

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

**Nichtwässrige Reaktionsbedingungen  
für die Synthese biologisch relevanter Moleküle  
auf der frühen Erde**

–

Präbiotische Peptidsynthesen in flüssigem Schwefeldioxid und  
mechanochemische Monosaccharidsynthesen

Maren Haas

aus

Goch, Deutschland

2020



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.

München, 03.12.2020

.....

(Maren Haas)

Dissertation eingereicht am 21.10.2020

1. Gutachterin / 1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Trapp

2. Gutachterin / 2. Gutachter: Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder

Mündliche Prüfung am 01.12.2020

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften publiziert und auf Konferenzen in Form von Vorträgen und Posterpräsentationen vorgestellt.

### **Publikationen**

S. Pallmann, J. Steflova, M. Haas, S. Lamour, A.-K. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003; Schreibersite: an Effective Catalyst in the Formose Reaction Network.

M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, *1568*, 160-167; Development of an Advanced Derivatization Protocol for the Unambiguous Identification of Monosaccharides in Complex Mixtures by GC and HPLC.

S. Lamour, S. Pallmann, M. Haas, O. Trapp, *Life* **2019**, *9*, 52; Prebiotic Sugar Formation Under Nonaqueous Conditions and Mechanochemical Acceleration.

M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, *Commun. Chem.*, **2020**, *3*, 140; Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting.

### **Posterpräsentationen**

Science of Early Life, Juni 2018, Hamilton (Ontario, Kanada); Derivatization of Monosaccharides for the Unambiguous Identification in Complex Mixtures by GC and HPLC Aiming for Elucidation in the Formose Network.

Molecular Origins of Life, CAS Conference, Oktober 2018, München (Deutschland); Separation of complex monosaccharide mixtures and its application to the analysis of a formose network catalysed by corroded Schreibersite.

CRC 235 Retreat, Februar 2019, Brixen (Italien); P05: Evolutionary Optimisation of Experimental Synthetic Networks.

Science of Early Life, November 2019, Kloster Seeon (Deutschland); Mechanochemical Monosaccharide Formation as a Possible Scenario for the Early Earth.

Gordon Research Seminar and Conference, Januar 2020, Galveston (Texas, USA); Mechanochemical Monosaccharide Formation as a Possible Scenario for the Early Earth.

Molecular Origins of Life Online Conference, Juli 2020, München (Deutschland); A mineral-catalysed, mechanochemical formose reaction.

**Vorträge**

CRC 235 Retreat, Februar 2019, Brixen (Italien); P05: Evolutionary Optimisation of Experimental Synthetic Networks.

CRC 235 Summer School, Juli 2019, Regensburg (Deutschland); Formose Network on the Early Earth - Mechanochemical Monosaccharide Synthesis.

Gordon Research Seminar and Conference, Januar 2020, Galveston (Texas, USA); Mechanochemical Monosaccharide Formation as a Possible Scenario for the Early Earth.



# Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver Trapp für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung anfertigen zu können sowie für die Unterstützung, den wissenschaftlichen Austausch und die positive Atmosphäre während der Promotionszeit.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Dem Max-Planck-Institut für Astronomie Heidelberg und dem Mentoring-Programm der Fakultät für Chemie und Pharmazie mit meiner Mentorin Prof. Dr. Regina de Vivie-Riedle danke ich für die finanzielle ebenso wie die persönliche Unterstützung.

Ohne die Hilfe der festen Arbeitskreis- und Departmentsmitglieder im Rahmen der Bürokratiebewältigung, der Analytikmessungen oder auch der Anfertigung spezieller Laborausstattung wäre vieles kaum oder nur schwer möglich gewesen. Danke für die hilfreiche, nette Zusammenarbeit.

Allen ehemaligen sowie aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises, welche mich während meiner Promotion unterstützt haben, danke ich ebenso ganz herzlich. Dies gilt sowohl für alle fachliche Unterstützung als auch für die weiteren Bereicherungen der Promotionszeit bei gemeinsamem Kochen, Spielen, Puzzeln, Ski-, Wander-, Kletterausflügen und Grillabenden. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Laborpartnern Sebastian Pallmann und Constanze Sydow, sowie für die gemeinsame Zusammenarbeit und hilfreichen Korrekturen bei Saskia Lamour, Fabian Sauer, Anna Closs und Golo Storch bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Forschungspraktikanten Jacob Gorenflos, Leonie von Brunn, Filip Jukić, sowie meiner Bachelorandin Sarah Christ.

