. In both cases, the single injection information is recovered with significantly improved signal-to-noise ratio (S/N) [1]. For PRBS containing m sequence elements a theoretical improvement of $\sqrt{m/2}$ can be achieved. Various approaches utilizing pseudo-random modulation patterns have been developed in separation sciences, including gas chromatography [2–5], high-performance liquid chromatography [6–8] and capillary electrophoresis [9–12]. Further applications of Hadamard transform techniques were reported e.g. in ion mobil-

ity spectrometry [13,14] and time-of-flight mass spectrometry [15–17] as well as GC–MS [18–21].

We introduced a macro control approach that allows modulation of sample injection according to PRBS on standard HPLC instrumentation without further modifications, which lead to significantly enhanced sensitivity [22]. In later work, we extended this approach and demonstrated improvement of the S/N in HPLC hyphenated to circular dichroism (CD) detection [23] and gel permeation chromatography (GPC) [24]. Here, sensitivity of detection was typically improved by approximately an order of magnitude. The highly uniform sample injections and retention times achieved with conventional HPLC systems in this approach are advantageous for the implementation of Hadamard encoding since this significantly reduces artifacts, often termed correlation noise [25], in the deconvoluted chromatograms. In addition, algorithms have been developed to further reduce errors in the deconvolution process and allow for the analysis of samples with dominating analyte or solvent signals [26] and migrating retention times [27]. Besides their use for improving sensitivity, specifically structured modulation sequences were also utilized to increase sample-throughput in GC [28] and HPLC [29].

One limitation of this macro control approach consists in the restriction of the modulation sequence length to 2047 sequence elements (1024 injections) that can be transmitted to the autosampler. Furthermore, by application of longer modulation sequences,

* Corresponding author.

E-mail address: oliver.trapp@cup.uni-muenchen.de (O. Trapp).

temporal deviations and chromatographic irregularities tend to accumulate and cause noticeable errors in the deconvoluted data (correlation noise). A possible solution for these limitations is splitting long modulation sequences into shorter parts that are individually transmitted to the autosampler. The complete modulated chromatogram is afterwards reassembled from the chromatograms resulting from these subsequences. We initially developed this strategy to realize software controlled Hadamard encoding in capillary electrophoresis in order to deal with the limited peak capacity of the capillary, achieving modulation sequences of up to 8-bit length (255 sequence elements) [30]. Here we present the transfer of this concept to HPLC for the construction of previously unattainable 12-bit modulation sequences (4095 sequence elements, 2048 injections) from lower order sequences. This new approach overcomes the limitation of the technique to shorter sequences and improves the overall sensitivity with unprecedented gains in the S/N.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

The nucleosides adenosine (A), cytidine (C), guanosine (G) and uridine (U) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. The nucleoside analytes were dissolved in the mobile phase to obtain concentrations of 328 ng/mL for the adenosine sample as well as 323 (A), 223 (C), 218 (G) and 268 (U) ng/mL for the nucleoside mix sample. Fidaxomicin samples were provided by the group of Prof. K. Gademann (University of Zurich, UZH) and used without further purification [31]. Fidaxomicin was dissolved in the respective mobile phase to obtain a sample concentration of 500 ng/mL.

2.2. Instrumentation

Multiplexing HPLC experiments were performed on an Agilent Infinity 1260 system equipped with a high performance autosampler model HiP-ALS SL+, a photodiode array detector (G1315C) and controlled by the ChemStation software package (Rev. C.01.04). Typically, in a multiplexing experiment, a sample is injected repeatedly according to n -bit Hadamard modulation sequences ($m = 2^n - 1$ sequence elements) that contain $2^{n-1}/2$ elements "1" that correspond to an injection and $2^{n-1}/2$ elements "0" for which no injection is performed. The time interval between two sequence elements is the injection interval Δt . In the here presented approach 12-bit modulation sequences are divided into four subsequences of equal length. The subsequences were transmitted to the autosampler of the HPLC system by execution of a macro as a pre-run command in ChemStation. This approach, its benefits and technical limitations have been described in previous work [22]. Separation of the adenosine sample and the nucleoside mixture containing adenosine, cytidine, guanosine and uridine were performed on an Agilent Eclipse Plus C18 column (3.5 μm , 4.6 mm \times 100 mm). Methanol/water (20:80 v/v for adenosine and 10:90 v/v for the nucleoside mix) was used as mobile phase with a flow rate of 1 mL/min at 20 °C. The detection wavelength of the photodiode array detector (DAD) was set to 260 nm and the acquisition frequency to 40 Hz. For the separation of the fidaxomicin samples the same column was used with a mobile phase consisting of acetonitrile/water (60:40, v/v), varying amounts of formic acid (0.1/0.05/0.01, v/v) and a flow rate of 1 mL/min at 20 °C. DAD traces of fidaxomicin were acquired at 235 nm with 40 Hz frequency. An injection volume of 1 μL was used for all multiplexing experiments, though the full range provided by the autosampler instrumentation can be utilized in our approach.

2.3. Data acquisition, processing and deconvolution

The 12-bit pseudo-random binary modulation sequence was generated by use of a virtual shift register [32] and divided into four subsequences of equal length. Multiplexed chromatograms acquired through application of the modulation subsequences were converted to csv files and corrected for baseline drift using the Origin software package. Subsequently, the 12-bit multiplexed chromatogram was constructed from these subchromatograms by placing them in their correct order and at the appropriate sequence runtime, resulting in an overlap of the subchromatograms for a time interval that corresponds to the retention time of the latest eluted peak. In the range of this time interval, the subchromatograms are simply added. Deconvolution of the 12-bit multiplexed data by inverse Hadamard transform was performed using software written in Delphi. A Matlab script for the deconvolution process is given in reference [26]. S/N ratios were calculated using the ChemStation software package. For this purpose, deconvoluted data files were converted to cdf files using ACD Spectrus software and imported in ChemStation.

3. Results and discussion

To achieve 12-bit modulation, the pseudo-random binary modulation sequence was divided into four parts of equal length in this study. Although these subsequences have the same number of sequence elements, they include varying numbers of elements "1" and thus injections. A sample containing adenosine as the single analyte was injected according to these specific subsequences. The resulting chromatograms, shown in Fig. 1, are combined to create the complete 12-bit modulated, multiplexed chromatogram.

Hereby, the subchromatograms are placed at the sequence runtime that corresponds to the particular sequence element they start with. As a consequence of this, an overlap between the chromatograms is created at the point where they adjoin. This overlap amounts to approximately the retention time t_R of the last eluted peak. Hence, the acquisition time using the "assembly" method is about $3 \times t_R$ times longer than the acquisition time using a regular modulation sequence, which is in this case negligible towards the total sequence length (1228.5 min for a 12-bit sequence with $\Delta t = 18$ s).

In a first experiment we employed the described method to analyze a diluted adenosine sample (Fig. S1), which exhibited a low S/N (Fig. S1a). In this experiment, the sample injection was modulated according to a 12-bit sequence composed of four subsequences with an injection interval of $\Delta t = 18$ s. In Fig. S1b the resulting multiplexed chromatogram is shown. Inverse Hadamard transformation of this chromatogram yields the chromatogram of the sample with significantly improved S/N. We determined the S/N to be significantly improved by a factor of 24.9. This is in good agreement with the expected value of 32.0 for 12-bit modulation sequences. A deviation from the theoretical value can be expected due to imperfections occurring in the chromatographic process over the time of the measurement that lead to correlation noise. The overlay of deconvoluted chromatogram and single injection chromatogram (Fig. S1d) visualizes the greatly enhanced S/N and demonstrates the accuracy of the method with respect to retention time and peak profile.

In a more complex experiment (Fig. 2), a diluted sample containing a mixture of all four nucleosides cytidine, uridine, guanosine and adenosine was analyzed. The obtained single injection chromatogram comprises four peaks with S/N at or below the limit of detection (LOD: $S/N \leq 3$). This sample was injected according to a 12-bit modulation sequence ($\Delta t = 18$ s) constructed in the same fashion as in the previously described experiment. The multiplexed

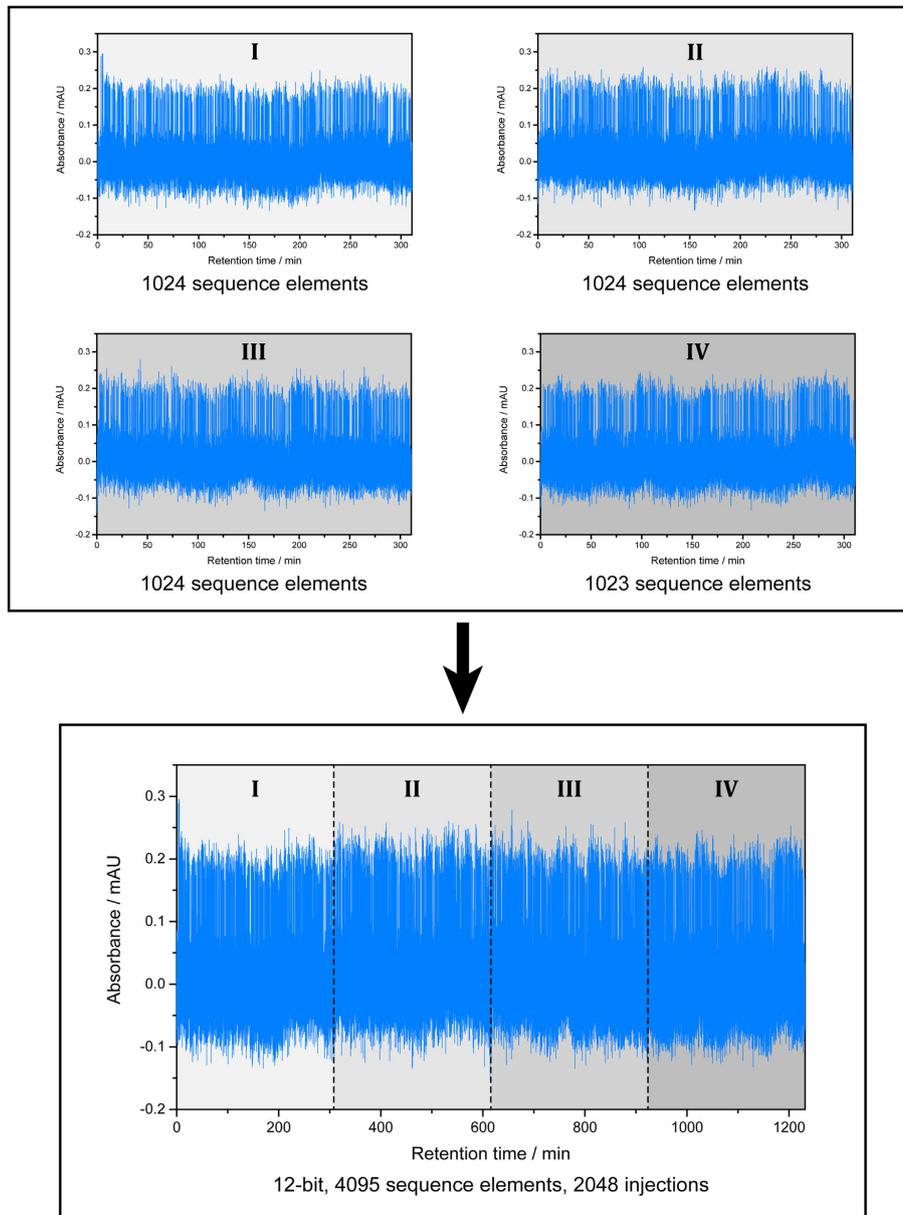


Fig. 1. Construction of a 12-bit modulation sequence, comprising 2048 injections, from four specific subsequences (corresponding to 10-bit length, injection interval $\Delta t = 18$ s) by merging of the resulting chromatograms. The shown UV traces ($\lambda = 260$ nm) result from the modulated injection of a diluted adenosine sample.

chromatogram obtained using this method is depicted in Fig. 2b. Application of the inverse Hadamard transform again yields a chromatogram that contains the four analyte signals with significantly improved S/N ratio (Fig. 2c). In Table 1, the individual values for

the S/N enhancement are summarized. For all analyte signals, a large S/N enhancement of more than 25-fold was observed, the first eluting cytidine peak exhibiting an almost 30-fold enhancement.

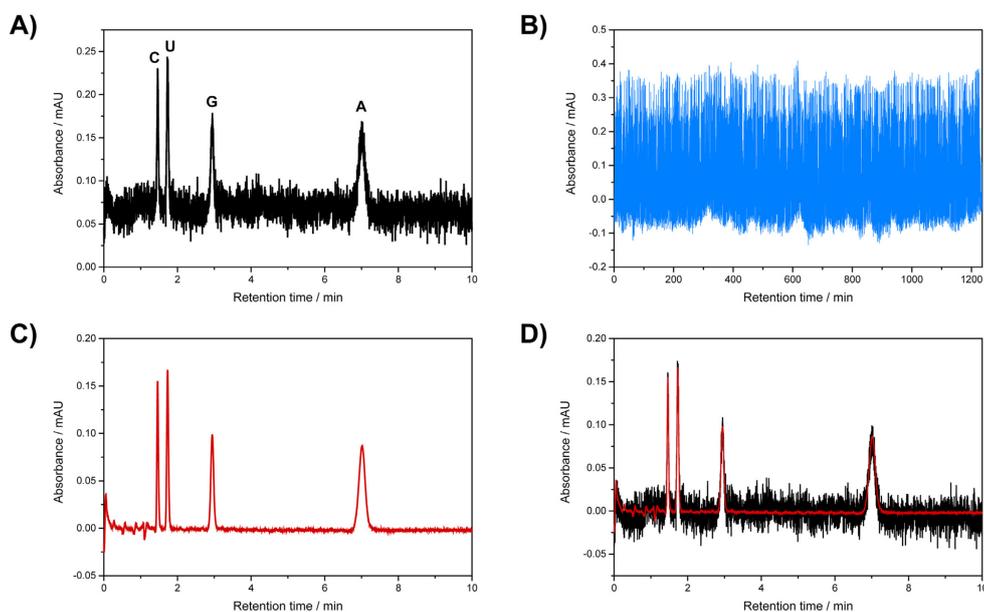


Fig. 2. A) Single injection chromatogram ($\lambda = 260$ nm) of a sample containing the four nucleosides cytidine (C), uridine (U), guanosine (G) and adenosine (A). B) Multiplexed chromatogram corresponding to 12-bit modulation ($m = 4095$ sequence elements; 2048 sample injections), which was constructed from four acquired subchromatograms. C) The chromatogram obtained by deconvolution of the multiplexed chromatogram shows significantly enhanced S/N. D) Overlay of deconvoluted chromatogram and single injection chromatogram.

Table 1
Determined S/N improvement for the four nucleoside analytes.

| S/N improvement | | | | |
|-----------------|----------|---------|-----------|-----------|
| theor. | cytidine | uridine | guanosine | adenosine |
| 32.0 | 29.5 | 28.9 | 26.5 | 25.2 |

The overlay of deconvoluted and conventional chromatogram (Fig. 2d) again matches very well, which demonstrates the applicability of the herein presented approach and the significant gain in sensitivity that can be achieved for samples comprising several analytes. From the deconvoluted chromatogram, LODs of the nucleoside analytes were estimated in the range between 10 and 20 ng/mL, which compares well with LODs achieved by HPLC-MS/MS [33,34].

In a subsequent experiment, we investigated the 12-bit modulation for a sample containing the pharmaceutically relevant compound fidaxomicin. Fidaxomicin is a macrolide antibiotic approved for the treatment of *Clostridium difficile* infections in the gut [35]. Reversed-phase HPLC with UV detection has been established as standard method for its detection and quantification [36]. Despite containing three ester groups, fidaxomicin is reasonably stable in aqueous solution at low pH [37]. While fecal concentrations of fidaxomicin are high, its systemic absorption is very low, requiring sensitive HPLC-MS/MS techniques for analysis of plasma concentrations [38]. As a consequence of this, we were interested whether our approach would be suitable for this pharmaceutically active compound. For our experiments, fidaxomicin samples were diluted until the analyte signal intensity was close to the limit of detection. Three samples were prepared and multiplexed under different elution conditions (Fig. 3 and supplementary information). The amount of formic acid additive was 0.01%, 0.05% or

0.1% (v/v). For the 12-bit experiment ($\Delta t = 18$ s) with 0.01% formic acid additive, the S/N of the single injection experiment (Fig. 3a) was improved significantly by a factor of 21.5 in the deconvoluted chromatogram (Fig. 3c). The theoretically expected 32-fold enhancement and the enhancement reported for the nucleoside samples were not achieved since small artifacts, resulting from slight variations in the system peak at 0.8 min (cf. Fig. 3b and supplementary information), increase the baseline noise in the deconvoluted chromatogram. The analyte peak, however, is not affected by these fluctuations (see supplementary information). We found that increasing the amount of acid additive leads to significantly stronger fluctuations of the system peak and the emergence of new signals. This is reflected in the deconvoluted chromatograms compared in Fig. 3d. It becomes apparent that number and magnitude of deconvolution artifacts increase due to these instabilities. The S/N improvement decreases from 21.5 to 11.8 (0.05% additive) and 5.1 (0.1% additive).

This experiment exemplifies that if separation conditions are chosen carefully to achieve uniform injections and sample composition over more than 2000 injections, the presented method can provide substantial sensitivity gains. Due to the high number of injections performed in a single run of a 12-bit experiment it is expected that additional wear is placed on instrumentation and columns that were not designed for such multi-injection approaches. The authors, however, have observed no unusual decline in equipment durability in their ongoing work. Instrumentation utilized in this work has been in use since our initial studies [22], requiring only routine maintenance in the meantime. A rapid decline in autosampler and column performance within the 2000 injections performed in a 12-bit experiment can be excluded, since it would significantly influence the appearance of multiplexed and deconvoluted chromatograms.

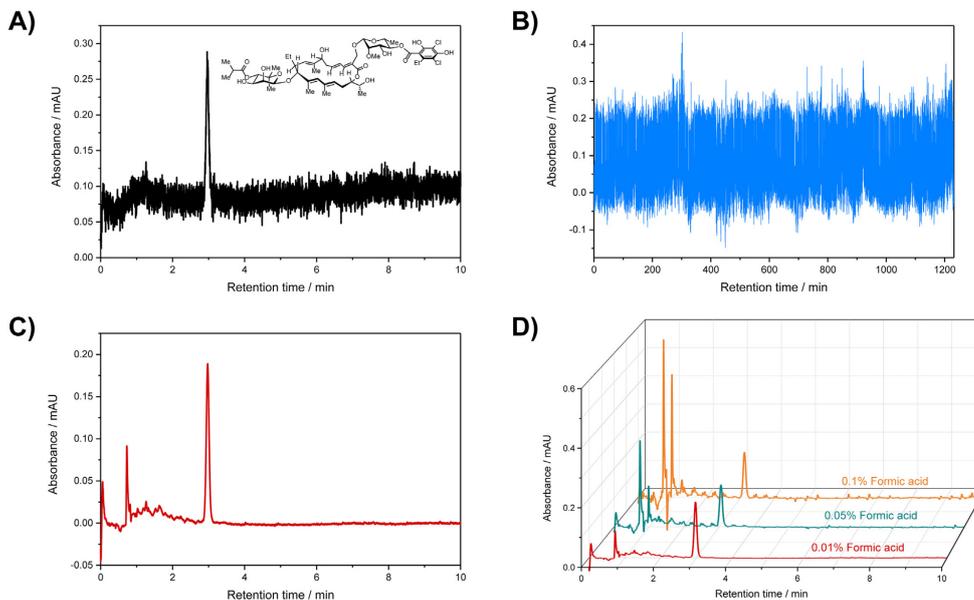


Fig. 3. A) Single injection chromatogram ($\lambda = 235$ nm) of a sample containing the antibiotic drug fidaxomicin and structure of the macrocyclic compound. B) 12-bit modulated chromatogram constructed from four subchromatograms. C) Deconvoluted chromatogram with significantly improved S/N. D) Comparison of the deconvoluted chromatograms obtained by elution with varying amounts of acid additive.