Mein Dank gilt weiterhin auch besonders meinen Freunden bereits aus Schul- und späterer Heidelberger Studienzeit sowie meiner Familie.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
Kurzfassung .....	11
Abstract.....	13
1 Einleitung .....	15
2 Kenntnisstand .....	16
2.1 Der Ursprung des Lebens .....	16
2.1.1 Bedingungen auf der Frühen Erde.....	16
2.1.2 Modelle für den Ursprung des Lebens .....	18
2.1.3 Flüssiges Schwefeldioxid auf der Frühen Erde .....	23
2.1.4 Mechanochemie auf der Frühen Erde.....	24
2.1.5 Präbiotische Peptidbildung .....	26
2.1.6 Präbiotische Zuckersynthese .....	30
2.2 Analyse komplexer Mischungen kleiner Moleküle.....	33
2.2.1 Trennung und Analyse von Mischungen kurzer Peptide & Aminosäuren.....	33
2.2.2 Monosaccharid-Trennung und Analyse .....	40
3 Zielsetzung .....	46
4 Kupferkatalysierte Peptidsynthese in SO <sub>2</sub> .....	47
4.1 Analyse komplexer Aminosäuren- und Peptidmischungen.....	47
4.1.1 Peptid-Trennungen <i>via</i> Kapillarelektrophorese.....	47
4.1.2 Entfernung der Kupfer(II)-Ionen aus den Peptidmischungen .....	53
4.1.3 Peptid-Trennungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie.....	55
4.2 Reaktionen in Schwefeldioxid.....	60
4.2.1 SIPF-analoge Reaktion in Schwefeldioxid.....	60
4.2.2 Kupfer(II)-katalysierte Peptidbildung in komplexen Mischungen.....	64
5 Mechanochemische Zuckersynthese .....	76
5.1 Analyse von Monosaccharidmischungen .....	76

5.1.1	Monosaccharid-Trennung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie.....	76
5.1.2	Monosaccharid-Trennung <i>via</i> Gaschromatographie.....	78
5.2	Mechanochemische Reaktionen.....	88
5.2.1	Mineralienkatalysierte Aldolreaktion .....	88
5.2.2	Mechanochemische Formosereaktion.....	90
5.2.3	Umpolung von Formaldehyd .....	93
5.2.4	Stabilität der Zucker unter mechanochemischen Bedingungen.....	96
5.2.5	Einfluss der Umgebung.....	97
6	Zusammenfassung .....	99
7	Experimentalteil.....	105
7.1	Allgemeines .....	105
7.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel .....	105
7.1.2	Hochleistungsflüssigchromatographie .....	106
7.1.3	Gaschromatographie .....	106
7.1.4	Kapillarelektrophorese .....	106
7.1.5	Kugelmühlen.....	107
7.1.6	Elementaranalyse .....	107
7.1.7	Kleingeräte .....	107
7.2	Kupferkatalysierte Peptidbildung in SO <sub>2</sub> .....	108
7.2.1	Allgemeine Vorgehensweise.....	108
7.2.2	Peptidbildung aus Glycin und Alanin .....	108
7.2.3	Herstellung der Aminosäurenmischungen .....	109
7.2.4	Peptidbildung komplexer Mischungen .....	110
7.3	Analyse der Peptidmischungen .....	111
7.3.1	Belegen der CE-Kapillaren .....	111
7.3.2	Herstellung der Analytik-Testmischung .....	112
7.3.3	CE-Trennung der Aminosäuren und Peptide .....	112
7.3.4	CE-MS Analyse der Aminosäuren und Peptide.....	113

7.3.5	Auswertung der CE-MS-Daten .....	114
7.3.6	Entfernung von Kupfer .....	114
7.3.7	HPLC-MS-Analyse der Aminosäuren und Peptide .....	114
7.4	Mechanochemische Zuckersynthese .....	116
7.4.1	Herstellung von adsorbiertem, monomerem Formaldehyd .....	116
7.4.2	Mechanochemische, mineralienkatalysierte Aldolreaktion .....	116
7.4.3	Mechanochemische Aldolreaktion unter variabler Atmosphäre .....	117
7.4.4	Mechanochemische Formosereaktion .....	117
7.4.5	Umpolungsreaktion .....	117
7.4.6	Photomechanochemie .....	118
7.4.7	Stabilität unter mechanochemischen Bedingungen .....	118
7.5	Derivatisierung und Analyse der Monosaccharide .....	119
7.5.1	HPLC-RID-Messungen .....	119
7.5.2	PMP-Derivatisierung .....	119
7.5.3	DNPH-Derivatisierung .....	119
7.5.4	Belegen der GC-Säulen .....	120
7.5.5	Silylierung .....	120
7.5.6	EtOx-TMS-Derivatisierung .....	120
7.5.7	HACl-TMS-Derivatisierung .....	121
7.5.8	GC-TCD-Messungen .....	122
7.5.9	EtOx-TFA-Derivatisierung .....	122
8	Anhang .....	123
8.1	Daten zu den Peptidtrennungen und der Peptidbildung in SO <sub>2</sub> .....	123
8.2	Daten zur Monosaccharid-Analytik und Synthese .....	138
9	Literaturverzeichnis .....	164



# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Alanin
AccQ / AQC	6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamat
ACN	Acetonitril
AD-RH	Amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat) belegt auf Kieselgel (5 µm)
All	Allose
Alt	Altrose
APS	Ammoniumpersulfat
Äq.	Äquivalente
Ar	Aryl
Ara	Arabinose
ArMP	1-Aryl-3-methyl-5-pyrazolon
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
BGE	<i>background electrolyte</i> / Hintergrundelektrolyt
BM	<i>ball mill</i> / Planetenkugelmühle
C	Cystein
CAD	charged aerosol detector
CE	<i>capillary electrophoresis</i> / Kapillarelektrophorese
CID	<i>collision induced dissociation</i> / kollisionsinduzierte Dissoziation
(Cys) <sub>2</sub>	Cystin
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> / Kapillarzonenelektrophorese
d	Tag
D	Asparaginsäure
δ	chemische Verschiebung
DAD	Dioden-Array-Detektor
Dansyl-Cl	1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulphonylchloride
DHA	Dihydroxyaceton
DKP	Diketopiperazin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMM	Dimethoxymethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure

---

DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
E	Glutaminsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDX	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> / energiedispersive Röntgenspektroskopie
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i> / Extrahiertes Ionenchromatogramm
ELSD	<i>evaporative light scattering detector</i> / Lichtstreuendetektor
EOF	elektroosmotischer Fluss
Eru	Erythrulose
Ery	Erythrose
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	und andere
EtOx	<i>O</i> -Ethylhydroxylamin
F	Phenylalanin
FT	<i>film thickness</i> / Filmdicke
FA	Formaldehyd
FID	Flammenionisationsdetektor
Fru	Fructose
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethylchloroformiat
G	Glycin
Ga	Milliarde Jahre (Gigaannum)
GA	Glycolaldehyd
Gah	Galactoheptose
Gal	Galactose
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
Gly	Glycerinaldehyd
Gul	Gulose
h	Stunde
H	Histidin
HACl	Hydroxylamin
HILIC	<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> /

	hydrophile Interaktionschromatographie
HMS	Hydroxymethansulfonat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> / Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	hochauflösend
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMS	Hydroxymethylsulfonat
Hz	Hertz
I	Isoleucin
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> / optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas
ID	<i>internal diameter</i> / Innendurchmesser
Ido	Idose
IPA	2-Propanol
IS	Interner Standard
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K	Lysin
$\lambda$	Wellenlänge
L	Länge
L	Leucin
LAG	<i>liquid assisted grinding</i>
LOD	<i>limit of detection</i> / Detektionslimit
LOQ	<i>limit of quantification</i> / Quantifizierungslimit
LPA	Lineares Polyacrylamid
LUCA	<i>last universal common ancestor</i> / Urvorfahr
Lyx	Lyxose
M	Methionin
Ma	Millionen Jahre (Megaannum)
Man	Mannose
$\gamma$ -MAPS	$\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan / 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat
MBTFA	<i>N</i> -Methyl-bis(trifluoroacetamid)
min	Minute
MM	<i>mixer mill</i> / Schwingkugelmühle

---

MPA	3-Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektrometrie
MSA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)acetamid
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Asparagin
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
NCE	<i>normalised collision energy</i> / normalisierte Kollisionsenergie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTP	Nukleosidtriphosphat
O	Hydroxyprolin
OD	<i>outer diameter</i> / Außendurchmesser
OPA	<i>o</i> -Phthalaldehyd
OV-225	50%-Methyl-25%-cyanopropyl-25%-phenylsilikon Copolymer
p	Druck
P	Prolin
Pa	Pascal
PITC	Phenylisothiocyanat
Psi	Psicose
PVA	Polyvinylalkohol
Q	Glutamin
R	Arginin
Rbu	Ribulose
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rib	Ribose
RID	<i>refractive index detector</i> / Brechungsindexdetektor
RIU	<i>refractive index unit</i> / Brechungsindexeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reverse phase</i> / Umkehrphase
rpm	<i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SE-52	5%-Phenylpolysiloxan-95%-methylpolysiloxan Copolymer

---

SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SIPF	<i>salt induced peptide formation</i> / Salz induzierte Peptidbildung
Sor	Sorbose
SPE	<i>solid phase extraction</i> / Festphasenextraktion
t	Zeit
T	Temperatur
T	Threonin
Tag	Tagatose
Tal	Talose
TCD	<i>thermal conductivity detector</i> / Wärmeleitfähigkeitsdetektor
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFAI	Trifluoracetylimidazol
Thr	Threose
TIC	<i>total ion current</i> / Totalionenstrom
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl
TMSI	<i>N</i> -Trimethylsilylimidazol
TOF-MS	<i>time-of-flight mass spectrometry</i> / Flugzeitmassenspektrometer
UV	Ultraviolett
V	Valin
v/v	Volumenverhältnis
W	Tryptophan
Xlu	Xylulose
Xyl	Xylose
Y	Tyrosin



# Kurzfassung

In der präbiotischen Chemie werden Reaktionspfade und -netzwerke biologisch relevanter Moleküle unter plausiblen Bedingungen der Frühen Erde untersucht. Der Entwicklung von Leben und der biologischen Evolution der verschiedenen Lebensformen ging eine chemische Evolution voraus, welche aus abiotischer Materie lebensfähige Strukturen schuf. Die notwendigen Moleküle für Metabolismus, Informationsspeicherung und Kompartimentalisierung sind unter anderem Aminosäuren und Peptide, Zucker, Nukleotide sowie Lipide. Hinweise auf die Existenz von flüssigem Wasser auf der frühen Erde sowie die Notwendigkeit von Wasser für alle bekannten Lebensformen führten zu dessen Verwendung als offensichtliches Lösungsmittel für präbiotische Reaktionen. Jedoch ist dabei die Synthese von Kondensationsprodukten sowie die Stabilität einiger Produkte in wässriger Lösung problematisch.

In der vorliegenden Dissertation werden daher wasserfreie Reaktionsbedingungen für präbiotische Synthesen betrachtet. Dabei stehen zur realistischeren Simulation präbiotischer Bedingungen komplexe Mischungen und Reaktionsnetzwerke im Fokus anstelle von gezielten chemischen Umsetzungen einzelner Reaktanden. Es wurde der Aufbau zweier Grundbausteine in wasserfreien Reaktionsmedien untersucht: die Peptidsynthese in flüssigem Schwefeldioxid und die Monosaccharidsynthese unter lösungsmittelfreien Bedingungen.

Das erste Themengebiet (Kapitel 4) befasst sich mit der Kondensation von Aminosäuren zu Peptiden in hygroskopischem Schwefeldioxid, welches durch vulkanische Emissionen auftritt. Es wurden verschiedene Trennmethode zur Analyse komplexer Mischungen der proteinogenen Aminosäuren sowie kleiner Peptide per Kapillarelektrophorese und Hochleistungsflüssigchromatographie entwickelt. Durch die Verwendung einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare konnten Kapillarwechselwirkungen unterbunden und eine stabile Trennung erzielt werden. Gekoppelt mit einer massenspektrometrischen Analyse konnten die Reaktionsmischungen anhand dieser Methode detailliert untersucht und die Peptidsequenzen aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Schwefeldioxid ein geeignetes Lösungsmittel für Kondensationsreaktionen sein kann und ein durch Kupfersalze katalysierter Peptidaufbau zu Di- bis Tetrapeptiden möglich ist. Die Peptidbildung in Mischungen der kanonischen Aminosäuren wurde in Hinblick auf Selektivitäten in der Produktbildung untersucht. Dipeptide aller 20 Aminosäuren sowie die Bildung von Cystin und dessen Peptide konnten beobachtet werden. Auch bei niedrigen Konzentrationen und geringerer

Katalysatormenge fand eine Peptidbildung statt. Mit Schwefeldioxid als Lösungsmittel konnte somit ein neues präbiotisches Szenario aufgestellt und die Peptidkondensation erfolgreich durchgeführt werden.