To achieve the best possible results in the deconvolution process, division into many short subsequences and thus -chromatograms seems advantageous since the probability for an accumulation of chromatographic and temporal errors, which causes artifacts in the deconvoluted data, increases for longer modulation sequences. As the Hadamard transform approach requires isocratic elution to preserve retention times and peak shapes, the strategy of sequence subdivision, additionally, allows for flushing and re-equilibration of the column in between runs of specific subsequences. This can be helpful to ensure elution of retained compounds that might otherwise interfere with the separation process in complex sample matrices. Nevertheless, it has to be considered that construction of the chromatogram from shorter sequences leads to more points of overlap between the subchromatograms resulting in more time required for data acquisition. Therefore, a compromise has to be found and we suggest choosing the subsequences as long as possible without sacrificing the uniformity of the sample signals to operate as time efficient as possible.

The acquisition times reported in this study can be significantly reduced if a faster mode of injection is applied. Newest generation dual needle autosamplers allow for consecutive injections with time intervals of 10–11 s [39], which would reduce the acquisition time in the presented experiments by approximately 40%. The design of faster autosamplers, currently outpaced by advances in separation speed [40], will further improve the time efficiency of the presented method.

4. Conclusion

In conclusion, we have developed a method that comprises the stepwise execution of modulation sequences, derived from Hadamard matrices, as shorter subsequences. This strategy helps

overcoming limitations regarding the sequence length transmitted, that are present in the software control approach. Here we have shown, that the modulated subchromatograms can be reassembled and deconvoluted in a single step by application of the Hadamard transform, resulting in significant and to the best of our knowledge unprecedented S/N enhancements of up to 30-fold. The presented approach is universal and can be applied to construct any modulation sequence as a combination of any set of subsequences. These subsequences can in principle be measured at any point in time, provided the intensity of analyte and matrix signals of the sample does not change or degrade. Although enormous sensitivity gain can be achieved using this strategy, it has to be noted that the execution of modulation sequences containing several thousand elements is time consuming and the applicability of the presented strategy will benefit greatly from advances in autosampler speed.

Acknowledgements

We are grateful to the European Research Council under Grant Agreement Nos. StG 258740 and PoC 310196 and the Agilent Foundation, Santa Clara, California, for financial support. S.P. thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a Ph.D. fellowship. We thank Prof. K. Gademann (University of Zurich) for providing us with samples of fidaxomicin. Furthermore, we thank Dr. R. Berg for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.069>.

References

- [1] M. Kaljurand, H.C. Smit, Application of random and regular input in analytical separation methods: a critical insight, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 79 (2005) 65–72.
- [2] H.C. Smit, Random input and correlation methods to improve the signal-to-noise ratio in chromatographic trace analysis, *Chromatographia* 3 (1970) 515–518.
- [3] M. Kaljurand, E. Küllik, Continuous thermal volatilization analysis of polymers by gas chromatography with pseudo-random injection of samples, *J. Chromatogr.* 171 (1979) 243–247.
- [4] R. Annino, M.-F. Gonnord, G. Guiochon, Fluidic logic element sample switch for correlation chromatography, *Anal. Chem.* 51 (1979) 379–382.
- [5] O. Trapp, Investigation of modulation parameters in multiplexing gas chromatography, *J. Chromatogr.* A 1217 (2010) 6640–6645.
- [6] T.T. Lub, H.C. Smit, H. Poppe, Correlation high-performance liquid chromatography: a technique for improving the detection limit applied to the analysis of phenols, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 721–733.
- [7] H.C. Smit, T.T. Lub, W.J. Vloon, Application of correlation high-performance liquid chromatography to the reverse-phase separation of traces of chlorinated phenols, *Anal. Chim. Acta* 122 (1980) 267–277.
- [8] C. Mars, H.C. Smit, Sample introduction in correlation liquid chromatography Application, properties and working conditions for a novel injection system, *Anal. Chim. Acta* 228 (1990) 193–208.
- [9] J.N. van der Moolen, D.J. Louwse, H. Poppe, H.C. Smit, Correlation capillary zone electrophoresis, a novel technique to decrease detection limits, *Chromatographia* 40 (1995) 368–374.
- [10] T. Kaneta, Y. Yamaguchi, T. Imasaka, Hadamard transform capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5444–5446.
- [11] T. Kaneta, K. Kosai, T. Imasaka, Ultratrace analysis based on Hadamard transform capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2257–2260.
- [12] K. Hata, T. Kaneta, T. Imasaka, Hadamard transform capillary electrophoresis combined with laser-induced fluorometry using electrokinetic injection, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 178–182.
- [13] B.H. Clowers, W.F. Siems, H.H. Hill Jr, S.M. Massick, Hadamard transform ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 44–51.
- [14] A.W. Szumlas, S.J. Ray, G.M. Hieftje, Hadamard transform ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4474–4481.
- [15] A. Brock, N. Rodriguez, R.N. Zare, Hadamard transform time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3735–3741.
- [16] R.N. Zare, F.M. Fernández, J.R. Kimmel, Hadamard transform time-of-flight mass spectrometry: more signal, more of the time, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 30–35.
- [17] O. Trapp, J.R. Kimmel, O.K. Yoon, I.A. Zuleta, F.M. Fernandez, R.N. Zare, Continuous two-channel time-of-flight mass spectrometric detection of electrosprayed ions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 6541–6544.
- [18] C.-H. Lin, T. Kaneta, H.-M. Chen, W.-X. Chen, H.-W. Chang, J.-T. Liu, Applications of Hadamard transform to gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5755–5759.
- [19] Y.-K. Cheng, C.-H. Lin, T. Kaneta, T. Imasaka, Applications of Hadamard transform-gas chromatography/mass spectrometry to online detection of exhaled breath after drinking or smoking, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5274–5278.
- [20] Y.-K. Cheng, C.-H. Lin, S. Kuo, J. Yang, S.-Y. Hsiung, J.-L. Wang, Applications of Hadamard transform-gas chromatography/mass spectrometry for the detection of hexamethyldisiloxane in a wafer cleanroom, *J. Chromatogr. A* 1220 (2012) 143–146.
- [21] G.-T. Fan, C.-L. Yang, C.-H. Lin, C.-C. Chen, C.-H. Shih, Applications of Hadamard transform-gas chromatography/mass spectrometry to the detection of acetone in healthy human and diabetes mellitus patient breath, *Talanta* 120 (2014) 386–390.
- [22] A.F. Siegle, O. Trapp, Development of a straightforward and robust technique to implement hadamard encoded multiplexing to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10828–10833.
- [23] A.F. Siegle, O. Trapp, Hyphenation of Hadamard encoded multiplexing liquid chromatography and circular dichroism detection to improve the signal-to-noise ratio in chiral analysis, *Anal. Chem.* 87 (2015) 11932–11934.
- [24] A.F. Siegle, O. Trapp, Improving the signal-to-noise ratio in gel permeation chromatography by Hadamard encoding, *J. Chromatogr. A* 1448 (2016) 93–97.
- [25] R. Annino, L.E. Bullock, Continuous chromatographic analysis using a pseudo random sample switching function, *Anal. Chem.* 45 (1973) 1221–1227.
- [26] M.R. Wunsch, R. Lehnig, O. Trapp, Online continuous trace process analytics using multiplexing gas chromatography, *Anal. Chem.* 89 (2017) 4038–4045.
- [27] K. Zawatzky, M. Lin, W. Schafer, B. Mao, O. Trapp, C.J. Welch, Using chromatogram averaging to improve quantitation of minor impurities, *J. Chromatogr. A* 1465 (2016) 205–210.
- [28] O. Trapp, Boosting the throughput of separation techniques by “Multiplexing”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 5609–5613.
- [29] A.F. Siegle, O. Trapp, Implementation of Hadamard encoding for rapid multisample analysis in liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3839–3844.
- [30] S. Pallmann, A.F. Siegle, J. Steflöv, O. Trapp, Direct Hadamard transform capillary zone electrophoresis without instrumental modifications, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8445–8453.
- [31] E. Kaufmann, H. Hattori, H. Miyatake-Ondozabal, K. Gademann, Total synthesis of the glycosylated macrolide antibiotic fidaxomicin, *Org. Lett.* 17 (2015) 3514–3517.
- [32] M. Harwit, N.J.A. Sloane, Hadamard Transform Optics, Academic Press, New York, 1979.
- [33] H. Fan, S.P. Li, J.J. Xiang, C.M. Lai, F.Q. Yang, J.L. Gao, Y.T. Wang, Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured cordyceps by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS), *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 218–228.
- [34] J.-F. Xia, Q.-L. Liang, X.-P. Liang, Y.-M. Wang, P. Hu, P. Li, G.-A. Luo, Ultraviolet and tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 21 pivotal metabolites in plasma from patients with diabetic nephropathy, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1930–1936.
- [35] W. Erb, J. Zhu, From natural product to marketed drug: the tiacumicin odyssey, *Nat. Prod. Rep.* 30 (2013) 161–174.
- [36] A. Tousseeva, J.D. Jackson, M. Redell, T. Henry, M. Hui, S. Capurso, C.A. DeRyke, Stability and recovery of DIFICID® (Fidaxomicin) 200-mg crushed tablet preparations from three delivery vehicles, and administration of an aqueous dispersion via nasogastric tube, *Drugs R & D* 14 (2014) 309–314.
- [37] H. Hattori, E. Kaufmann, H. Miyatake-Ondozabal, R. Berg, K. Gademann, Total synthesis of tiacumicin A, total synthesis, relay synthesis, and degradation studies of fidaxomicin (Tiacumicin B, Lipiarmycin A3), *J. Org. Chem.* 83 (2018) 7180–7205.
- [38] P. Sears, D.W. Crook, T.J. Louie, M.A. Miller, K. Weiss, Fidaxomicin attains high fecal concentrations with minimal plasma concentrations following oral administration in patients with clostridium difficile infection, *Clin. Infect. Dis.* 55 (2012) S116–S120.
- [39] K. Zawatzky, C.L. Barhate, E.L. Regalado, B.F. Mann, N. Marshall, J.C. Moore, C.J. Welch, Overcoming “speed limits” in high throughput chromatographic analysis, *J. Chromatogr. A* 1499 (2017) 211–216.
- [40] C.J. Welch, Are we approaching a speed limit for the chromatographic separation of enantiomers? *ACS Cent. Sci.* 3 (2017) 823–829.

Supporting Information

Significant sensitivity enhancement in Hadamard transform high-performance liquid chromatography by application of long modulation sequences constructed from lower order sequences

Alexander F. Siegle, Sebastian Pallmann, Oliver Trapp*

Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München,

Butenandtstr. 5-13, 81377 München

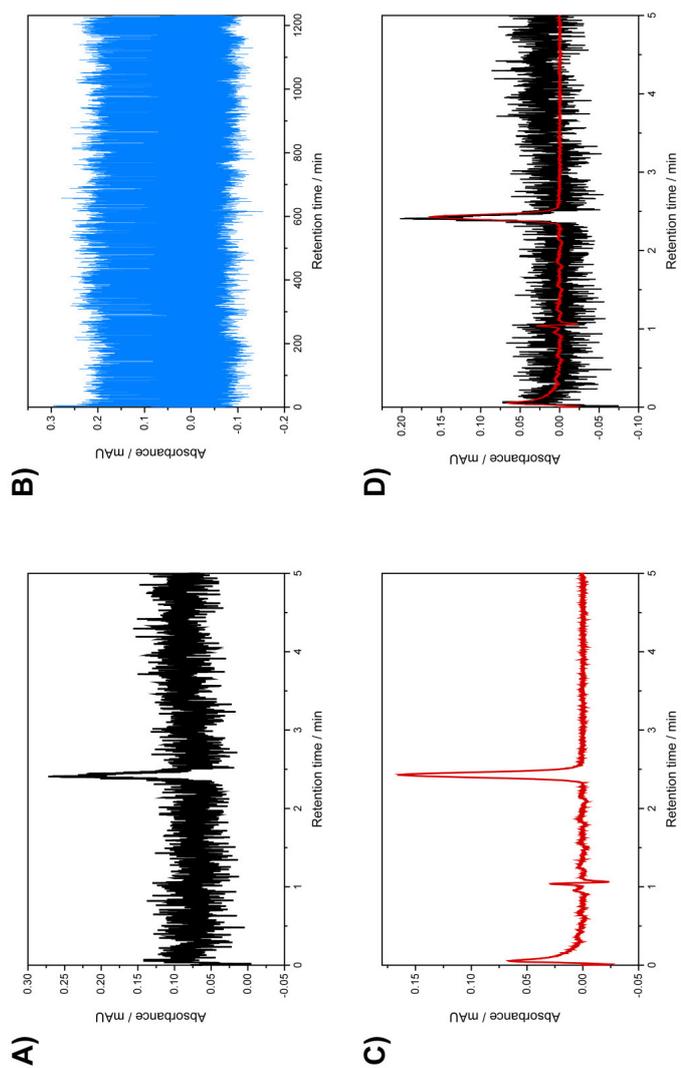


Fig. S1. A) Single injection chromatogram ($\lambda = 260$ nm) of a diluted adenosine sample. B) Multiplexed chromatogram corresponding to 12-bit modulation ($m = 4095$ sequence elements; 2048 sample injections), which was constructed from four acquired subchromatograms. C) The chromatogram obtained by deconvolution of the multiplexed chromatogram exhibits a 25-fold enhanced S/N. D) Overlay of deconvoluted chromatogram and single injection chromatogram.

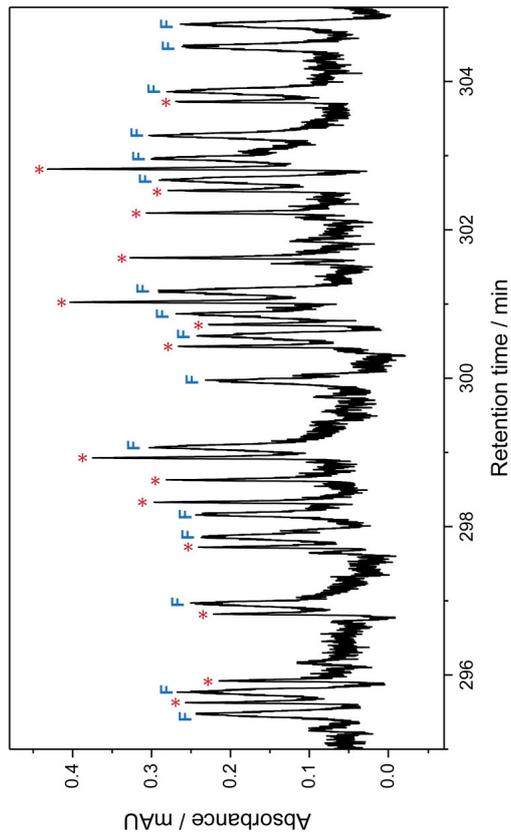


Fig. S2. Cutout of the multiplexed chromatogram resulting from 12-bit modulation of a fidaxomicin sample ($\Delta t = 18$ s, $\lambda = 235$ nm, 0.01% formic acid additive). The system peak (red asterisk) and the fidaxomicin peak (blue "F") are indicated. While the signal corresponding to the fidaxomicin analyte remains stable the system peaks exhibit more pronounced intensity fluctuations.

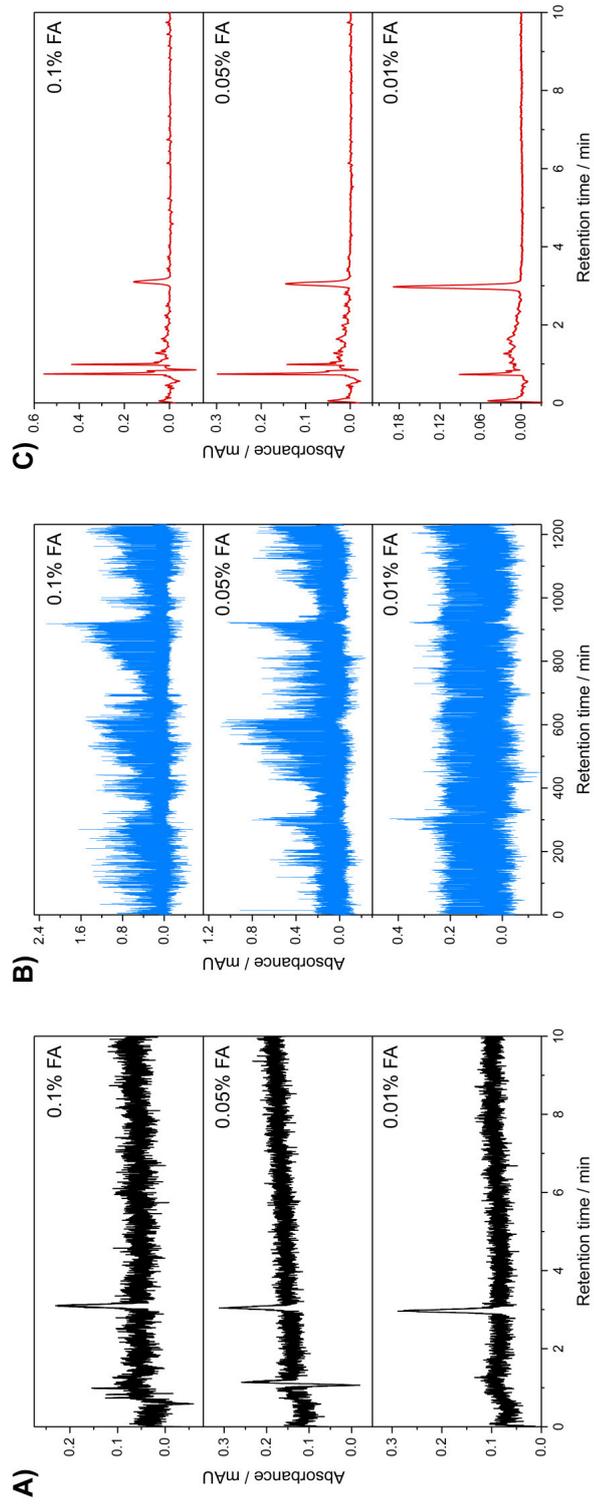


Fig. S3. A) Single injection chromatograms of fidaxomicin sample under varying eluent conditions. B) 12-bit multiplexed chromatograms ($\Delta t = 18$ s, $\lambda = 235$ nm) of the fidaxomicin samples. C) Corresponding deconvoluted chromatograms.

6. Unveröffentlichte Arbeiten

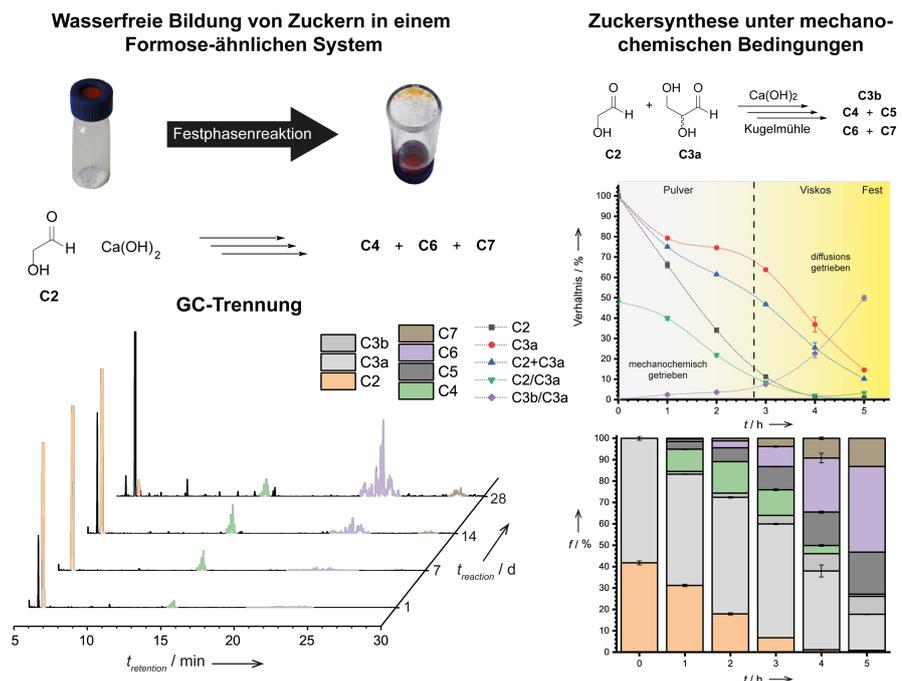
6.1. Präbiotische Zuckerbildung unter wasserfreien Bedingungen und mechanochemische Beschleunigung im Formose Netzwerk

Saskia Lamour*, **Sebastian Pallmann*** und Oliver Trapp.

* geteilte Erstautorenschaft

Kurzzusammenfassung

In dem vorliegenden Manuskript wurde die Bildung von Monosacchariden unter wasserfreien sowie mechanochemischen Bedingungen in einem Formose-ähnlichen System untersucht. Ausgangspunkt der Arbeit waren die Zucker Glykolaldehyd und *DL*-Glyceraldehyd. In Anwesenheit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als basischen Katalysators konnte gefunden werden, dass in einer Festphasenreaktion die Bildung eines komplexen Reaktionsnetzwerkes von einfachen Zuckern *via* Aldolreaktionen über einen Zeitraum von einem Monat einsetzt. Dabei wurden im Fall von Glykolaldehyd sowohl C4 als auch C6 Zucker aufgebaut. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unter mechanochemischen Bedingungen in einer Schwingkugelmühle die Reaktion über den Effekt des Homogenisierens hinaus beschleunigt wird. In Reaktionen mit Glykolaldehyd und *DL*-Glyceraldehyd wurden C5, C7 und vornehmlich C6-Zucker erhalten. Außerdem wurde die bevorzugte Bildung von Ketosen beobachtet. Die Erkenntnisse dieser Studien zeigen, dass die Bildung von Monosacchariden nicht ausschließlich auf wässrige Milieus limitiert ist und haben damit Implikationen für meteoritische Funde von einfachen Zuckern. Außerdem tragen diese Ergebnisse dazu bei, neben wässriger Chemie auch präbiotische Szenarien in wasserarmen und -freien Umgebungen zu berücksichtigen.



Autorenbeitrag

Das in dem Manuskript erläuterte Forschungsprojekt sowie die darin beschriebenen Experimente wurde von OT, SP und SL gemeinschaftlich entwickelt. SL führte den Großteil der Versuche und Analysen durch. SP und SL haben zusammen die Daten ausgewertet und interpretiert. Das Manuskript ist in Zusammenarbeit von SP und SL geschrieben worden.

Prebiotic Sugar Formation Under Nonaqueous Conditions and Mechanochemical Acceleration in the Formose Reaction Network

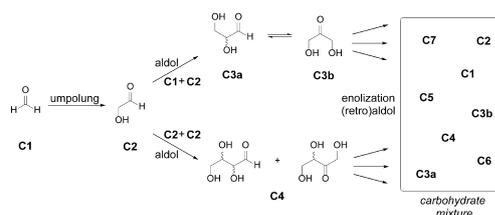
Saskia Lamour^{[a],[b],†}, Sebastian Pallmann^{[a],†} and Oliver Trapp^{*,[a],[b]}

Abstract: The formose reaction network is considered a prebiotically likely route to biologically relevant sugars. Here we report on the feasibility of the formation of carbohydrates under nonaqueous conditions in the formose reaction network starting from glycolaldehyde and *DL*-glyceraldehyde as substrates when in physical contact with a catalytic base. We investigated the influence of the mechanochemical energy input using an oscillatory ball mill and analyzed the product distribution of the formed carbohydrates by gas chromatography mass spectrometry. We can show that the synthesis of carbohydrates is kinetically accelerated under mechanochemical conditions. Our results imply the possibility of a prebiotic carbohydrate origin in geochemical environments scant or devoid of water promoted by mechanochemical forces such as meteorite impacts or lithospheric activity.

Contemplated scenarios for the origin(s) of life are as ample as the variety of building blocks and molecules life is made of. Examples of those are the warm little pond,^[1] hydrothermal vents,^[2] volcanic environments,^[3] drying lagoons,^[4] the primordial soup,^[5] eutectic solutions^[6] or comet ponds.^[7] Whereas each of them addresses distinct open questions in the context of the emergence of life, certain issues remain unresolved. A particular one lies with the contradictory assumption that life was formed in water when several chemical and biologically relevant transformations are condensation reactions that are disfavored in aqueous environments.^[8] In this respect, only a scarce number of mechanochemical approaches^[9] have been identified so far that plausibly demonstrate the formation of biologically relevant molecules when only grinding or milling of dry substrates is used to trigger reactivity. Such examples include the synthesis of α -amino acid derivatives^[10] and modification of nucleosides and nucleotides.^[11] Sources for mechanochemical energy considered are lithospheric activity such as weathering, erosion, diagenetic processes and meteoritic impacts on earth. They can also be accounted for in asteroids tectonics.^[12] Based on our previous interest in the formose reaction network^[13] and publications on the feasibility of aldol reactions in mechanochemical setups,^[14] we investigated the potential formation of carbohydrates under nonaqueous and mechanochemical reaction conditions.

The formose reaction is a prebiotically likely route to carbohydrates based on the oligomerization of formaldehyde (**C1**) through a cascade of cross-, retro- and aldol reactions in

aqueous solutions in the presence of a basic catalyst, typically $\text{Ca}(\text{OH})_2$.^[15] The resulting product mixture contains sugars of different length, constitution and chirality (cf. Scheme 1).^[16] Its detailed mechanism is still elusive though a few prebiotically relevant conditions have been described by which selectivity can be directed.^[17]



Scheme 1. Simplified reaction scheme of the formose reaction network. As a result of sequential aldol reactions, a complex mixture of carbohydrates of different lengths is formed. Individual building blocks are denoted by the number of carbon atoms in the carbohydrate chain.

The diverse mixture of carbohydrates, generally, is analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) involving derivatization of lyophilized analytes. The work-up procedures employed are repeatedly under discussion for bias they invoke by providing suitable reaction conditions for further aldol reactivity.^[18] In our preparatory studies of the formose reaction, we also identified work-up procedures as a root cause for repeatability issues. We found that even the presence of basic catalysts in lyophilized products still promoted aldol reactions. This observation guided us to investigate the hypothesis that carbohydrate synthesis is feasible under nonaqueous conditions.

Since **C1** itself is gaseous and only below $-92.15\text{ }^\circ\text{C}$ solid, it is unsuitable for solid phase reactions in a classic formose reaction. We, therefore, employed glycolaldehyde (**C2**) and *DL*-glyceraldehyde (**C3a**) as smallest carbohydrate building blocks. Both have been shown to be prebiotically relevant and are connected to terrestrial and extra-terrestrial origins.^[18c, 19] As the basic catalyst, we used $\text{Ca}(\text{OH})_2$ which is believed to be part of the limited mineralogical repertoire of the Hadean Eon, the era when life and its building blocks is believed to have formed.^[20] The analysis of our samples was performed by a GC-MS derivation protocol we developed in our group and was tested against bias.^[21] This protocol allows us to determine the product distribution of the formose reaction network by calculating the relative frequency f of bulk sugars (**C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6** and **C7**) present in the mixture. Exemplary chromatograms and carbohydrate identification can be found in the supporting information (SI).

[a] S. Lamour, S. Pallmann, Prof. Dr. O. Trapp
Department Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstr. 5-13, 81377 München
E-mail: oliver.trapp@cup.uni-muenchen.de

[b] S. Lamour, Prof. Dr. O. Trapp
Max-Planck-Institut für Astronomie
Königstuhl 17, 69117 Heidelberg

† The authors contributed equally to the work.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

In a first instance, we investigated the reactivity of **C2** in presence of 20 mol% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at room temperature over the course of a month. The mixed solids were let to rest in a GC glass vial for a defined time interval before immediate derivatization and analysis. Already after 24 hours, we observe the formation of **C4** sugars, namely erythrose, threose and erythrulose making up $(1.12 \pm 0.05) \%$ of the detected reaction mixture. At further reaction progress, the consumption of **C2** increases while **C4** and eventually **C6** sugars form (cf. Figure 1B/C).

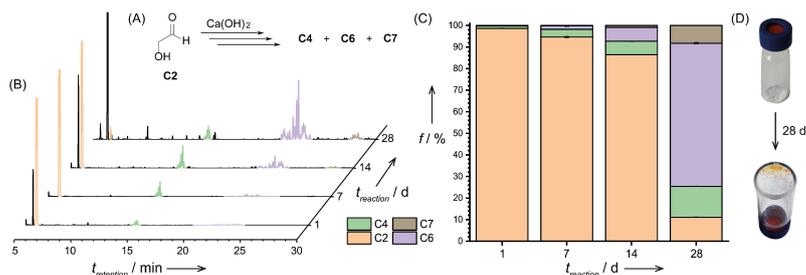


Figure 1. Nonaqueous reaction of **C2** in the presence of 20 mol% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. (A) Reaction Scheme. (B) GC chromatograms of the reaction progress over 28 days. For details see also SI. (C) Product distribution over the course of the reaction. (D) Change of appearance of the reaction mixture. The yellow discoloration is a typical sign of the formose-type reaction.

Among those **C6** carbohydrates formed are tagatose, psicose as well as sorbose and/or fructose. After 28 days, the initially white, powdery mixture turns into a yellow, viscous liquid with **C6** sugars making up $(66.36 \pm 0.37) \%$ (cf. Figure 1D). The change of appearance is a typical sign of a formose-type reaction of carbohydrates and is known as the yellowing point. This is when carbohydrates of higher order and complex branching occur. Further reaction results in an unsolvable tar. Right before this point, we observe **C7** sugars – the highest order carbohydrates resolvable by the here employed GC-MS method. The generation of **C7** sugars – an indication of complex reaction pathways since formal additions of **C2** and multiples thereof can only result in even number carbon skeletons. Therefore, a growing proportion of retro-aldol reactions of long-chained carbohydrates can be considered.

We also investigated the temperature dependence for the initial sugar formation and found that elevated temperatures of (a) 50 °C and (b) 60 °C promote a significant formose-like reaction within half an hour. Relative frequency for **C4** and **C6** were (a) $(7.14 \pm 0.23) \%$ and $(0.88 \pm 0.03) \%$ and (b) $(38.38 \pm 0.90) \%$ and $(5.10 \pm 0.25) \%$, respectively. On the other hand, low temperatures prevented reactivity. Higher temperatures than those mentioned were not investigated due to the low melting point of **C2**. Further data on the temperature dependence is part of the SI.

After substantiating the feasibility of carbohydrate synthesis in nonaqueous conditions, we wondered if this formose-like

reaction can be influenced by an energy source other than temperature. Knowing about mechanochemical approaches in context of aldol reactions,^[9a, 14, 22] we tested ball milling for its ability to promote and/or direct the sugar formation. In our experiments, we used an oscillatory ball mill charged with either **C2** or **C2** and **C3a** together with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (cf. Figure 2A/B). We made sure that for comparability the employed mixtures were of the same total mass. Thus, momentum transfer is equal. Grinding was performed at 30 Hz and did not cause a significant increase in temperature. On average one hour of grinding resulted in a temperature rise of 1 K. Catalyst loading was 20 mol%. We, also, tested for feasibility of lower catalyst loading which was found to slow down the reaction rate. For further details see SI.

In both cases, we found that carbohydrate synthesis is achievable and that the reaction rate is accelerated. Results are depicted in Figure 2. In order to verify the hypothesis that grinding promotes the sugar formation through energy

transfer rather than by efficient homogenization of the reactants, we milled the **C2** samples at 2.5, 5, 7.5 and 10 min and derivatized them all simultaneously after 10 minutes in total so that, for instance, the sample of 2.5 min was left standing for 7.5 min and so on. If efficient homogenization was the sole contributor for an enhanced reactivity, all samples should show the same product distribution as within a minute of milling the substrates are already mixed effectively. However, we observed an exponential consumption of **C2** instead (cf. Figure 2C) and, thus, conclude a kinetic acceleration by mechanochemical energy as cause. In fact, for longer reaction times no significant dependence between reaction progress and milling was found. We explain this observation with a changing aggregate state of the mixture. With proceeding milling time, the reaction mixtures turn, firstly, from white powders into yellow viscous pastes before, secondly, they eventually become dark yellow solids that show no solubility in our derivatization solutions. During the first transition, milling becomes ineffective as the sticky paste decelerates the ball within the milling jar and thus reduces energy transfer. At this time the reaction progress is mainly diffusion controlled and is not accompanied by effective homogenization. As the reactants are already thoroughly mixed and in close contact in the viscous solution, the reaction rate is still sufficiently high. With further reaction progress, the mixture solidifies and becomes responsive to grinding again.

The product distributions for the reactions milled and not milled are similar but not equal. For the final measured data points, the mechanochemical reaction sample consists of about 3.7 times more **C4** while having the same **C2**, half the **C6** and one fifth of the **C7** abundance in relative ratios. This approach, thus, exhibits a different selectivity in favor of shorter carbohydrates. Interestingly, also **C7** sugars are formed probably due to similar reasons as already explained for the non-mechanochemical solid phase reaction of **C2**.

experiments discussed previously, in the presence of **C3** carbohydrates they are effectively consumed for the sake of **C7**. Moreover, **C3b** is formed during the course of the reaction which likely is both the result of enediolization of **C3a** and retro-aldol reactions. In contrast to **C3a** being consumed, **C3b** is enriched over the course of the reaction. A comparison of the MS traces of the **C6** ketoses and aldoses, further, reveals that under mechanochemical conditions aldoses, generally, appear to be disfavored (see SI). As ketoses are thermodynamically more

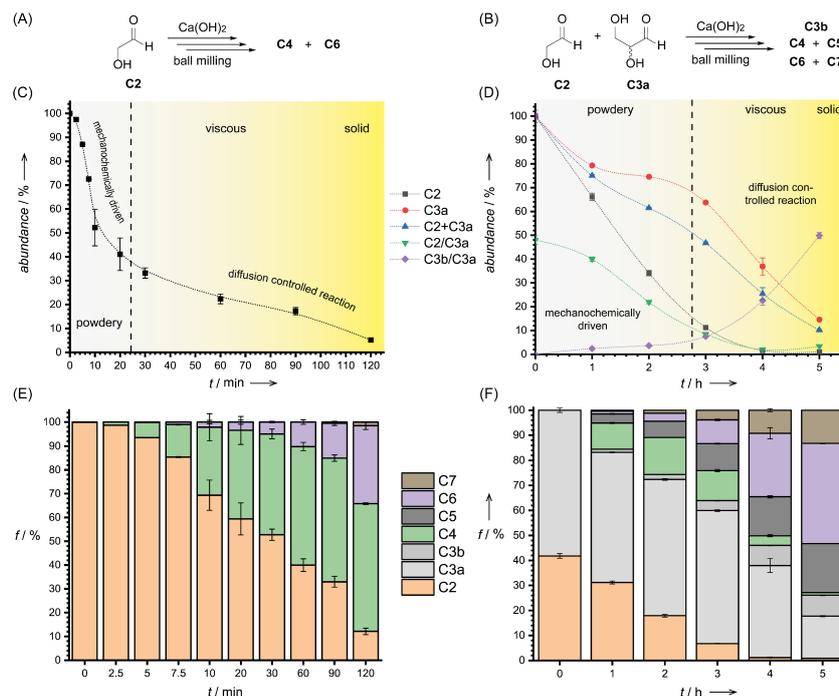


Figure 2. Mechanochemical reaction setup for (A) **C2** and (B) **C2** and **C3a** in the presence of 20 mol% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. (C) Consumption of **C2** over the course of the reaction. (D) Reaction progress by different proxies – **C2** consumption, **C3a** consumption, **C2+C3a** consumption, **C2/C3a** and **C3a/C3b** ratio. (E) and (F) show product distributions for (A) and (B), respectively.

For increasing the complexity of the reaction network, we further, investigated the mechanochemically accelerated reaction of **C2** with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in the presence of **C3a**. This way, also **C5** and **C7** sugars are accessible through direct aldol condensation reactions. In the final product mixture, we detected as main components (16.86 ± 0.20) % **C3a**, (19.63 ± 0.11) % **C5**, (40.06 ± 0.12) % **C6** and (13.18 ± 0.10) % **C7**. Under those conditions, **C6** carbohydrates are favored which is the statistic result of having two possible reaction paths generating them: **C2** + **C2** + **C2** and **C3** + **C3**. Among the sugars formed are xylose, lyxose, arabinose, xylulose, ribulose, ribose, tagatose, psicose, sorbose and fructose. As it can be inferred from Figure 2D, **C2** consumption is considerably faster than the one of **C3a**. **C3a** is only being significantly used up after **C2** is almost 10 times less available. Whereas **C4** carbohydrates were abundant in the

stable than aldoses, we deduce that mechanochemical conditions pose selectivity in carbohydrate synthesis.

In summary, we showed that the formation of carbohydrates in the formose network is not exclusively feasible under an aqueous environment but also establishes under dry conditions. When glycolaldehyde and/or glyceraldehyde are in contact with a basic catalyst ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) higher sugars of complex composition form, among them those of biological relevance such as ribose. Further, we have presented proof that the nonaqueous synthesis of sugars is kinetically accelerated and that its product distribution can be altered in favor of ketoses by mechanochemical energy. Based on those results, we deem it is likely that scenarios of dry and wet cycles, meteoritic impacts and lithospheric activity like volcanism can be an origin for a

complex carbohydrate reaction network. The given example of a solid phase reaction, therefore, widens the narrow scope of identified reactions feasible under conditions devoid of water in the context of the origin(s) of life.

Experimental Section

Sugar formation under nonaqueous conditions: In a 10 mL glass vial, **C2** (1.25 g, 10.4 mmol, 1.00 eq) and calcium hydroxide (310 mg, 4.18 mmol, 0.40 eq [corresponding to dimer]) were mixed using a vortex mixer. In 2 mL glass vials, reaction mixtures of 156 mg were placed in an air-conditioned room at 23 °C.

Mechanochemically promoted synthesis of carbohydrates: A ball mill jar was either charged with a) 125 mg **C2** (1.04 mmol, 1.00 eq) and 31 mg calcium hydroxide (0.42 mmol, 0.40 eq [corresponding to dimer]) or b) 52 mg **C2** (0.43 mmol, 0.50 eq), 78 mg **C3a** (0.43 mmol, 0.50 eq) and 26 mg calcium hydroxide (0.35 mmol, 0.40 eq [corresponding to dimers]). The reaction mixtures were immediately grinded in the CryoMill at a frequency of 30 Hz.