Im zweiten Themengebiet (Kapitel 5) wird die mechanochemische Zuckerbildung behandelt. Ausgehend von Glycolaldehyd und Formaldehyd kann mithilfe von basischen Katalysatoren unter mechanischen Einflüssen ein Netzwerk aus Monosacchariden aufgebaut werden. Zur Untersuchung dieses Netzwerks ohne Informationsverlust wurden zunächst Derivatisierungs- und Trennmethode für Gas- und Flüssigchromatographie entwickelt. Als umfassendste Methode wurde eine Oximierung mit anschließender Silylierung und gaschromatographischer Analyse gefunden, welche im Folgenden standardmäßig zur Analyse der Reaktionen eingesetzt und bei Bedarf von weiteren Methoden ergänzt wurde. Im Anschluss wurden Mineralien auf ihre katalytischen Eigenschaften in der mechanochemischen Zuckerbildung aus Glycolaldehyd untersucht. Im Labormaßstab wurden Kugelmöhlen zur Simulation der mechanischen Krafteinwirkung verwendet. Es wurde für eine Vielzahl an Mineralienklassen Tetrosen- und Hexosenbildung nachgewiesen. Das Reaktionsnetzwerk konnte um adsorbierten Formaldehyd erweitert und auch in geringen Mengen eine Umpolung und Dimerisierung des Formaldehyds erzielt werden. Die Robustheit des Netzwerks gegenüber äußeren Einflüssen sowie die Stabilität der Zucker unter den gewählten wasserfreien Bedingungen konnte gezeigt werden. Somit konnte mit der mechanochemischen Variante der Formosereaktion eine valide Alternative zur wässrigen Reaktion erhalten werden, welche die fehlende Selektivität und Stabilität in Wasser überwindet. Im Kontext des Ursprungs des Lebens liefert diese mechanochemische Festphasenreaktion einen plausiblen Weg zu Zuckern auf der Erde oder auf Meteoriten.

# Abstract

Prebiotic chemistry investigates reaction pathways and networks of biologically relevant molecules under prebiotically plausible conditions of the early Earth. The formation of life and the biological evolution of different life forms was preceded by a chemical evolution forming living organisms from abiotic materials. The necessary molecules for metabolism, information storage and compartmentalisation include amino acids and peptides, sugars, nucleotides and lipids. Evidence for the existence of liquid water on the early Earth and the necessity of water for all known living systems lead to the assumption and investigation of water as the most apparent solvent for prebiotic reactions. However, the synthesis of condensation products as well as the stability of some products in water prove problematic.

This dissertation therefore deals with water-free reaction conditions on the early Earth. In order to realistically simulate prebiotic conditions, complex mixtures and reaction networks are investigated instead of selective chemical transformations of individual components. The formation of two basic building blocks under water-free conditions is explored: the peptide synthesis in liquid sulphur dioxide and the monosaccharide synthesis under solvent-free conditions.

The first topic (chapter 4) covers the condensation of amino acids forming peptides in the hygroscopic solvent sulphur dioxide, which is available due to volcanic emissions. Different separation techniques for the analysis of complex mixtures of the proteinogenic amino acids and small peptides by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography were developed. With the use of a polyacrylamide-coated capillary analyte-wall-interactions were suppressed and a stable separation maintained. Coupled to mass spectrometry, this method was used for the detailed analysis of the reaction mixtures and the peptide sequences were determined *via* fragmentation patterns. It was shown that sulphur dioxide represents a suitable solvent for condensation reactions and that a copper-catalysed peptide formation up to tetrapeptides can be performed within. The selectivity of peptide formation in mixtures of the canonical amino acids was investigated. Dipeptides incorporating all 20 amino acids as well as cystine and its peptides were detected. Even with low concentrations and small catalyst loadings peptides were formed. A new prebiotic scenario was introduced with sulfur dioxide as a solvent and peptide condensation was successfully performed within.

The second topic (chapter 5) addresses the mechanochemical sugar formation. Starting from glycolaldehyde and formaldehyde and a basic catalyst a network of monosaccharides can be formed under mechanical energy input. To achieve a routine analysis of this network without loss of information, derivatisation and separation techniques for gas and liquid chromatography were developed in a first step. The most comprehensive method found was the oximation and silylation with subsequent gas chromatographic analysis, which was used in the following as standard procedure and could be complemented by additional methods. After establishing the analysis, minerals were probed for their catalytic properties in the mechanochemical sugar formation starting from glycolaldehyde. Under laboratory conditions, ball mills were used for the simulation of mechanical energy inputs. For a variety of mineral classes tetrose and hexose formation was shown. The reaction network was extended to adsorbed formaldehyde and in small quantities even the umpolung reaction and dimerisation of formaldehyde was achieved. The robustness of the network toward environmental influences as well as the stability of the sugars under the chosen water-free conditions was shown. Therefore, the mechanochemical formose reaction offers a valid alternative to the aqueous reaction, which overcomes the missing selectivity and stability in water. In the context of the origin of life this mechanochemical solid-phase reaction provides a plausible pathway to sugars on the earth or on meteorites.