Acknowledgements

The authors thank the Max-Planck-Society and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG CRC/Transregio 235 'Emergence of Life') for their generous financial support. S.P. gratefully acknowledges the Fonds der Chemischen Industrie for a Ph.D. fellowship.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: aldol reaction • carbohydrates • mechanochemistry • prebiotic chemistry • formose reaction network

- [1] C. Darwin, (Ed.: J. D. Hooker), **1871**.
- [2] a) W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 805-814; b) N. Kitadai, R. Nakamura, M. Yamamoto, K. Takai, Y. Li, A. Yamaguchi, A. Gilbert, Y. Ueno, N. Yoshida, Y. Oono, *Sci. Adv.* **2018**, *4*.
- [3] a) C. Huber, W. Eisenreich, G. Wächtershäuser, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1069-1071; b) Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, T. Namba, *Nature* **1991**, *352*, 516-519.
- [4] a) M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *375*, 772-774; b) R. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 4396-4401; c) R. Shapiro, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 275-278.
- [5] a) B. M. Rode, D. Fitz, T. Jakschitz, *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 2674-2702; b) J. L. Bada, *Earth. Planet. Sci. Lett.* **2004**, *226*, 1-15.
- [6] a) M. Gull, M. Zhou, F. M. Fernandez, M. A. Pasek, *J. Mol. Evol.* **2014**, *78*, 109-117; b) C. Menor-Salvan, M. R. Marin-Yaseli, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5404-5415.
- [7] a) B. Clark, V. Kolb, *Life* **2018**, *8*, 12; b) B. C. Clark, *Origins Life Evol. Biosphere* **1988**, *18*, 209-238; c) V. R. Oberbeck, H. Aggarwal, *Origins Life Evol. Biosphere* **1991**, *21*, 317-338.
- [8] a) A. Mariame, J. Maguy, M. Marie-Christine, L. Jean-Francois, G. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7920-7923; M. Akouche, M. Jaber, M.-C. Maurel, J.-F. Lambert, T. Georgelin, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 8028-8031; b) P. V. Coveney, J. B. Swadling, J. A. Wattis, H. C. Greenwell, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5430-5446.
- [9] a) G.-W. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7668-7700; b) E. Boldyreva, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7719-7738.
- [10] a) C. Bolm, R. Mocchi, C. Schumacher, M. Turberg, F. Puccetti, J. G. Hernández, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2423-2426; C. Bolm, R. Mocchi, C. Schumacher, M. Turberg, F. Puccetti, J. G. Hernández, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 2447-2450; b) C. Bolm, J. G. Hernández, *ChemSusChem* **2018**, *11*, 1410-1420.
- [11] O. Eguagie, J. S. Vyle, P. F. Conlon, M. A. Gilea, Y. Liang, *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 955-970.
- [12] D. Buczkowski, D. Wyrick, in *European Planetary Science Congress*, Vol. 10, **2015**.
- [13] S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys* **2018**, *20*, 055003.
- [14] a) R. Belén, B. Angelika, B. Carsten, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4710-4722; b) A. S. Heintz, J. E. Gonzales, M. J. Fink, B. S. Mitchell, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2009**, *304*, 117-120.
- [15] a) A. Butlerow, *Ann. Chem. Pharm.* **1861**, *120*, 295-298; b) R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 22-26; c) I. V. Delidovich, A. N. Simonov, O. P. Taran, V. N. Parmon, *ChemSusChem* **2014**, *7*, 1833-1846; d) Z. Iqbal, S. Novalin, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 769-788.
- [16] a) R. Socha, A. Weiss, M. Sakharov, *J. Catal.* **1981**, *67*, 207-217; b) H. Tambawala, A. H. Weiss, *J. Catal.* **1972**, *26*, 388-400; c) W. P. Huskey, I. R. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3157-3163; d) A. N. Simonov, O. P. Pestunova, L. G. Matvienko, V. N. Parmon, *Kinet. Catal.* **2007**, *48*, 245-254.
- [17] a) H. J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468; b) A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, *Science* **2004**, *303*, 196; c) D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, C. E. Wintner, A. Eschenmoser, G. Ohloffgewidmet, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1410-1468.
- [18] a) J. Kawai, *Science* **2017**, *355*, 141-141; b) C. Meinert, I. Myrgorodska, P. de Marcellus, T. Buhse, L. Nahon, S. V. Hoffmann, L. L. S. d'Hendecourt, U. J. Meierhenrich, *Science* **2017**, *355*, 141-141; c) C. Meinert, I. Myrgorodska, P. de Marcellus, T. Buhse, L. Nahon, S. V. Hoffmann, S. d'Hendecourt Lle, U. J. Meierhenrich, *Science* **2016**, *352*, 208-212.
- [19] a) D. Ritson, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 895-899; b) H. J. Cleaves II, *Precambrian Res.* **2008**, *164*, 111-118; c) P. de Marcellus, C. Meinert, I. Myrgorodska, L. Nahon, T. Buhse, S. d'Hendecourt Lle, U. J. Meierhenrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 965-970; d) F. Goesmann, H. Rosenbauer, J. H. Bredehoft, M. Cabane, P. Ehrenfreund, T. Gautier, C. Giri, H. Kruger, L. Le Roy, A. J. MacDermott, S. McKenna-Lawlor, U. J. Meierhenrich, G. M. Munoz Caro, F. Raulin, R. Roll, A. Steele, H. Steininger, R. Sternberg, C. Szopa, W. Thiemann, S. Ulamec, *Science* **2015**, *349*, aab0689; e) V. P. McCaffrey, N. E. Zellner, C. M. Waun, E. R. Bennett, E. K. Earl, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2014**, *44*, 29-42.
- [20] R. M. Hazen, *Am. J. Sci.* **2013**, *313*, 807-843.
- [21] M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.
- [22] a) P. Chauhan, S. S. Chimni, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2132-2141; b) B. Rodríguez, T. Rantanen, C. Bolm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6924-6926; B. Rodríguez, T. Rantanen, C. Bolm, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7078-7080; c) H. Kulla, S. Haferkamp, I. Akhmetova, M. Röllig, C. Maierhofer, K. Rademann, F. Emmerling, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5930-5933; H. Kulla, S. Haferkamp, I. Akhmetova, M. Röllig, C. Maierhofer, K. Rademann, F. Emmerling, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 6034-6038.

Supporting Information

Prebiotic Sugar Formation Under Nonaqueous Conditions and Mechanochemical Acceleration in the Formose Reaction Network

Saskia Lamour, Sebastian Pallmann and Oliver Trapp*

Abstract: The formose reaction network is considered a prebiotically likely route to biologically relevant sugars. Here we report on the feasibility of the formation of carbohydrates under nonaqueous conditions in the formose reaction network starting from glycolaldehyde and *DL*-glyceraldehyde as substrates when in physical contact with a catalytic base. We investigated the influence of the mechanochemical energy input using an oscillatory ball mill and analyzed the product distribution of the formed carbohydrates by gas chromatography mass spectrometry. We can show that the synthesis of carbohydrates is kinetically accelerated under mechanochemical conditions. Our results imply the possibility of a prebiotic carbohydrate origin in geochemical environments scant or devoid of water feasibly promoted by mechanochemical forces such as meteorite impacts or lithospheric activity.

Table of Contents

| | |
|---|---|
| Table of Contents | 2 |
| Experimental Procedures | 2 |
| Identification of Carbohydrates | 3 |
| Temperature Dependence for Sugar Formation under Nonaqueous Conditions | 4 |
| Repeatability Study | 5 |
| Catalyst Loading | 5 |
| Comparison of Abundance of C6 Ketoses and Aldoses for different Reaction Setups | 6 |
| Tabular Data for depicted Figures | 7 |
| References | 9 |
| Author Contributions | 9 |

Experimental Procedures

Chemicals:

All chemicals were used as received. *O*-ethylhydroxylamine hydrochloride (99%), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) (99%), pyridine (99%), glycolaldehyde dimer (mixture of stereoisomers) and DL-glyceraldehyde dimer (95%) were purchased from Sigma-Aldrich. Calcium hydroxide (pro analysi) was supplied by the chemical store of the Faculty for Chemistry and Pharmacy of the Ludwig-Maximilian University Munich, Germany.

Instrumentations:

1) *vortex mixer*

The vortex mixer Lab Dancer by VWR (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) was used for mixing solids.

2) *ball milling*

For mechanochemically promoted reactions, the oscillatory ball mill *CryoMill* by Retsch (Retsch GmbH, Haan, Germany) was employed equipped with an adapter to fit up to four 5 mL stainless steel ball mill jars each filled with one 7 mm stainless steel ball.

3) *Infrared temperature sensor*

Temperatures of reaction mixtures within the ball milling jar were determined immediately after stopping the grinding and usage of the infrared temperature sensor VOLTCRAFT IR 260-8S by Conrad (Hirschau, Germany).

4) *gas chromatography*

GC analysis of carbohydrate mixtures was performed on a *TraceGC Ultra* system coupled to either a *PolarisQ MS* (quadrupole-ion mass spectrometer [MS]) or an *ISQ single quadrupole MS* (Thermo Scientific, San Jose, California, USA) operated by Xcalibur software 1. SR1 or 2.2 SP1, respectively. Injections used a split/splitless injector in split mode at 250 °C. Flame ionization detection was co-recorded with MS data and operated under carbon-correction at 250 °C.

Reaction Setups:

1) *formose type aldol reaction of glycolaldehyde under nonaqueous conditions*

In a 10 mL glass vial, glycolaldehyde dimer **C2** (1.25 g, 10.4 mmol, 1.00 eq) and calcium hydroxide (310 mg, 4.18 mmol, 0.40 eq [corresponding to dimer]) were mixed using a vortex mixer. In 2 mL glass vials capped with PTFE/silicone/PTFE septa, reaction mixtures of 156 mg were placed in an air-conditioned room at 23 °C.

2) *mechanochemically amplified synthesis of carbohydrates*

A ball mill jar was either charged with a) 125 mg glycolaldehyde dimer **C2** (1.04 mmol, 1.00 eq) and 31 mg calcium hydroxide (0.42 mmol, 0.40 eq [corresponding to dimer]) or b) 52 mg glycolaldehyde dimer **C2** (0.43 mmol, 0.50 eq), 78 mg glycolaldehyde dimer **C3a** (0.43 mmol, 0.50 eq) and 26 mg calcium hydroxide (0.35 mmol, 0.40 eq [corresponding to the dimers]). The reaction mixtures were immediately grinded in the *CryoMill* at a frequency of 30 Hz. For experiments to be comparable, mill jars were charged with equal amounts of reactant masses rather than mols so that the energy transfer in terms of momentum is constant.

If not analyzed immediately, samples were stored at -196 °C in liquid nitrogen to prevent further reaction.

GC-MS Detection of Carbohydrates:

GC-MS detection of carbohydrates followed a published protocol.^[1] In short:

1) *derivatization*

About 2 to 5 mg of sample was dissolved in 200 μ L pyridine, mixed with 200 μ L of a 40 mg/mL *O*-ethylhydroxylamine hydrochloride solution with 50 mM phenyl- β -D-glucopyranoside as internal standard and heated for 30 min at 70 °C on a rocking shaker. To this mixture, 120 μ L BSTFA was added and the resulting solution was heated again for 30 min at 70 °C.

2) *separation*

The derivatized sugars were separated on a SE-52 column (14 m length, ID 250 nm, 250 nm film thickness) with 80 kPa helium using the following temperature program: beginning at 50 °C for 2 min and increasing temperature by 10 K/min to 140 °C and then 5 K/min to 240 °C and keeping that temperature for 2 min. Due to E/Z-isomerism of oximes, carbohydrate analytes can show two signals.

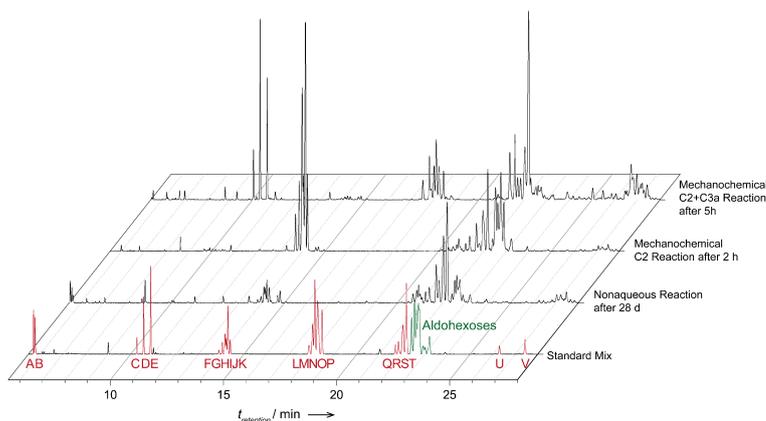
Determination of Relative Frequency *f*.

Areas of respective carbohydrate bulks (C2, C3a, C3b, C4, C5, C6 and C7) were corrected by their numbers of C atoms and individually related to the sum of the integrals to access their abundances in terms of relative frequencies. Errors of relative frequencies are standard deviations of duplicate or triplicate reaction setups and duplicate GC separations.

Identification of Carbohydrates

Individual carbohydrates and bulks were detected and relatively quantified using the protocol by Trapp and co-workers.^[1] Identification is based on retention times and MS spectra of standard mixtures. Exemplary chromatograms for each of the presented reactions in comparison to the standard mix are given in Figure S1. Due to possible E/Z isomerism, carbohydrate analytes can show two signals.

Figure S1. Comparative GC chromatograms for the presented reactions and the standard mix. For method details see experimental section. The given letters denote the following carbohydrates: A/B) glycolaldehyde (**C2**), C/D) glycolaldehyde (**C3a**), E) dihydroxyacetone (**C3b**), F/H) erythrose, G/J) threose, I/K) erythrulose, L/M) xylose, L/N) lyxose, N) arabinose, O) xylulose, O) ribulose, P) ribose, Q/S) tagatose, R/S) psicose, T) sorbose, T) fructose, U/V) galactoheptose. **Ketohexoses (Q,R,S,T)** and **aldohexoses** can be identified by their characteristic fragments: 319 m/z and 379 m/z for aldoses and ketoses, respectively.

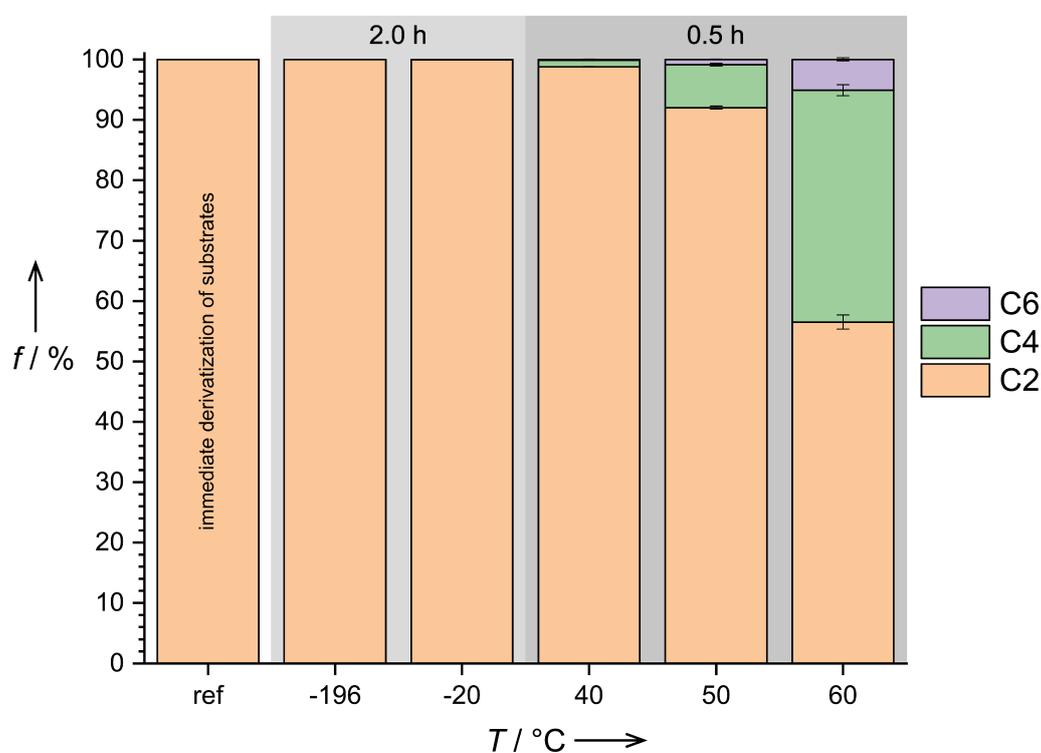


Distinct **C3** and **C4** constitutional carbohydrate isomers can be identified unambiguously. Observed **C3** carbohydrates are glyceraldehyde (**C3a**), dihydroxyacetone (**C3b**); **C4** carbohydrates are erythrose, threose, erythrulose. **C5**, **C6** and **C7** cannot be unequivocally distinguished. From comparison with the unbranched standards, it is likely, though, that the mixtures contain all known unbranched carbohydrates.

Temperature Dependence for Sugar Formation under Nonaqueous Conditions

The reaction rate of the sugar formation under nonaqueous conditions is temperature dependent. We investigated the conversion for different temperatures and times. The results are given in Figure S2. Higher temperatures facilitate the successive aldol reactions for the formation of higher carbohydrates in a shorter time. Therefore, it is necessary to freeze samples in liquid nitrogen until they can be derivatized and analyzed by GC-MS. For aldol or formose reactions performed in water, the authors, therefore, want to highlight that bias is introduced to samples when employing lyophilization during work-up procedures. Under such conditions, further reaction is possible due to presence of a basic catalyst.

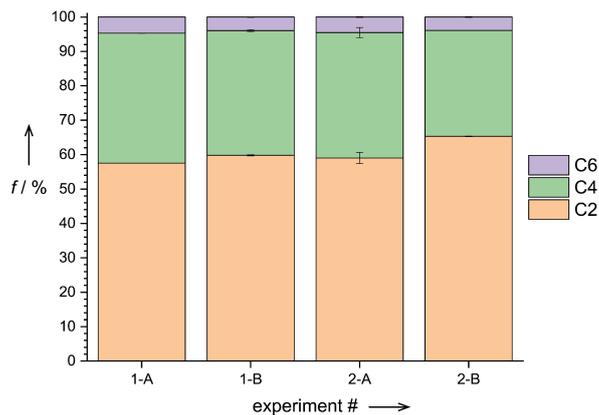
Figure S2. Produce distribution of carbohydrate formation under nonaqueous conditions for different temperatures and times. Whereas already after 0.5 hours reaction progress can be determined for elevated temperatures, low temperatures do not show any conversion even after 2.0 hours. Samples, thus, can be stored for some time under low temperatures. In contrast to the general derivatization protocol described in the experimental procedure section, hydroxylamine hydrochloride was used instead of O-ethylhydroxylamine hydrochloride for the experiments of two-hour reaction time.



Repeatability Study

All experiments were performed in parallel repetitions. The following data depicts the results of two sets (1 and 2) of one reaction performed one week apart and analyzed with two separately prepared derivatization solutions (A and B). Each GC measurement was run twice. The deviations of observed areas correspond to the error bars. For reaction conditions see reaction setup #2 of the experimental section. Reaction times were 60 min.

Figure S3. Repeatability study for one reaction performed twice each time one week apart (denoted as 1 and 2) and analysed with two separately prepared derivatization solutions (A and B). Each GC analysis was run twice. Deviations of areas correspond to error bars. Reaction conditions of the experiment studied are described in the experimental section under reaction setup #2. Reaction times were 60 min.

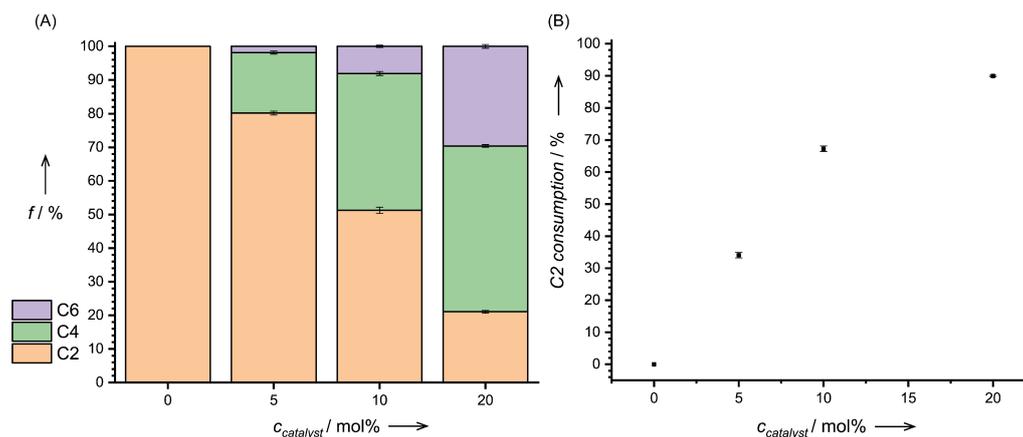


Based on the repeatability study, we assess the percentage error of the relative frequency of carbohydrates to be at maximum 5 %.

Catalyst Loading

We investigated the catalyst loading in terms of product distribution and substrate consumption (C2 – glycolaldehyde) under conditions given in the experimental section for reaction setup #2. Reaction times were 90 min.

Figure S4. Dependency of (A) product distribution and (B) substrate consumption (C2 – glycolaldehyde) on catalyst loading. Catalyst loading is in reference to glycolaldehyde monomer.

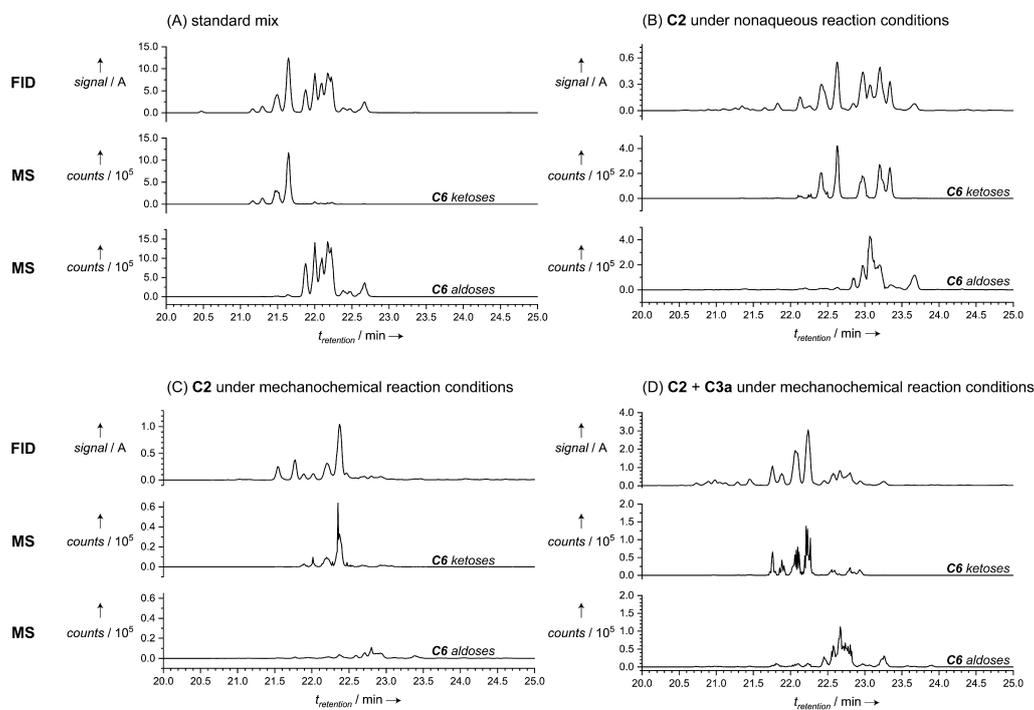


Our investigations show that the reaction rate is dependent on the catalyst loading. We, therefore, argue that even small amounts of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ are sufficient to trigger the aldose reactions allowing access to the formose reaction network of more complex sugars. It can be envisioned that the slower generation of higher carbohydrates gives way to specific serial reactions with other reactants like amines. In our studies presented here we characteristically employ catalyst loading typical of the formose reaction studied in literature to allow for comparability. Our data, further, implies that with 20 mol% catalyst loading the **C2** consumption reaches saturation.

Comparison of Abundance of C6 Ketoses and Aldoses for different Reaction Setups

For discussed reaction setups, we compare the amount of **C6** ketoses and **C6** aldoses that was formed. For that purpose, the extracted-ion chromatograms (XIC) for characteristic fragments (319 m/z for **C6** aldoses and 379 m/z for **C6** ketoses) are depicted together with the FID signals of respective reactions. The data implies that **C6** aldoses are disfavored in mechanochemical reaction setups.

Figure S5. Comparison of C6 ketose and aldose abundances for different experimental setups. FID and XIC traces are depicted. The results show that under mechanochemical conditions ketoses are favoured.



Tabular Data for depicted Figures

Figure 1C

Table S1. Data for the bar graph in Figure 1C.

| time (d) | f:C2 (%) | f:C4 (%) | f:C6 (%) | f:C7 (%) |
|----------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 1 | 98.63 ± 0.10 | 1.12 ± 0.05 | 0.24 ± 0.05 | 0.00 ± 0.00 |
| 7 | 94.66 ± 0.30 | 3.54 ± 0.06 | 1.62 ± 0.24 | 0.18 ± 0.01 |
| 14 | 86.47 ± 0.04 | 6.22 ± 0.16 | 6.42 ± 0.15 | 0.88 ± 0.05 |
| 28 | 11.08 ± 0.14 | 14.33 ± 0.12 | 66.36 ± 0.37 | 8.24 ± 0.13 |

Figure 2C

Table S2. Data for the point line chart in Figure 2C.

| time (min) | abundance:C2 (%) |
|------------|------------------|
| 0.0 | 99.95 ± 0.03 |
| 2.5 | 97.47 ± 0.03 |
| 5.0 | 87.07 ± 0.09 |
| 7.5 | 72.58 ± 0.33 |
| 10.0 | 52.23 ± 7.68 |
| 20.0 | 41.07 ± 6.83 |
| 30.0 | 33.19 ± 2.16 |
| 60.0 | 22.36 ± 2.01 |
| 90.0 | 17.27 ± 1.49 |
| 120.0 | 5.19 ± 0.66 |

Figure 2D

Table S3. Data for the point line chart in Figure 2D.

| time (h) | abundance:C2 (%) | abundance:C3a (%) | abundance:C2+C3a (%) | abundance:C2/C3a (%) | abundance:C3b/C3a (%) |
|----------|------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 0 | 100.00 ± 2.55 | 100.00 ± 1.22 | 100.00 ± 0.00 | 48.00 ± 1.83 | 0.00 ± 0.00 |
| 1 | 66.13 ± 1.55 | 79.29 ± 0.15 | 75.03 ± 0.54 | 39.96 ± 0.91 | 2.41 ± 0.03 |
| 2 | 34.10 ± 1.12 | 74.58 ± 0.25 | 61.47 ± 0.28 | 21.91 ± 0.77 | 3.63 ± 0.02 |
| 3 | 11.26 ± 0.25 | 63.72 ± 0.63 | 46.73 ± 0.50 | 8.46 ± 0.11 | 7.48 ± 0.25 |
| 4 | 1.61 ± 0.32 | 36.88 ± 3.59 | 25.46 ± 2.53 | 2.01 ± 0.22 | 22.59 ± 2.03 |
| 5 | 1.02 ± 0.05 | 14.60 ± 0.18 | 10.20 ± 0.14 | 3.34 ± 0.13 | 49.88 ± 1.30 |

Figure 2E

Table S4. Data for the bar graph in Figure 2E.

| time (min) | f:C2 (%) | f:C4 (%) | f:C6 (%) | f:C7 (%) |
|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 0.0 | 99.87 ± 0.02 | 0.13 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 2.5 | 98.69 ± 0.02 | 1.31 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 5.0 | 93.50 ± 0.05 | 6.31 ± 0.04 | 0.18 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 7.5 | 85.36 ± 0.21 | 13.61 ± 0.19 | 1.03 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 |
| 10.0 | 69.34 ± 6.36 | 28.49 ± 5.65 | 2.17 ± 0.70 | 0.00 ± 0.00 |
| 20.0 | 59.39 ± 6.71 | 37.15 ± 5.87 | 3.46 ± 0.85 | 0.00 ± 0.00 |
| 30.0 | 52.74 ± 2.40 | 42.26 ± 2.07 | 5.00 ± 0.35 | 0.00 ± 0.00 |
| 60.0 | 39.97 ± 2.70 | 49.83 ± 1.75 | 10.20 ± 0.95 | 0.00 ± 0.00 |
| 90.0 | 32.97 ± 2.28 | 52.98 ± 1.35 | 14.54 ± 0.89 | 0.50 ± 0.05 |
| 120.0 | 12.10 ± 1.37 | 53.68 ± 0.36 | 32.69 ± 1.59 | 1.53 ± 0.14 |

Figure 2F

Table S5. Data for the bar graph in Figure 2F.

| time (h) | f:C2 (%) | f:C3a (%) | f:C3b (%) | f:C4 (%) | f:C5 (%) | f:C6 (%) | f:C7 (%) |
|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 0 | 41.80 ± 0.91 | 58.20 ± 0.91 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 1 | 31.19 ± 0.59 | 52.05 ± 0.21 | 1.25 ± 0.01 | 10.39 ± 0.21 | 3.64 ± 0.16 | 1.11 ± 0.05 | 0.37 ± 0.01 |
| 2 | 17.90 ± 0.53 | 54.50 ± 0.33 | 1.98 ± 0.02 | 14.71 ± 0.07 | 6.47 ± 0.10 | 3.24 ± 0.09 | 1.20 ± 0.04 |
| 3 | 6.75 ± 0.12 | 53.19 ± 0.32 | 3.98 ± 0.13 | 12.03 ± 0.46 | 10.81 ± 0.21 | 9.37 ± 0.32 | 3.86 ± 0.13 |
| 4 | 1.14 ± 0.20 | 36.81 ± 2.80 | 8.09 ± 0.12 | 3.84 ± 0.43 | 15.61 ± 0.48 | 25.29 ± 2.24 | 9.22 ± 0.60 |
| 5 | 0.85 ± 0.04 | 16.86 ± 0.20 | 8.40 ± 0.13 | 1.04 ± 0.01 | 19.63 ± 0.11 | 40.06 ± 0.12 | 13.18 ± 0.10 |

Figure S2

Table S6. Data for the bar graph in Figure S2.

| temperature (°C) | f:C2 (%) | f:C4 (%) | f:C6 (%) |
|---------------------|---------------|--------------|-------------|
| Reference | 100.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| -196 ^[a] | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| -20 ^[a] | 99.94 | 0.06 | 0.00 |
| 40 | 98.80 ± 0.02 | 1.04 ± 0.02 | 0.16 ± 0.01 |
| 50 | 91.98 ± 0.26 | 7.14 ± 0.23 | 0.88 ± 0.03 |
| 60 | 56.52 ± 1.16 | 38.38 ± 0.91 | 5.10 ± 0.25 |

[a] Experiments were not performed in multiples. Therefore, there is no determined error.

Figure S3

Table S7. Data for the bar graph in Figure S3.

| identifier | f.C2 (%) | f.C4 (%) | f.C6 (%) |
|------------|--------------|--------------|-------------|
| 1-A | 57.54 ± 0.02 | 37.76 ± 0.05 | 4.71 ± 0.07 |
| 1-B | 59.81 ± 0.17 | 36.22 ± 0.28 | 3.96 ± 0.11 |
| 2-A | 59.02 ± 1.63 | 36.44 ± 1.47 | 4.54 ± 0.16 |
| 2-B | 65.31 ± 0.13 | 30.79 ± 0.01 | 3.90 ± 0.14 |

Figure S4A

Table S8. Data for the bar graph in Figure S4A.

| Catalyst loading (mol%) | f.C2 (%) | f.C4 (%) | f.C6 (%) |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 0 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| 5 | 80.21 ± 0.57 | 17.93 ± 0.46 | 1.85 ± 0.12 |
| 10 | 51.26 ± 0.92 | 40.66 ± 0.59 | 8.09 ± 0.33 |
| 20 | 21.07 ± 0.37 | 49.35 ± 0.38 | 29.58 ± 0.57 |

Figure S4B

Table S9. Data for the point chart in Figure S4B.

| Catalyst loading (mol%) | C2 consumption (%) |
|-------------------------|--------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 |
| 5 | 34.04 ± 0.84 |
| 10 | 67.30 ± 0.85 |
| 20 | 89.89 ± 0.22 |

References

- [1] M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.

Author Contributions

SL, SP and OT collectively designed the research project and experiments. SL performed most of the experiments. SP and SL analyzed and evaluated the data. SP and SL wrote the paper. OT originated and supervised the research.

7. Zusammenfassung

Im Folgenden sollen die Ergebnisse und die daraus gewonnenen Schlussfolgerungen zu den in dieser Dissertation bearbeiteten Fragestellungen zusammengefasst werden. Dazu unterteilt sich dieser Abschnitt Bezug nehmend auf **Kapitel 6 Aufgabenstellung** in zwei Themenbereiche: (1) die Untersuchung und Aufklärung von präbiotischen Reaktionsnetzwerken und (2) die Implementierung einer auf Hadamard-Transformation basierenden Multiplexing-Methode in der Kapillarelektrophorese ohne Hardware-basierte Modifikationen.

(1) Untersuchung und Aufklärung von präbiotischen Reaktionsnetzwerken

Zu dieser Aufgabenstellung wurden insgesamt drei Projekte bearbeitet, deren Ergebnisse nachfolgend dargestellt sind. Dabei sei auf die graphische Zusammenfassung in **Abbildung 13** verwiesen.

(a) Abschließende Untersuchung und Charakterisierung der stereodynamischen Tetrahydrobiisoindol-Liganden „NU-BIPHEP(O)s“ als Modellsysteme für asymmetrische Amplifikationen

Das bereits vor der Promotion eröffnete Projekt zur Synthese einer neuen Klasse von stereodynamischen Liganden auf der Grundlage von Biphenylen wurde mit Beginn der Dissertation abgeschlossen. In diesem Projekt wurden auf Grundlage der Arbeiten von Doherty *et al.* sogenannte „NU-BIPHEP(O)s“ mit Hilfe der etablierten Rhodium katalysierten [2+2+2] Cycloaddition eines 1,4-Bis(diphenylphosphanyl)buta-1,3-diins und einer Di(prop-2-in-1-yl)-Einheit mit Methylen- oder geschütztem Stickstoffzentrum synthetisiert. Die dabei erhaltenen Biisoindolin-Derivate waren für die Modifikation im Rückgrat mit Selektoren der Zielstruktur 3,5-Dichlorobenzylamidyl geeignet. Das so zugängliche System aus einem stereodynamischen Liganden mit 3-Punkt-Wechselwirkungsstelle (Wasserstoffbrückenakzeptor, -donor und π - π -Interaktion) im Rückgrat war Teil einer größeren Studie zur Entwicklung von Modellsystemen zur Realisierung von selbst-amplifizierenden Katalysatorsystemen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die beschriebenen und synthetisierten Systeme abschließend hinsichtlich ihrer Rotationsbarrieren und Fähigkeit zur nicht-kovalenter Wechselwirkung untersucht. Dazu wurden zum einen NMR-Studien zur Interaktion mit Okamoto-artigen Cellulose-Derivaten (chirales Stationärphasenmaterial) und on-column Deracemisierungen und zum anderen Bestimmungen der Rotationsbarrieren mittels enantioselektiver dynamischer HPLC durchgeführt. In den $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Studien konnte aufgrund Signalsplitting gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Interaktion in Form von diastereomerer Adduktbildung kommt. Das beobachtete Splitting lag zwischen $\Delta\delta = 0.3$ und $\Delta\delta = 0.41$ ppm. Für die Rotationsbarrieren konnten Werte von $\Delta G_{298\text{K}}^\ddagger = 92.2 \pm 0.3$ und $\Delta G_{298\text{K}}^\ddagger = 99.5 \pm 0.1$ kJ mol $^{-1}$ bestimmt werden. Damit lagen die

Zusammenfassung

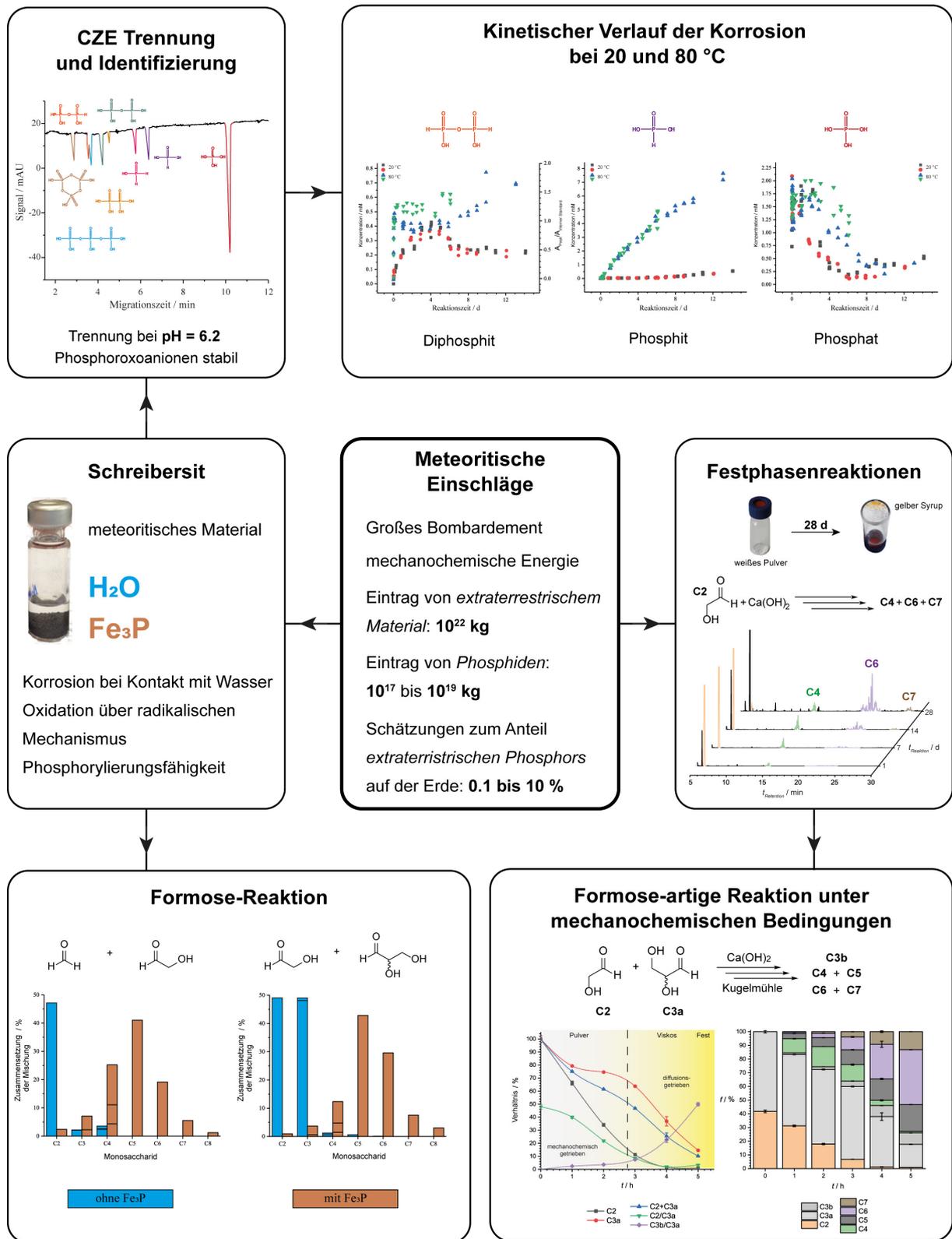


Abbildung 13. Graphische Zusammenfassung zu Untersuchung und Aufklärung von präbiotischen Reaktionsnetzwerken. Individuelle Darstellungen übersetzt, modifiziert und mit Erlaubnis wiedergegeben von S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003. Copyright Creative Commons Attribution 3.0.