# 1 Einleitung

Trotz des großen öffentlichen Interesses ist die Entstehung des Lebens auf der Erde ausgehend von abiotischer Materie hin zu lebenden Organismen noch nicht geklärt. Besonders der Mangel an überdauernden Relikten und unveränderten, geologischen Beweisstücken aus dieser Zeit erschwert diese interdisziplinäre Forschung enorm, so dass bereits die Bedingungen auf der frühen Erde umstritten sind. So sind zwar aus der Astrophysik viele Erkenntnisse zur Bildung von Planeten bekannt, es besteht allerdings eine Lücke zwischen der Entstehung der Erde bis hin zu den geologisch genauer untersuchten späteren Erdzeitaltern.

Des Weiteren kommen in der Betrachtung des Ursprungs des Lebens die Fragen auf: Was ist Leben? Was macht es aus? Welche Stufe in der Entwicklung zu unseren heutigen Lebensformen ist bereits Leben? Eine beliebte Definition für Leben wird von der NASA verwendet und beschreibt Leben als „ein sich selbst erhaltendes chemisches System, das zur Darwinschen Evolution fähig ist.“<sup>[1]</sup> In anderen Definitionen werden verschiedene Kriterien oder Eigenschaften von lebenden Systemen beschrieben. So stehen beispielsweise Informationsspeicherung und Reproduktion, Mutation und Evolution, Metabolismus und Energie sowie Kompartimentalisierung im Fokus einiger Definitionen.<sup>[2]</sup>

Die Ungewissheit über die Zustände auf der Frühen Erde sowie die Vielzahl an möglichen Kriterien für Leben führen zu einer Diversität an Forschungsansätzen zum Ursprung des Lebens. Zum einen werden die Bedingungen diskutiert, in denen präbiotische Synthesen lebensrelevanter Bausteine möglich sind. Dabei werden unter anderem hydrothermale Quellen, Süßwasserseen oder Lagunen in Erwägung gezogen. Zum anderen gibt es Theorien über die Reihenfolge der Entwicklung, bei denen meist jeweils ein Kriterium oben genannter Definitionen in den Vordergrund gestellt wird. Beispiele dafür sind die „RNA-Welt“ in Vorbereitung auf die DNA zur Informationsspeicherung oder eine „Lipid-Welt“, welche die Kompartimentalisierung und Membrane betrachtet.

Die Untersuchung präbiotischer Reaktionen unter nichtwässrigen Bedingungen steht in dieser Dissertation im Vordergrund. Dabei soll die Plausibilität möglicher Bedingungen auf der frühen Erde sowie mögliche Vorläufermoleküle und -netzwerke heute relevanter biologischer Systeme untersucht werden. Zudem soll zur Entwicklung analytischer Trennmethode zur Erforschung dieser komplexen Systeme ein Beitrag geleistet werden.

## 2 Kenntnisstand

### 2.1 Der Ursprung des Lebens

#### 2.1.1 Bedingungen auf der Frühen Erde

Nach heutigem Kenntnisstand entstand das Universum vor 13.8 Ga durch den sogenannten Urknall und expandiert seither.<sup>[3-8]</sup> Unser Sonnensystem bildete sich vor 4.568 Ga,<sup>[9]</sup> die Erde ist 4.54 Ga alt.<sup>[10]</sup> Nach aktueller Hypothese wurde etwa 20 - 100 Ma nach der Entstehung der Erde durch einen großen Einschlag eines astronomischen Körpers der Mond gebildet.<sup>[11-13]</sup> In den folgenden Millionen Jahren kühlte die aus Magma bestehende Erde ab und die Erdkruste entstand.<sup>[14]</sup> Dadurch wurde die Existenz von flüssigem Wasser möglich, erste Indizien dafür wurden auf vor 4.4 und 4.3 Ga datiert.<sup>[14-16]</sup> Aufgrund der Bedeutung von Wasser als Reaktionsmedium sowie der Notwendigkeit von Wasser für heutige Lebensformen wird dieses Datum als ein möglicher Startpunkt für die Synthese biologisch relevanter Moleküle angenommen. Im Rahmen der späteren Akkretion wird ein Großes Bombardement (*LHB: Late Heavy Bombardement*) etwa vor 3.9 Ga diskutiert, welches durch eine erhöhte Intensität von Einschlägen und der damit einhergehenden Zerstörung auf der Erde die Prozesse zur Entstehung des Lebens deutlich verzögert haben könnte.<sup>[17-20]</sup> Die Existenz oder das Ausmaß eines solchen Bombardements werden in jüngster Zeit jedoch angezweifelt.<sup>[21]</sup>

Erste Hinweise für Leben auf der Erde sind auf 4.1 Ga alte Zirkone zurückzuführen, welche Graphiteinschlüsse mit einem für biogenen Kohlenstoff typisches  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  Isotopenverhältnis enthalten.<sup>[22]</sup> Ebenfalls  $^{13}\text{C}$ -armer, potentiell biogener Graphit wurde in mehreren 3.7/3.8 Ga alten Schiefen und Sedimenten entdeckt.<sup>[23-27]</sup> Da jedoch auch nicht biogene Mechanismen bekannt sind, die eine derartige Verschiebung des Isotopenverhältnisses verursachen können, sind diese Befunde keine eindeutigen Nachweise für die Existenz von lebenden Organismen und werden weiterhin diskutiert.<sup>[28-29]</sup> Erste fossile Nachweise für Mikroorganismen folgen ab etwa 3.5 Ga. So wurden mikrobiell induzierte Sedimentstrukturen gefunden, welche auf das Vorhandensein von komplexen mikrobiellen mattenbildenden Gemeinschaften hinweisen.<sup>[30]</sup> Auch eine Mehrzahl an Stromatolithen, durch Mikroorganismen in Wasser gebildete, biogene Sedimentgesteine, ist aus dieser Zeit bekannt.<sup>[31-33]</sup> Mikrofossilien aus der Warrawoona Gruppe in Australien gehören zu den ältesten fossilen Funden und werden bereits mit Cyanobakterien in Verbindung gebracht.<sup>[34]</sup> Mit dem Auftreten komplexer, zellulärer Strukturen wird somit der

Zeitabschnitt für die ersten präbiotischen, organischen Synthesen nach hinten hin auf etwa 3.5 Ga begrenzt.

Folglich ist für die präbiotische Chemie das Zeitalter des späten Hadaikums, vor 4.4 - 4.0 Ga, sowie des frühen Archaikums, des sogenannten Eoarchaikums vor 4.0 - 3.6 Ga,<sup>[35]</sup> relevant. Es besteht noch keine einheitliche Theorie zu den damals auf der Erde herrschenden Bedingungen, stattdessen werden viele Möglichkeiten diskutiert.<sup>[36]</sup> Dabei wird auch die globale Situation von den gegebenenfalls abweichenden Bedingungen in Mikrohabitaten unterschieden, in denen die präbiotischen Synthesen stattgefunden haben könnten.

Die Ungewissheit über die Beschaffenheit der Erdoberfläche ist unter anderem darin begründet, dass wenig derart alte Gesteinsproben erhalten sind. Dies kann entweder durch Wechselwirkungen bzw. Umwälzung von Erdkruste und Mantel durch Prozesse wie Überschiebung begründet werden oder durch die verheerenden Einflüsse des LHB, bei dem möglicherweise die Erdoberfläche geschmolzen wurde.<sup>[37]</sup>

Auch die Zusammensetzung und der Oxidationszustand der Atmosphäre sind nicht vollständig geklärt. Nach der Entstehung des Mondes und möglicherweise einer als „*late veneer*“ beschriebenen Periode der Massenzunahme aus chondritischem Material wird von einem erhöhten Druck in der Atmosphäre ausgegangen, welcher in den folgenden Millionen Jahren in unbekannter Weise sank.<sup>[36]</sup> Außerdem wird angenommen, dass der Gehalt an freiem Sauerstoff in der Atmosphäre der Frühen Erde sehr gering oder überhaupt nicht vorhanden war. Dieser stieg zum ersten Mal signifikant vor etwa 2.5 - 2.0 Ga an, wobei ein sprunghafter Anstieg in der Großen Sauerstoffkatastrophe (*GOE: Great Oxidation Event*) oder ein über einen längeren Zeitraum dauernder Anstieg diskutiert werden.<sup>[38-40]</sup> Als Hauptkomponenten der Atmosphäre werden Kohlenstoffdioxid, Stickstoff, Wasser, Wasserstoff und Methan genannt. Zusätzlich werden Kohlenstoffmonoxid, Schwefelwasserstoff, Schwefeldioxid und Ammoniak diskutiert.<sup>[41-43]</sup>