Rotationsbarrieren nach jetzigem Wissensstand für eine mögliche selbstamplifizierende Katalyse zu hoch. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben dennoch einen Beitrag zum Verständnis und zur Entwicklung stereodynamischer Liganden nach Design geleistet. Die Ergebnisse zu diesem Projekt wurden in Zusammenarbeit mit Golo Storch erhalten und sind veröffentlicht in: Golo Storch, Sebastian Pallmann, Frank Rominger und Oliver Trapp, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, 12, 1453-1458.²¹²

(b) Untersuchung des meteoritischen Materials Schreibersits (Fe_3P) in Bezug auf Korrosionsverhalten in Wasser, der effektiven Phosphorylierungsfähigkeit und Reaktivität gegenüber kleinen organischen Molekülen

Eine zentrale Fragestellung im Zusammenhang mit der Erforschung des Ursprungs des Lebens besteht in der Aufklärung von möglichen, präbiotischen Phosphorylierungswegen. Eine diskutierte Alternative ist das meteoritische Mineral Schreibersit (Fe_3P), das unter Wasserkontakt korrodiert und dabei reaktive Phosphoroxo-Anionen und -Radikale freisetzt, die nachweislich Glycerol und Nukleoside, wenn auch unter schlechter Ausbeute phosphorylieren können. Welche Phosphoroxo-Anionen spezifisch und in welcher Konzentration bei welchen Bedingungen entstehen, ist nur teilweise in der Literatur untersucht und dort strittig. Im Rahmen dieses Projektes wurde zunächst eine kapillarelektrophoretische Trennungsmethode entwickelt, mit deren Hilfe nicht nur die relevanten Spezies identifiziert, sondern auch über den Verlauf der Korrosion bei unterschiedlichen Bedingungen verfolgt werden konnte. Dabei unterscheidet sich die Methode von bisherigen in der Literatur verwendeten Ansätzen dadurch, dass keine Aufarbeitungsschritte notwendig sind, welche die Produktverteilung stören und verändern können. Der Grund dafür liegt in der pH-Empfindlichkeit der Phosphoroxo-Anionen. Die hier etablierte Methode nutzt einen neutralen pH-Wert (6.2), unter welchem die Spezies hinreichend stabil sind. Mit dieser Trenntechnik konnten so in Lösung Phosphit, Phosphat und Diphosphit detektiert werden. Ihr Konzentrationsprofil wurde für 20 °C und 80 °C über den Verlauf mehrerer Tage aufgenommen und es konnte gefunden werden, dass sich Phosphit als Hauptkomponente anreichert. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die reaktive Korrosionsmischung hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsfähigkeit gegenüber kleinen, organischen Molekülen wie Methanol, Formaldehyd, Glykolaldehyd, Glyceraldehyd, Ethanolamin, Cholin und Inositol getestet. Dazu wurden die Reaktionen NMR-, MS- und CE-basiert analysiert. Es konnten jedoch unter den angesetzten Bedingungen keine signifikanten Mengen phosphorylierten Materials nachgewiesen werden. Dafür wurde bei Anwesenheit kleiner Monosaccharide der Ablauf der Formose-Reaktion beobachtet. Ursächlich dafür ist die Basifizierung des Reaktionsmilieus durch Oxidation des Phosphors und Eisens unter Freisetzung von Wasserstoff und die Anwesenheit von Fe(II)-Ionen, die zusammen den konsekutiven Ablauf von Aldol- und Retro-Aldolreaktionen im Formose-Netzwerk katalysieren. Dieser Teil der

Zusammenfassung

Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit Jana Šteflová und Ann-Kathrin Henß erhalten und ist veröffentlicht in S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003.⁵⁶

(c) Untersuchung und Aufklärung von Reaktionsbedingungen zur präbiotischen Bildung von Monosacchariden

Auf Grundlage der Ergebnisse zum Einfluss von Schreibersit auf die Bildung von Monosacchariden wurden Mischungen aus Formaldehyd, Glykolaldehyd, Glyceraldehyd und Dihydroxyaceton einzeln und in Kombination miteinander den korrosiven Bedingungen von Fe_3P in Wasser ausgesetzt. Mittels GC-MS wurden die erhaltenen Monosaccharid-Produktverteilungen analysiert. Dabei wurde gefunden, dass für alle Komponenten eine Formose beziehungsweise Formose-artige Reaktion ausgelöst wird; mit Ausnahme von Formaldehyd, der einen endiolisierenden Ko-Katalysator wie Glykolaldehyd oder Glyceraldehyd erfordert. Dabei werden innerhalb eines Tages bei 80 °C bevorzugt C5 Zucker gebildet, darunter Ribose in nur geringem Umfang. Nach 7 Tagen ist das Produktverhältnis zugunsten von C6-Zuckern verschoben. Die Beständigkeit der Monosaccharid-Mischung über die angegebenen Zeiträume ist für Formose-Reaktion untypisch und impliziert eine Stabilisierung der Produkte innerhalb des Schreibersit-Milieus. Die Ergebnisse zeigen gesamtheitlich, dass das genannte meteoritische Mineral in der Lage ist, nicht nur eine an Phosphor-Spezies, sondern auch an Monosacchariden angereicherte Umgebung zu erzeugen. Auf diese Weise lassen sich unter dem Meteoriten-Teich-Szenario Phosphor- und Zucker-Chemie zusammenhängend und sich einander beeinflussend denken. Es handelt sich dabei um eines der ersten Beispiele, die extraterrestrisches Material mit Reaktionen auf der Erde verbinden. Diese Ergebnisse wurden in Kooperation mit Saskia Lamour und Maren Haas erhalten und sind Bestandteil der nachgenannten Publikation: S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003.⁵⁶

Ausgehend von den Überlegungen zu Einflüssen und Effekten von Einschlagsszenarien von Meteoriten wurde anknüpfend an die Monosaccharid-Synthese die Durchführbarkeit von Aldolreaktionen unter mechanochemischen und nicht-wässrigen Bedingungen getestet. Dazu wurden Glykolaldehyd und Glyceraldehyd als nachweisliche Komponenten astronomischer Himmelskörper und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als basischer Katalysator eingesetzt. Mechanochemische Krafteinwirkung wurde mittels einer Schwingkugelmühle nachgebildet. Dabei konnte gefunden werden, dass die Monosaccharidsynthese ausgehend von Glykolaldehyd nicht ausschließlich auf wässrige Medien limitiert ist, sondern auch wasserfrei abläuft. In einem Prozess, der über einen Monat überwacht wurde, konnte die Bildung von C4-, C6- und C7-Zucker verfolgt werden. Nicht-wässrige Reaktionen sind insofern interessante Alternativen im Zusammenhang mit dem Ursprung des Lebens, als dass widersprüchlicher Weise ein Großteil biologisch

relevanter Reaktionen Kondensationsreaktionen sind, die im wässrigen Milieu thermodynamisch benachteiligt sind. Unter mechanochemischer Krafteinwirkung konnte zudem gezeigt werden, dass die Aldolreaktionen sowohl durch Homogenisierung als auch durch Energieübertragung beschleunigt werden. So konnte für die Reaktion von Glykolaldehyd mit Glyceraldehyd und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in der Schwingkugelmühle die Bildung von C5-, C6- und C7-Zuckern beobachtet werden. Zudem wurde gefunden, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen Ketosen gegenüber Aldosen bevorzugt gebildet worden sind. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann ein Zusammenhang zwischen lithosphärischer Aktivität wie Vulkanismus und Erosion sowie meteoritischen Einschlägen konstruiert werden, unter welchem nicht-wässrige Aldolreaktionen Zucker hervorbringen, die unter anderem als Nährstoffquelle oder Bausteine für das erste Leben gedient haben können. Die Ergebnisse zu diesem Teilprojekt wurden in Zusammenarbeit mit Saskia Lamour erhalten und sind in dem unveröffentlichten Manuskript *Prebiotic Sugar Formation Under Nonaqueous Conditions and Mechanochemical Acceleration in the Formose Reaction Network* dargestellt.

(2) Implementierung des Hadamard-Transformation-Multiplexings auf kommerziellen, unmodifizierten Instrumenten für die Kapillarelektrophorese

Im zweiten Großprojekt der Dissertation wurde eine Strategie erarbeitet und etabliert, mit deren Hilfe erstmalig eine Multiplexing-Methode basierend auf Hadamard-Transformation auf kommerziellen Standard-Kapillarelektrophorese-Instrumenten mit integrierten UV-Detektoren implementiert werden konnte. Wie im Kenntnisstand dargelegt wurde, beruhten alle zuvor publizierten Multiplexing-Anwendungen auf speziellen Hardware-Modifikationen, durch welche die Injektion von Analyt- und Blindprobe ohne den Wechsel des Vials und damit ohne Unterbrechung des Stroms ermöglicht wurde. Eine anwenderfreundliche und modifikationsfreie Implementierung von Multiplexing muss dabei aber genau diesen Ansatz verfolgen. **Abbildung 14** fasst die Ergebnisse zu diesem Projekt graphisch zusammen.

Daher wurde in einem ersten Schritt zunächst der Einfluss von Vial-Austausch und Stromunterbrechung im System untersucht. Dabei wurde gefunden, dass das wiederholte Anlegen von Spannung die Stärke des elektroosmotischen Flusses moduliert und damit Einfluss auf die Konstanz der Driftgeschwindigkeiten der Analyten nimmt. Für unterschiedliche Ionen wurden so in Abhängigkeit von der Injektionsreihenfolge ungleiche EOF-Mobilitäten erhalten, wodurch folglich die programmierte Modulationszeit Δt in Abhängigkeit des Analyten verschieden war. Eine solche zeitliche Inkontinuität stört die inverse Hadamard-Transformation und minimiert die theoretisch zu erreichende Signalverstärkung. Dieser Effekt verstärkt sich dabei mit zunehmender Anzahl an Analyten in der Probe. Als weitere Störfaktoren konnten zudem die Probenkonzentration und eine mögliche komplexe Matrix der Probe identifiziert werden, die durch Veränderung der Leitfähigkeit der Zone im Vergleich zum Hintergrundpuffer eben-

Zusammenfassung

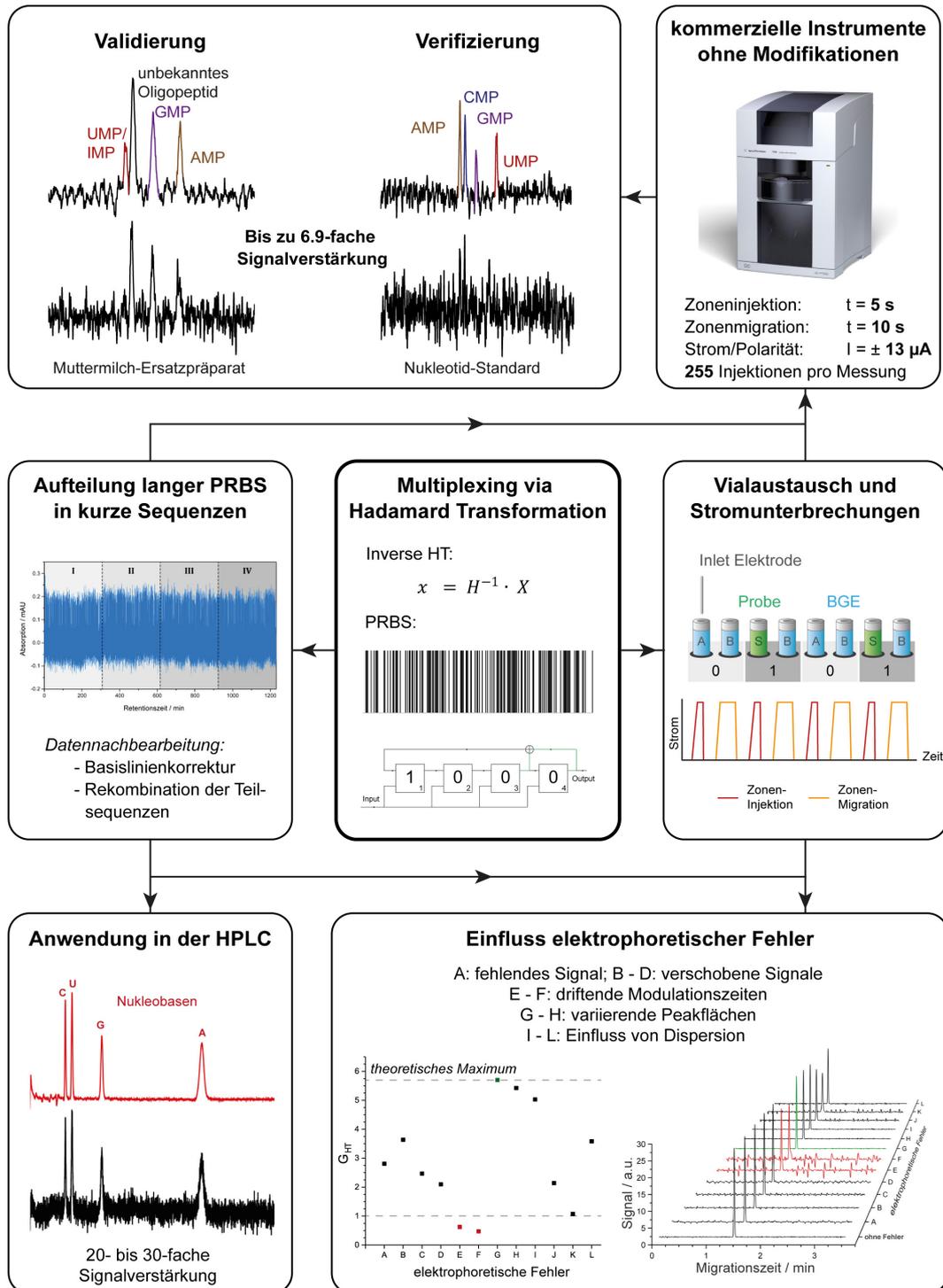


Abbildung 14. Graphische Zusammenfassung zur Multiplexing-Implementierung *via* Hadamard-Transformation in einem unmodifizierten CE-System und Anwendung des Prinzips zur Aufteilung langer PRBS in kurze Sequenzen in der HPLC. Individuelle Darstellungen übersetzt, modifiziert und mit Erlaubnis wiedergegeben von S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Šteflová, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8445-8453. Copyright 2018 American Chemical Society und Alexander Florian Siegle, Sebastian Pallmann und Oliver Trapp, *J. Chromatogr. A*, **2018**, *1575*, 34-39. Copyright 2018 Elsevier B.V. sowie Agilent Technologies.

falls die Driftgeschwindigkeiten beeinflussen. In Folge der Stromunterbrechung erfahren ferner die Peakbreiten eine Modulation, die auf graduelle Dispersion zurückzuführen ist, die für Zonen, die anfänglich injiziert werden, größer ist als für solche, die später in die Kapillare eingeführt werden und damit weniger oft Stromunterbrechung erfahren. Dieses Verhalten konnte mittels elektrophoretischer Simulation mit dem Programm Simul bestätigt werden. Darüber hinaus wurden Studien zum Einfluss elektrophoretischer Fehler wie etwa Fehlinjektionen, zeitlich verschobene Signale, variierende Peakflächen, driftende Modulationszeiten und graduelle Dispersion betrieben. Dabei konnte als wesentliche Ursache für eine verminderte Qualität der Hadamard Transformation der zuletzt genannte Faktor identifiziert werden.

Um diese bis dahin in der Literatur nicht beschriebenen Effekte zu adressieren, wurde eine Strategie mit optimierten Injektionsparameter entwickelt. Dazu wurden

- Injektionszeiten sowohl für Zoneninjektion als auch Zonenmigration bewusst kurz gewählt, sodass Variationen in der Modulationszeit gering sind;
- Trennbedingungen nicht hinsichtlich Peakkapazität, sondern Trenndauer optimiert;
- Datensätze auf 100 Hz extrapoliert, um Hadamard-Transformationen mit höherer Genauigkeit in der Modulationszeit ausführen zu können, und
- längere PRBS in kürzere Sequenzen unterteilt, die sequentiell gemessen werden.

Insbesondere durch den zuletzt genannten Punkt gelang es, nicht nur den Einfluss der Dispersion, sondern auch die Akkumulation von zeitlichen Fehlern zu minimieren. Die erhaltenen Teilsequenzen wurden nach der Messung Computer-gestützt und basierend auf Markern wie dem EOF- oder einem Analyten-Signal wieder zusammengesetzt. Auf diese Weise gelang es schließlich, eine gesamtheitliche Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe Sequenzen mit einer Länge von bis zu 8-bit (255 Injektionen) realisiert werden konnten.

Die Methode wurde zunächst für zwei System bestehend aus AMP und einem Standard-Mix aus (A,C,G,U)MP verifiziert. Dabei konnten Verbesserungen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von 6.9 und 5.2 (theoretisches Maximum 8.0) erzielt werden. Außerdem wurde die Anwendbarkeit der Methode für ein Muttermilch-Ersatz-Präparat gezeigt. Nach inverser Hadamard-Transformation konnten die enthaltenen Nukleotid-Spezies zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die hier zusammengefassten Ergebnisse wurden in Kooperation mit Alexander Siegle und Jana Šteflová erarbeitet und in der nachgenannten Publikation veröffentlicht: S. Pallmann, A. F. Siegle, J. Steflova, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8445-8453.

Ausgehend von den Ergebnissen zur Nützlichkeit der Unterteilung langer Sequenzen in solche kleinerer Ordnung wurde diese Strategie ferner in der Anwendung in der HPLC getestet. Dort besteht für Sequenzen größer 11-bit die Einschränkung, dass zum einen kommerzielle Autosampler nicht genügend Speicherplatz für die Verarbeitung der hohen Anzahl an

Zusammenfassung

Injektionen zur Verfügung stellen und zum anderen sich temporale Fehler akkumulieren und den Mehrertrag an Sensitivität gegenüber kürzeren Sequenzen begrenzen. Mit Hilfe der genannten Methode konnten diese Limitierungen dem entgegen adressiert werden und für einen Mix aus den Nukleinbasen Cytosin, Uracil, Guanin und Adenin eine Steigerung der Sensitivität in einer Größenordnung zwischen 25 und 30 erreicht werden. Nach bestem Wissen des Autors sind solche kennzeichnenden Verbesserungen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses für Multiplexing-Ansätze nicht bekannt. Die Aufnahme solcher Datensätze auf der anderen Seite ist zeitaufwendig und auf isokratische Trennung begrenzt. Die Ergebnisse zu diesem Teilprojekt wurden in Zusammenarbeit mit Alexander Siegle erhalten und sind in folgender Publikation veröffentlicht: A. F. Siegle, S. Pallmann, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, 1575, 34-39.

8. Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Oliver Trapp, der mich angefangen als Studienberater für den Master, in der Vermittlung eines Forschungsaufenthalts in Norwegen, während der Masterarbeit und schließlich in der Promotion stets unterstützt und gefördert hat. Sei es in der Gestaltung und Diskussion von Projekten, in der Aufnahme von Kooperationen oder in der Entscheidung zum Wechsel in die Industrie. Für seine stets positive, motivierende und antreibende Art möchte ich ihm ausdrücklich danken.

Prof. Dr. Carell möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein weiterer Dank richtet sich an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder des Arbeitskreises. Dazu zählen Skrollan Stockinger, Kerstin Zawatzky, Marie-Louise Morkos, Sarah Wiesner, Ute Gärtner, Jana Šteflová, Julia Gmeiner, Regina Berg, Hildegard Lipfert, Claudia Meier, Brigitte Janker, Carrie Louis, Stefanie Auras, Anna Closs, Elina Fuks, Maren Haas, Kai Kohler, Florian Kruse, Saskia Lamour, Jan Menke, Jan Felix Scholtes, Sophia Schwarz, Max Seibicke, Dmitry Semenov, Max Siebert, Alexander Siegle, Jennifer Teichert und Marco Wunsch.

Insbesondere möchte ich dabei Golo Storch, Jana Šteflová, Saskia Lamour, Maren Haas und Alexander Siegle sowie Ann-Kathrin Henß vom Arbeitskreis Prof. Dr. Wintterlin und Dr. Steffen Schmidt vom Arbeitskreis Prof. Dr. Bein für ihre Zusammenarbeit im Rahmen dieser Dissertation danken.

Ausgesprochenen Dank gilt darüber hinaus dem Fonds der chemischen Industrie für ihre finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums.

Weiterhin danken möchte ich Golo Storch für die vielen hilfreichen Korrekturvorschläge in dieser Arbeit. Außerdem möchte ihm ganz herzlich für seine lange Freundschaft und immer bereichernden Gespräche sowie gemeinsamen kurzweiligen Unternehmungen danken. Damit eng verknüpft, gilt ganz spezieller Dank Sandra König, die in mir viele Facetten hervorgebracht hat, von denen ich nicht wusste, dass ich sie habe. Danke namentlich für die Musik!

Außerdem möchte ich einer Reihe von Menschen danken, die auf ihre ganz besondere Art die Zeit meiner Promotion bereichert haben: Skrollan: Unvergessen sind die zahlreichen kuriosen Abende mit Wein, 90iger Musik und Krimidinnern. Steffi: Durch dich ist das Ankommen in München um einiges leichter gefallen! Maren: Danke für die vielen schönen Momente als Laborpartnerin und als Wanderführerin. Alex: Ein besonderer Dank gilt auch dir für die vielen witzigen und langen Nächte im Labor oder in den Bars und Restaurants von München.

Danksagung

Jenny: Was kann ich sagen, außer Dinge passieren. Danke für eben all diese „Dinge“. Max: Danke für die tausend guten Gespräche, die wir nicht nur im Keller der OC-Vorbereitung geführt haben! Elina und Felix: euch gilt besonderer Dank, da ihr die ersten Freunde seid, die ich in München gefunden habe! Anna Morva: Danke für die donnerstagabendlichen Gesangsstunden, die letztendlich auf die Bühne des Gasteigs geführt haben!

Außerdem möchte ich allen Kollegen bei Agilent danken, die mich während der Zeit des Arbeitens und des Dissertationsschreibens unterstützt und gelegentlich zerstreut haben. Danke Irina, Elena, Martin, Sascha, Patrick, Jana und Vlastik!

Ganz besonderem Dank gebührt auch Saskia Lamour. Du bist Wegbegleiter seit der ersten Stunde der Promotion und bist über die Zeit zu einer guten Freundin geworden! Ich danke dir für die vielen guten Unterhaltungen, Aufmunterungen, Spieleabende, Diskussionen und Skype-Telefonate.

An dieser Stelle möchte ich außerdem besonders Jan Felix Scholtes als gutem Freund, Laborpartner und Mitbewohner danken. Wir haben eine Menge zusammen erlebt! Danke für die schöne Zeit und die vielen gemeinsamen Abende mit Musik, guten Serien und Wein.

Ganz besonderem Dank gilt außerdem meinen besten Freunden, die in jeder Lebenslage für mich dagewesen sind; mich unterstützt, motiviert und aufgebaut haben. Vielen Dank liebe Julia und Jana!

Einen weiteren Dank möchte ich an dieser Stelle an meine ehemalige Chemie-Lehrerin Frau Georgi richten, welche die Lust an der Chemie erst erweckt hat. Danke!

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, die mir in jeder Situation stets bedingungslosen Halt, Kraft und Unterstützung im Leben geschenkt haben.

9. Literaturverzeichnis

- (1) Darwin, C. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*; Murray, London **1859**.
- (2) Darwin, C., Hooker, J. D., Ed., 1871.
- (3) Oparin, A. I. *Moscow: Moskovskiy rabochiy* **1924**.
- (4) Oparin, A. I. *Origin of Life on the Earth*; Oliver And Boyd; Edinburgh, **1957**.
- (5) Miller, S. L.; Schopf, J. W.; Lazcano, A. *J. Mol. Evol.* **1997**, *44*, 351-353.
- (6) Haldane, J. B. S. *Rationalist Annual* **1929**, *148*, 3-10.
- (7) Tirard, S. *J. Genet.* **2017**, *96*, 735-739.
- (8) Miller, S. L. *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- (9) Lazcano, A.; Miller, S. L. *Cell* **1996**, *85*, 793-798.
- (10) Miller, S. L.; Urey, H. C. *Science* **1959**, *130*, 245-251.
- (11) Bada, J. L.; Lazcano, A. *Science* **2003**, *300*, 745-746.
- (12) Wächtershauser, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 200-204.
- (13) Wächtershauser, G. *J. Theor. Biol.* **1997**, *187*, 483-494.
- (14) Huber, C.; Wächtershauser, G. *Science* **2006**, *314*, 630-632.
- (15) Wächtershäuser, G. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1990**, *20*, 173-176.
- (16) Wächtershäuser, G. *Syst. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 207-210.
- (17) Lohrmann, R.; Orgel, L. E. *Science* **1968**, *161*, 64-66.
- (18) Orgel, L. E. *Trends Biochem. Sci* **1998**, *23*, 491-495.
- (19) Orgel, L. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 12503-12507.
- (20) Orgel, L. E. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99-123.
- (21) Österberg, R.; Orgel, L.; Lohrmann, R. *J. Mol. Evol.* **1973**, *2*, 231-234.
- (22) Martin, W.; Baross, J.; Kelley, D.; Russell, M. J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 805-814.
- (23) Herschy, B.; Whicher, A.; Camprubi, E.; Watson, C.; Dartnell, L.; Ward, J.; Evans, J. R.; Lane, N. *J. Mol. Evol.* **2014**, *79*, 213-227.
- (24) Sojo, V.; Herschy, B.; Whicher, A.; Camprubi, E.; Lane, N. *Astrobiology* **2016**, *16*, 181-197.
- (25) Lane, N.; Allen, J. F.; Martin, W. *Bioessays* **2010**, *32*, 271-280.
- (26) Huber, C.; Eisenreich, W.; Wächtershäuser, G. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1069-1071.
- (27) Yamagata, Y.; Watanabe, H.; Saitoh, M.; Namba, T. *Nature* **1991**, *352*, 516-519.
- (28) Robertson, M. P.; Miller, S. L. *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
- (29) Shapiro, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 4396-4401.
- (30) Shapiro, R. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 275-278.
- (31) Rode, B. M.; Fitz, D.; Jakschitz, T. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 2674-2702.

- (32) Bada, J. L. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **2004**, 226, 1-15.
- (33) Gull, M.; Zhou, M.; Fernandez, F. M.; Pasek, M. A. *J. Mol. Evol.* **2014**, 78, 109-117.
- (34) Menor-Salvan, C.; Marin-Yaseli, M. R. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5404-5415.
- (35) Clark, B. C. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1988**, 18, 209-238.
- (36) Clark, B. C.; Kolb, V. M. *Life (Basel)* **2018**, 8, 12-33.
- (37) Oberbeck, V. R.; Aggarwal, H. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1991**, 21, 317-338.
- (38) Abramov, O.; Mojzsis, S. J. *Nature* **2009**, 459, 419-422.
- (39) Sleep, N. H. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a002527.
- (40) Trail, D.; Watson, E. B.; Tailby, N. D. *Nature* **2011**, 480, 79-82.
- (41) Zahnle, K.; Schaefer, L.; Fegley, B. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a004895.
- (42) Trifonov, E. N. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, 29, 259-266.
- (43) Cleland, C.; Chyba, C. In *Planets and Life: The Emerging Science of Astrobiology*, Sullivan, W. T. I.; Baross, J. A., Eds.; Cambridge University Press, **2007**, pp 119-131.
- (44) Ruiz-Mirazo, K.; Briones, C.; de la Escosura, A. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 285-366.
- (45) Joyce, G.; Deamer, D.; Fleischaker, G. In *Origins of Life: the central concepts*; Jones and Bartlett; Boston, **1994**.
- (46) Szostak, J. W. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, 29, 599-600.
- (47) Benner, S. A. *Astrobiology* **2010**, 10, 1021-1030.
- (48) Probst, W.; Schuchardt, P. *Dudenverlag*; Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, **2004**.
- (49) Koshland, D. E., Jr. *Science* **2002**, 295, 2215-2216.
- (50) Forterre, P. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2010**, 40, 151-160.
- (51) Villarreal, L. P. *Sci. Am.* **2004**, 291, 100-105.
- (52) Pontarotti, P. *Evolutionary Biology—Concepts, Biodiversity, Macroevolution and Genome Evolution*; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2011**.
- (53) Higgs, P. G. *J. Mol. Evol.* **2017**, 84, 225-235.
- (54) Melendez-Hevia, E.; Montero-Gomez, N.; Montero, F. *J. Theor. Biol.* **2008**, 252, 505-519.
- (55) Velasco, J. *Biology & Philosophy* **2018**, 33, 31-48.
- (56) Pallmann, S.; Šteflová, J.; Haas, M.; Lamour, S.; Henß, A.; Trapp, O. *New J. Phys.* **2018**, 20, 055003.
- (57) Rauchfuss, H. *Chemical evolution and the origin of life*; Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, **2008**.
- (58) Gargaud, M.; Martin, H.; López-García, P.; Montmerle, T.; Pascal, R. *Young sun, early earth and the origins of life: Lessons for astrobiology*; Springer-Verlag; Paris, **2013**.
- (59) Gomes, R.; Levison, H. F.; Tsiganis, K.; Morbidelli, A. *Nature* **2005**, 435, 466-469.
- (60) Pasek, M.; Lauretta, D. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, 38, 5-21.
- (61) Kvenvolden, K.; Lawless, J.; Pering, K.; Peterson, E.; Flores, J.; Ponnampereuma, C.; Kaplan, I. R.; Moore, C. *Nature* **1970**, 228, 923-926.

- (62) Anders, E. *Nature* **1989**, *342*, 255-257.
- (63) Pizzarello, S.; Cooper, G.; Flynn, G. *Meteorites and the early solar system II* **2006**, *1*, 625-651.
- (64) Pizzarello, S. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 231-237.
- (65) Burton, A. S.; Stern, J. C.; Elsil, J. E.; Glavin, D. P.; Dworkin, J. P. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5459-5472.
- (66) Goesmann, F.; Rosenbauer, H.; Bredehoft, J. H.; Cabane, M.; Ehrenfreund, P.; Gautier, T.; Giri, C.; Kruger, H.; Le Roy, L.; MacDermott, A. J.; McKenna-Lawlor, S.; Meierhenrich, U. J.; Munoz Caro, G. M.; Raulin, F.; Roll, R.; Steele, A.; Steininger, H.; Sternberg, R.; Szopa, C.; Thiemann, W., et al. *Science* **2015**, *349*, aab0689.
- (67) Capaccioni, F.; Coradini, A.; Filacchione, G.; Erard, S.; Arnold, G.; Drossart, P.; De Sanctis, M. C.; Bockelee-Morvan, D.; Capria, M. T.; Tosi, F.; Leyrat, C.; Schmitt, B.; Quirico, E.; Ceroni, P.; Mennella, V.; Raponi, A.; Ciarniello, M.; McCord, T.; Moroz, L.; Palomba, E., et al. *Science* **2015**, *347*, aaa0628.
- (68) Liesemer, D. *MaxPlanckForschung* **2015**, *3*, 70-77.
- (69) Saito, M. A.; Sigman, D. M.; Morel, F. M. M. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *356*, 308-318.
- (70) Nance, R. D.; Murphy, J. B.; Santosh, M. *Gondwana Res.* **2014**, *25*, 4-29.
- (71) Allwood, A. C.; Walter, M. R.; Kamber, B. S.; Marshall, C. P.; Burch, I. W. *Nature* **2006**, *441*, 714-718.
- (72) Walter, M. R.; Buick, R.; Dunlop, J. S. R. *Nature* **1980**, *284*, 443-445.
- (73) Santosh, M.; Arai, T.; Maruyama, S. *Geoscience Frontiers* **2017**, *8*, 309-327.
- (74) Hazen, R. M. *Am. J. Sci.* **2013**, *313*, 807-843.
- (75) Hirokawa, T.; Nishino, M.; Aoki, N.; Kiso, Y.; Sawamoto, Y.; Yagi, T.; Akiyama, J.-I. *J. Chromatogr. A* **1983**, *271*, D1-D106.
- (76) Pasek, M. A.; Gull, M.; Herschy, B. *Chem. Geol.* **2017**, *475*, 149-170.
- (77) *CRC handbook of chemistry and physics*; Taylor & Francis Ltd., **2017**.
- (78) McDonough, W. F.; Sun, S. *Chem. Geol.* **1995**, *120*, 223-253.
- (79) Pasek, M. A. *Geoscience Frontiers* **2017**, *8*, 329-335.
- (80) Britvin, S. N.; Murashko, M. N.; Vapnik, Y.; Polekhovskiy, Y. S.; Krivovichev, S. V. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8355-8359.
- (81) Pirim, C.; Pasek, M. A.; Sokolov, D. A.; Sidorov, A. N.; Gann, R. D.; Orlando, T. M. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2014**, *140*, 259-274.
- (82) Orgel, L. E. In *Evolutionary Tinkering in Gene Expression*, Grunberg-Manago, M.; Clark, B. F. C.; Zachau, H. G., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1989**, pp 215-224.
- (83) Gull, M. *Challenges* **2014**, *5*, 193-212.
- (84) Schwartz, A. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *281*, 477-480.
- (85) Kakegawa, T.; Noda, M.; Nannri, H. *Resource Geology* **2002**, *52*, 83-89.

- (86) Kim, H. J.; Furukawa, Y.; Kakegawa, T.; Bitá, A.; Scorei, R.; Benner, S. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 15816-15820.
- (87) Ferris, J. P. *Science* **1968**, *161*, 53-54.
- (88) Degani, C.; Halmann, M. *J. Chem. Soc. C* **1971**, 1459-1465.
- (89) Halmann, M.; Sanchez, R. A.; Orgel, L. E. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3702-3703.
- (90) Hulshof, J.; Ponnampereuma, C. *Orig. Life* **1976**, *7*, 197-124.
- (91) Kolb, V.; Orgel, L. E. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1996**, *26*, 7-13.
- (92) Cheng, C.; Fan, C.; Wan, R.; Tong, C.; Miao, Z.; Chen, J.; Zhao, Y. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 219-224.
- (93) Weber, A. L. *J. Mol. Evol.* **1981**, *18*, 24-29.
- (94) Weber, A. L. *BioSyst.* **1982**, *15*, 183-189.
- (95) Hagan, W. J., Jr.; Parker, A.; Steuerwald, A.; Hathaway, M. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2007**, *37*, 113-122.
- (96) Ferris, J. P.; Goldstein, G.; Beaulieu, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6598-6603.
- (97) Burcar, B.; Pasek, M.; Gull, M.; Cafferty, B. J.; Velasco, F.; Hud, N. V.; Menor-Salvan, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 13249-13253.
- (98) Österberg, R.; Orgel, L. E.; Lohrmann, R. *J. Mol. Evol.* **1973**, *2*, 231-234.
- (99) Krishnamurthy, R.; Arrhenius, G.; Eschenmoser, A. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 333-354.
- (100) Karki, M.; Gibard, C.; Bhowmik, S.; Krishnamurthy, R. *Life (Basel)* **2017**, *7*, 32-59.
- (101) Bryant, D. E.; Greenfield, D.; Walshaw, R. D.; Johnson, B. R. G.; Herschy, B.; Smith, C.; Pasek, M. A.; Telford, R.; Scowen, I.; Munshi, T.; Edwards, H. G. M.; Cousins, C. R.; Crawford, I. A.; Kee, T. P. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2013**, *109*, 90-112.
- (102) Geist, V.; Wagner, G.; Nolze, G.; Moretzki, O. *Cryst. Res. Technol.* **2005**, *40*, 52-64.
- (103) Gull, M.; Mojica, M. A.; Fernandez, F. M.; Gaul, D. A.; Orlando, T. M.; Liotta, C. L.; Pasek, M. A. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17198.
- (104) Pasek, M. A.; Dworkin, J. P.; Laurretta, D. S. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2007**, *71*, 1721-1736.
- (105) Pasek, M. A.; Kee, T. P.; Bryant, D. E.; Pavlov, A. A.; Lunine, J. I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 7918-7920.
- (106) Pasek, M. A.; Laurretta, D. S. *Astrobiology* **2005**, *5*, 515-535.
- (107) Pech, H.; Vazquez, M. G.; Van Buren, J.; Foster, K. L.; Shi, L.; Salmassi, T. M.; Ivey, M. M.; Pasek, M. A. *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, *49*, 573-581.
- (108) Rabinowitz, J.; Chang, S.; Ponnampereuma, C. *Nature* **1968**, *218*, 442-443.
- (109) Schwartz, A. W. *J. Chem. Soc. D* **1969**, *0*, 1393a-1393a.
- (110) Coggins, A. J.; Powner, M. W. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 310-317.
- (111) Fernández-García, C.; Coggins, A. J.; Powner, M. W. *Life* **2017**, *7*, 31-53.

- (112) Pasek, M. A.; Harnmeijer, J. P.; Buick, R.; Gull, M.; Atlas, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 10089-10094.
- (113) Bryant, D. E.; Kee, T. P. *Chem. Commun. (Camb.)* **2006**, 2344-2346.
- (114) Butlerow, A. *Annalen der Chemie und Pharmacie* **1861**, *120*, 295-298.
- (115) Breslow, R. *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 22-26.
- (116) Delidovich, I. V.; Simonov, A. N.; Taran, O. P.; Parmon, V. N. *ChemSusChem* **2014**, *7*, 1833-1846.
- (117) Iqbal, Z.; Novalin, S. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 769-788.
- (118) Tambawala, H.; Weiss, A. H. *J. Catal.* **1972**, *26*, 388-400.
- (119) Ziemecki, S.; LaPierre, R. B.; Weiss, A. H.; Sakharov, M. *J. Catal.* **1977**, *50*, 455-463.
- (120) Pfeil, E.; Sehroth, G. *Chem. Ber.* **1952**, *85*, 293-307.
- (121) Shigemasa, Y.; Taji, T.; Sakazawa, C.; Nakashima, R.; Matsuura, T. *J. Catal.* **1979**, *58*, 296-302.
- (122) Baly, E. *Industrial & Engineering Chemistry* **1924**, *16*, 1016-1018.
- (123) Simonov, A.; Matvienko, L.; Pestunova, O.; Parmon, V.; Komandrova, N.; Denisenko, V.; Vas'kovskii, V. *Kinet. Catal.* **2007**, *48*, 550-555.
- (124) Delidovich, I.; Taran, O.; Simonov, A.; Matvienko, L.; Parmon, V. *Adv. Space Res.* **2011**, *48*, 441-449.
- (125) Snytnikova, O. A.; Simonov, A. N.; Pestunova, O. P.; Parmon, V. N.; Tsentalovich, Y. P. *Mendeleev Commun.* **2006**, *16*, 9-10.
- (126) Shigemasa, Y.; Matsuda, Y.; Sakazawa, C.; Matsuura, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 222-226.
- (127) Eckhardt, A. K.; Linden, M. M.; Wende, R. C.; Bernhardt, B.; Schreiner, P. R. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 1141-1147.
- (128) Socha, R.; Weiss, A.; Sakharov, M. *React. Kinet. Catal. Lett.* **1980**, *14*, 119-128.
- (129) Socha, R.; Weiss, A.; Sakharov, M. *J. Catal.* **1981**, *67*, 207-217.
- (130) Schmalfuß, H. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1924**, *57*, 2101-2104.
- (131) Iqbal, M. Z.; Novalin, S. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5116-5121.
- (132) Angyal, S. J. In *Glycoscience*; Springer, **2001**, pp 1-14.
- (133) Appayee, C.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3720-3723.
- (134) Kim, H. J.; Ricardo, A.; Illangkoon, H. I.; Kim, M. J.; Carrigan, M. A.; Frye, F.; Benner, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468.
- (135) Ricardo, A.; Frye, F.; Carrigan, M. A.; Tipton, J. D.; Powell, D. H.; Benner, S. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9503-9505.
- (136) Becker, M.; Zweckmair, T.; Forneck, A.; Rosenau, T.; Potthast, A.; Liebner, F. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1281*, 115-126.

- (137) Zweckmair, T.; Bohmdorfer, S.; Bogolitsyna, A.; Rosenau, T.; Potthast, A.; Novalin, S. *J. Chromatogr. Sci.* **2014**, *52*, 169-175.
- (138) De Bruijn, J. M.; Kieboom, A. P. G.; Bekkiun, H. V. *J. Carbohydr. Chem.* **2006**, *5*, 561-569.
- (139) Feather, M. S.; Harris, J. F. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; Elsevier, **1973**, pp 161-224.
- (140) Harris, J. *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 207-215.
- (141) Benner, S. A.; Kim, H. J.; Carrigan, M. A. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2025-2034.
- (142) Khomenko, T. y. I. i.; Sakharov, M.; Golovina, O. *Russ. Chem. Rev.* **1980**, *49*, 570-584.
- (143) Shigemasa, Y.; Akagi, S.-i.; Waki, E.; Nakashima, R. *J. Catal.* **1981**, *69*, 58-68.
- (144) Runge, K.; Mayer, R. *Liebigs. Ann. Chem.* **1967**, *707*, 161-169.
- (145) Matsumoto, T.; Inoue, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 1975-1979.
- (146) Gutsche, C. D.; Redmore, D.; Buriks, R. S.; Nowotny, K.; Grassner, H.; Armbruster, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1235-1245.
- (147) Henrique Teles, J.; Melder, J.-P.; Ebel, K.; Schneider, R.; Gehrler, E.; Harder, W.; Brode, S.; Enders, D.; Breuer, K.; Raabe, G. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 61-83.
- (148) Lambert, J. B.; Lu, G.; Singer, S. R.; Kolb, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9611-9625.
- (149) Lambert, J. B.; Gurusamy-Thangavelu, S. A.; Ma, K. *Science* **2010**, *327*, 984-986.
- (150) Vazquez-Mayagoitia, A.; Horton, S. R.; Sumpter, B. G.; Sponer, J.; Sponer, J. E.; Fuentes-Cabrera, M. *Astrobiology* **2011**, *11*, 115-121.
- (151) Ricardo, A.; Carrigan, M. A.; Olcott, A. N.; Benner, S. A. *Science* **2004**, *303*, 196-197.
- (152) Bonner, W. A. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1991**, *21*, 59-111.
- (153) Jain, S.; Caforio, A.; Driessen, A. J. *Front Microbiol.* **2014**, *5*, 641-656.
- (154) Blackmond, D. G. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a002147.
- (155) Ribo, J. M.; Hochberg, D.; Crusats, J.; El-Hachemi, Z.; Moyano, A. *J. R. Soc. Interface* **2017**, *14*, 20170699 .
- (156) Pizzarello, S.; Schrader, D. L.; Monroe, A. A.; Lauretta, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 11949-11954.
- (157) Cooper, G.; Rios, A.; Nuevo, M. *Life* **2018**, *8*, 36-64.
- (158) Pizzarello, S.; Cronin, J. R. *Nature* **1998**, *394*, 236-236.
- (159) Engel, M. H.; Macko, S. A. *Nature* **1997**, *389*, 265-268.
- (160) Pizzarello, S.; Groy, T. L. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2011**, *75*, 645-656.
- (161) Glavin, D. P.; Dworkin, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 5487-5492.
- (162) Pizzarello, S.; Wang, Y.; Chaban, G. M. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2010**, *74*, 6206-6217.
- (163) Cooper, G.; Rios, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 3322-3331.

- (164) Burton, A.; Berger, E. *Life* **2018**, *8*, 14-34.
- (165) Sugahara, H.; Meinert, C.; Nahon, L.; Jones, N. C.; Hoffmann, S. V.; Hamase, K.; Takano, Y.; Meierhenrich, U. J. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2018**, *1866*, 743-758.
- (166) Myrgorodska, I.; Meinert, C.; Hoffmann, S. V.; Jones, N. C.; Nahon, L.; Meierhenrich, U. J. *ChemPlusChem* **2017**, *82*, 74-87.
- (167) Balavoine, G.; Moradpour, A.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5152-5158.
- (168) Lerner, N. R.; Peterson, E.; Chang, S. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1993**, *57*, 4713-4723.
- (169) Cronin, J. R.; Pizzarello, S. *Science* **1997**, *275*, 951-955.
- (170) Peltzer, E. T.; Bada, J. L. *Nature* **1978**, *272*, 443-444.
- (171) Cronin, J. R.; Pizzarello, S.; Epstein, S.; Krishnamurthy, R. V. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1993**, *57*, 4745-4752.
- (172) Pizzarello, S.; Yarnes, C. T. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **2016**, *443*, 176-184.
- (173) Pizzarello, S.; Shock, E. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2017**, *47*, 249-260.
- (174) Bailey, J.; Chrysostomou, A.; Hough, J.; Gledhill, T.; McCall, A.; Clark, S.; Ménard, F.; Tamura, M. *Science* **1998**, *281*, 672-674.
- (175) Bonner, W. A.; van Dort, M. A.; Yearian, M. R.; Zeman, H. D.; Li, G. C. *Isr. J. Chem.* **1976**, *15*, 89-95.
- (176) Dreiling, J. M.; Gay, T. J. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113*, 118103.
- (177) Rosenberg, R. A.; Mishra, D.; Naaman, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7295-7298.
- (178) Rikken, G. L.; Raupach, E. *Nature* **2000**, *405*, 932-935.
- (179) Barron, L. D. *Nature* **2000**, *405*, 895-896.
- (180) Rikken, G. L. J. A.; Raupach, E. *Nature* **1997**, *390*, 493-494.
- (181) Barron, L. D.; Vrbancich, J. *Mol. Phys.* **2006**, *51*, 715-730.
- (182) Flores, J. J.; Bonner, W. A.; Massey, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3622-3625.
- (183) Klusmann, M.; Iwamura, H.; Mathew, S. P.; Wells, D. H., Jr.; Pandya, U.; Armstrong, A.; Blackmond, D. G. *Nature* **2006**, *441*, 621-623.
- (184) Viedma, C.; Ortiz, J. E.; de Torres, T.; Cintas, P. *Chem. Commun. (Camb.)* **2012**, *48*, 3623-3625.
- (185) Viedma, C.; Noorduyn, W. L.; Ortiz, J. E.; de Torres, T.; Cintas, P. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, *47*, 671-673.
- (186) Viedma, C.; Ortiz, J. E.; de Torres, T.; Izumi, T.; Blackmond, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15274-15275.
- (187) Viedma, C.; Verkuijl, B. J.; Ortiz, J. E.; de Torres, T.; Kellogg, R. M.; Blackmond, D. G. *Chemistry* **2010**, *16*, 4932-4937.
- (188) Ostwald, W. Z. *Phys. Chem.* **1897**, *22*, 289-330.

- (189) Voorhees, P. W. *J. Stat. Phys.* **1985**, *38*, 231-252.
- (190) Lifshitz, I. M.; Slyozov, V. V. *J. Phys. Chem. Solids* **1961**, *19*, 35-50.
- (191) Frank, F. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, *11*, 459-463.
- (192) Wynberg, H. J. *Macromol. Sci. Chem.* **1989**, *26*, 1033-1041.
- (193) Soai, K.; Niwa, S.; Hori, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 982-983.
- (194) Soai, K.; Shibata, T.; Morioka, H.; Choji, K. *Nature* **1995**, *378*, 767.
- (195) Soai, K.; Kawasaki, T.; Matsumoto, A. *Tetrahedron* **2018**, *16*, 1973-1990.
- (196) Soai, K.; Osanai, S.; Kadowaki, K.; Yonekubo, S.; Shibata, T.; Sato, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11235-11236.
- (197) Kawasaki, T.; Matsumura, Y.; Tsutsumi, T.; Suzuki, K.; Ito, M.; Soai, K. *Science* **2009**, *324*, 492-495.
- (198) Shibata, T.; Yamamoto, J.; Matsumoto, N.; Yonekubo, S.; Osanai, S.; Soai, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12157-12158.
- (199) Girard, C.; Kagan, H. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2922-2959.
- (200) Blackmond, D. G.; McMillan, C. R.; Ramdeehul, S.; Schorm, A.; Brown, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10103-10104.
- (201) Buono, F. G.; Blackmond, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8978-8979.
- (202) Schiaffino, L.; Ercolani, G. *Chemphyschem* **2009**, *10*, 2508-2515.
- (203) Schiaffino, L.; Ercolani, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 6832-6835.
- (204) Storch, G.; Trapp, O. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 179-187.
- (205) Storch, G.; Trapp, O. *Chirality* **2018**, *30*, 1150-1160.
- (206) Maier, F.; Trapp, O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 2985-2988.
- (207) Maier, F.; Trapp, O. *Chirality* **2013**, *25*, 126-132.
- (208) Maier, F.; Trapp, O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 8756-8760.
- (209) Trapp, O.; Siebert, M.; Storch, G.; Rominger, F. *Synthesis* **2017**, *49*, 3485-3494.
- (210) Storch, G.; Deberle, L.; Menke, J. M.; Rominger, F.; Trapp, O. *Chirality* **2016**, *28*, 744-748.
- (211) Storch, G.; Maier, F.; Wessig, P.; Trapp, O. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 5123-5126.
- (212) Storch, G.; Pallmann, S.; Rominger, F.; Trapp, O. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1453-1458.
- (213) Storch, G.; Siebert, M.; Rominger, F.; Trapp, O. *Chem. Commun. (Camb.)* **2015**, *51*, 15665-15668.
- (214) Storch, G.; Trapp, O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 3580-3586.
- (215) Trapp, O. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 42-47.
- (216) Trapp, O. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 189-198.
- (217) Griffiths, P. R. *Transform Techniques in Chemistry*; Springer US; New York, **1978**.

- (218) Harwit, M.; Sloane, N. J. A. *Hadamard Transform Optics*; Academic Press Inc; New York, **1979**.
- (219) Marshall, A. G. *Fourier, Hadamard, and Hilbert Transforms in Chemistry*; Springer US; New York, **1982**.
- (220) Weinstein, S.; Ebert, P. *IEEE T. Commu. Techn.* **1971**, *19*, 628-634.
- (221) Bozinovic, N.; Yue, Y.; Ren, Y.; Tur, M.; Kristensen, P.; Huang, H.; Willner, A. E.; Ramachandran, S. *Science* **2013**, *340*, 1545-1548.
- (222) Djordjevic, I. B.; Vasic, B. *Opt. Express* **2006**, *14*, 3767-3775.
- (223) Wang, J.; Yang, J.-Y.; Fazal, I. M.; Ahmed, N.; Yan, Y.; Huang, H.; Ren, Y.; Yue, Y.; Dolinar, S.; Tur, M. *Nat. photonics* **2012**, *6*, 488-496.
- (224) Le Gall, D. *Commun. ACM* **1991**, *34*, 46-58.
- (225) Aue, W.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.
- (226) Morris, G. A.; Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 760-762.
- (227) Ernst, R. R. *Biosci. Rep.* **1992**, *12*, 143-187.
- (228) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282-283.
- (229) Marshall, A. G.; Wang, T. C. L.; Ricca, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7893-7897.
- (230) Kimmel, J. R.; Yoon, O. K.; Zuleta, I. A.; Trapp, O.; Zare, R. N. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2005**, *16*, 1117-1130.
- (231) Han, M.; Gao, X.; Su, J. Z.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631-635.
- (232) Zheng, G.; Patolsky, F.; Cui, Y.; Wang, W. U.; Lieber, C. M. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1294-1301.
- (233) Lai, G.; Yan, F.; Wu, J.; Leng, C.; Ju, H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2726-2732.
- (234) Lee, J. H.; Daugharthy, E. R.; Scheiman, J.; Kalhor, R.; Yang, J. L.; Ferrante, T. C.; Terry, R.; Jeanty, S. S.; Li, C.; Amamoto, R.; Peters, D. T.; Turczyk, B. M.; Marblestone, A. H.; Inverso, S. A.; Bernard, A.; Mali, P.; Rios, X.; Aach, J.; Church, G. M. *Science* **2014**, *343*, 1360-1363.
- (235) Srinivasan, G.; Neumann-Singh, S.; Müller, K. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074*, 31-41.
- (236) Wang, S. L.; Lin, S. Y.; Chen, T. F.; Chuang, C. H. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1034-1039.
- (237) Soppera, O.; Croutxé-Barghorn, C. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 716-724.
- (238) Lewis, E. N.; Treado, P. J.; Reeder, R. C.; Story, G. M.; Dowrey, A. E.; Marcott, C.; Levin, I. W. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3377-3381.
- (239) Decker Jr, J. A. *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 127A-134A.
- (240) Plankey, F.; Glenn, T.; Hart, L.; Winefordner, J. *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 1000-1005.
- (241) Tilotta, D. C. *Talanta* **1990**, *37*, 61-69.
- (242) Brock, A.; Rodriguez, N.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3735-3741.

- (243) Fernández, F. M.; Vadillo, J. M.; Kimmel, J. R.; Wetterhall, M.; Markides, K.; Rodriguez, N.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1611-1617.
- (244) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282-283.
- (245) Trapp, O.; Kimmel, J. R.; Yoon, O. K.; Zuleta, I. A.; Fernandez, F. M.; Zare, R. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6541-6544.
- (246) Annino, R.; Bullock, L. E. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1221-1227.
- (247) Kaljurand, M.; Koel, M.; Küllik, E. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *239*, 317-319.
- (248) Kaljurand, M.; Küllik, E. *J. Chromatogr.* **1979**, *171*, 243-247.
- (249) Smit, H. C. *Chromatographia* **1970**, *3*, 515-518.
- (250) Valentin, J. R.; Carle, G. C.; Phillips, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1035-1039.
- (251) Engelsma, M.; Kok, W. T.; Smit, H. C. *J. Chromatogr.* **1990**, *506*, 201-210.
- (252) Kaljurand, M.; Urbas, E.; Haldna, U. *Chromatographia* **1992**, *34*, 417-420.
- (253) Laeven, J. M.; Smit, H. C.; Kraak, J. C. *Anal. Chim. Acta* **1983**, *150*, 253-258.
- (254) Lub, T. T.; Smit, H. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr.* **1978**, *149*, 721-733.
- (255) Mars, C.; Smit, H. C. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *228*, 193-208.
- (256) Smit, H. C.; Lub, T. T.; Vloon, W. J. *Anal. Chim. Acta* **1980**, *122*, 267-277.
- (257) Clowers, B. H.; Siems, W. F.; Hill, H. H.; Massick, S. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 44-51.
- (258) Szumlas, A. W.; Ray, S. J.; Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4474-4481.
- (259) Harmuth, H. F. *Transmission of Information by Orthogonal Functions*; Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, **1972**.
- (260) Jacquinet, P. *J. Opt. Soc. Am.* **1954**, *44*, 761-765.
- (261) Jacquinet, P. *Rep. Prog. Phys.* **1960**, *23*, 267-312.
- (262) Fellgett, P. B. *Proc. Phys. Soc.* **1949**, *Section B*, 351-359.
- (263) Fellgett, P. B. *J. Opt. Soc. Am.* **1949**, *39*, 970-976.
- (264) Fellgett, P. *J. Sci. Instrum.* **1958**, *35*, 257-258.
- (265) Hadamard, J. *Bull. des sciences math.* **1893**, *2*, 240-246.
- (266) Williams, R. C.; Swanson, R. M.; Wilkins, C. L. *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 1803-1804.
- (267) Williams, R. C.; Crary, F. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1150-1151.
- (268) Paley, R. E. *J. Math. Phy.* **1933**, *12*, 311-320.
- (269) Baumert, L.; Golomb, S.; Hall Jr, M. *Bull. Am. Math. Soc.* **1962**, *68*, 237-238.
- (270) Stanton, R. G.; Sprott, D. *Canad. J. Math* **1958**, *10*, 73-77.
- (271) MacWilliams, F. J.; Sloane, N. J. *Proc. IEEE* **1976**, *64*, 1715-1729.
- (272) Stahnke, W. *Math. Comput.* **1973**, *27*, 977-980.
- (273) Decker, J. A., Jr. *Appl. Opt.* **1971**, *10*, 510-514.
- (274) Dolan, J. W. *LC GC Europe solutions for separation scientist* **2010**, *23*, 136-141.
- (275) Shabir, G. A. *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 57-66.
- (276) Domon, B.; Aebersold, R. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 710-721.

- (277) Izawa, K.; Furuta, K.; Fujiwara, T.; Suyama, N. In *Industrie Chimique Belge-Belgische Chemische Industrie*; Federation Ind. Chim. De. Belg.; Brüssel **1966**, pp 71.
- (278) Welch, C. J.; Gong, X.; Schafer, W.; Pratt, E. C.; Brkovic, T.; Pirzada, Z.; Cuff, J. F.; Kosjek, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1674-1681.
- (279) Smith, H. *Chromatographia* **1970**, *3*, 515-518.
- (280) Annino, R.; Grushka, E. *J. Chromatogr. Sci.* **1976**, *14*, 265-270.
- (281) Annino, R.; Gonnord, M.-F.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 379-382.
- (282) Kaljurand, M.; Küllik, E. *J. Chromatogr. A* **1979**, *171*, 243-247.
- (283) Küllik, E.; Kaljurand, M. *J. Chromatogr. A* **1990**, *517*, 175-184.
- (284) Kaljurand, M.; Koel, M.; Küllik, E. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *239*, 317-319.
- (285) Smit, H.; Duursma, R.; Steigstra, H. *Anal. Chim. Acta* **1981**, *133*, 283-301.
- (286) Smit, H. *Trends Anal. Chem.* **1983**, *2*, 1-7.
- (287) Lin, C. H.; Kaneta, T.; Chen, H. M.; Chen, W. X.; Chang, H. W.; Liu, J. T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5755-5759.
- (288) Fan, Z.; Lin, C. H.; Chang, H. W.; Kaneta, T.; Lin, C. H. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 755-760.
- (289) Cheng, Y. K.; Lin, C. H.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5274-5278.
- (290) Cheng, Y. K.; Lin, C. H.; Kuo, S.; Yang, J.; Hsiung, S. Y.; Wang, J. L. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1220*, 143-146.
- (291) Siegle, A. F.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10828-10833.
- (292) Siegle, A. F.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11932-11934.
- (293) Siegle, A. F.; Trapp, O. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1448*, 93-97.
- (294) Siegle, A. F.; Trapp, O. *Chem. Ing. Tech.* **2014**, *86*, 1044-1051.
- (295) Trapp, O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 5609-5613.
- (296) Wunsch, M. R.; Lehnig, R.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4038-4045.
- (297) Wunsch, M. R.; Lehnig, R.; Janke, C.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 9256-9263.
- (298) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4421-4425.
- (299) Braun, K. L.; Hapuarachchi, S.; Fernandez, F. M.; Aspinwall, C. A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1628-1635.
- (300) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 328-334.
- (301) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*, 102018.
- (302) Hata, K.; Kichise, Y.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1765-1768.
- (303) Fister, J. C.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4460-4464.
- (304) Guchardi, R.; Schwarz, M. A. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3151-3159.
- (305) McReynolds, J. A.; Gao, L.; Barber-Singh, J.; Shippy, S. A. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 128-136.

- (306) Kuldvee, R.; Kaljurand, M.; Smit, H. C. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 169-174.
- (307) van der Moolen, J. N.; Louwarse, D. J.; Poppe, H.; Smit, H. C. *Chromatographia* **1995**, *40*, 368-374.
- (308) van der Moolen, J. N.; Poppe, H.; Smit, H. C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4220-4225.
- (309) Braun, K. L.; Hapuarachchi, S.; Fernandez, F. M.; Aspinwall, C. A. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3115-3121.
- (310) Kaneta, T.; Kosai, K.; Imasaka, T. *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 1659-1661.
- (311) Seiman, A.; Kaljurand, M.; Ebber, A. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *589*, 71-75.
- (312) Gao, L.; Patterson, E. E., 2nd; Shippy, S. A. *Analyst* **2006**, *131*, 222-228.
- (313) Kaneta, T.; Yamaguchi, Y.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5444-5446.
- (314) Seiman, A.; Reijenga, J. C. *Procedia Chemistry* **2010**, *2*, 59-66.
- (315) Kaneta, T.; Yamaguchi, Y.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5444-5446.
- (316) Kaneta, T.; Kosai, K.; Imasaka, T. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2257-2260.
- (317) Hata, K.; Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 178-182.
- (318) Doherty, S.; Knight, J. G.; Smyth, C. H.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4925-4928.
- (319) Pallmann, S.; Siegle, A. F.; Steflova, J.; Trapp, O. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8445-8453.
- (320) Siegle, A. F.; Pallmann, S.; Trapp, O. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1575*, 34-39.