Neben den Bestandteilen der Atmosphäre ist auch das Spektrum an Mineralien und kleinen organischen Molekülen von Interesse, um möglichst realistische präbiotische Reaktionen untersuchen zu können. Die meisten der heute existierenden Mineralien sind erst durch Einflüsse von lebenden Organismen entstanden. Aus den geringen Beständen, die bereits in chondritischem Material enthalten sind, wurde jedoch im Laufe der Planetenakkretion und durch Erdkrusten und -mantel Umarbeitung bereits im Hadaikum eine Vielfalt an Mineralien, wahrscheinlich bestehend aus mehreren Hundert Spezies, geschaffen.<sup>[44]</sup> Da unter anderem

noch Kontroversen über die zeitliche Einordnung des Beginns von Prozessen wie Plattentektonik herrscht, welche die Mineralienbestände verändern, ist das Auftreten von einzelnen Spezies noch nicht gesichert.<sup>[45]</sup> R. Hazen stellte eine vorläufige Liste mit Mineralien für das Hadaikum auf, welche bereits Vertreter der folgenden Mineralienklassen beinhaltet: Granate, Olivine, Feldspate, Zeolithe, Pyroxene, Amphibole, Glimmer, Tonminerale, Silicate, Elemente/Legierungen, Carbide, Nitride, Phosphide, Sulfide, Halogenide, Oxide, Hydroxide, Carbonate, Sulfate und Phosphate.<sup>[46]</sup> Außerdem können aus Gasphasenreaktionen oder durch Eintrag von extraterrestrischem Material aus Kometen, Meteoriten oder kosmischem Staub auch kleine organische Moleküle zur Verfügung gestanden haben. So wurden präbiotische Gasphasenreaktionen beispielsweise für die Bildung von Formaldehyd in Erwägung gezogen<sup>[47]</sup> und extraterrestrisch viele Substanzklassen wie Alkine, Alkohole, Ketone, Aldehyde, Carbonsäuren, Amide, Nitrile, Aminosäuren, Nukleinbasen oder Tonminerale beobachtet.<sup>[48]</sup>

Eine weitere wissenschaftliche Fragestellung beschäftigt sich mit der Temperatur auf der Frühen Erde. Das Paradox der schwachen, jungen Sonne beschreibt dabei den Widerspruch zwischen der um etwa 30% geringeren Strahlungsleistung der Sonne und dem Auftreten von flüssigem Wasser, was auf Temperaturen über 0°C hinweist. Als Erklärungsmöglichkeiten wurden verschiedene Treibhausgase sowie das Schmelzen durch Meteoriteneinschläge diskutiert.<sup>[49-51]</sup> Einen Konsens zu den Oberflächen- und Ozeantemperaturen gibt es bisher nicht. Lokale Temperaturunterschiede ähnlich zur heutigen Erde sind ebenfalls denkbar.

### **2.1.2 Modelle für den Ursprung des Lebens**

Aufgrund der Ungewissheit über die Gegebenheiten auf der Frühen Erde, gibt es eine Vielzahl an Theorien, an welchen Orten, mit Hilfe welcher Energiequellen und unter welchen Bedingungen erste organische Moleküle aufgebaut wurden.

#### **Szenarien für Orte und Umweltbedingungen**

In Bezug auf potenzielles Terrain für präbiotische Reaktionen sind die Szenarien nicht nur auf die Erde begrenzt. Die Vertreter der Panspermie-Hypothese gehen davon aus, dass Leben sich durch das Weltall ausbreiten kann und daher die Wahrscheinlichkeit für einen Ursprung auf der Erde sehr gering ist. Diese Hypothese beruht auf der Entdeckung von Extremophilen. Dies sind Lebensformen, die sich extremen Umweltbedingungen wie Temperatur, Strahlung oder pH-Wert anpassen können.<sup>[52]</sup> Für diesen Fall der extraterrestrischen Entstehung von Leben wäre nicht nur eine Entstehung auf einem anderen bewohnbaren Planeten notwendig, sondern auch ein Überleben im Weltall, für das eine Vielzahl von Faktoren relevant ist: Geschwindigkeit, Vakuum, Temperatur, Dauer, Nahrung, und Strahlung. Schließlich ist das Abfangen der

Lebensform von der Erde ohne Zerstörung des Lebens notwendig. Obwohl es Berechnungen für die theoretische Möglichkeit des Einfangens gibt und das Problem der Verdünnung in der Hydrosphäre umgangen wird,<sup>[53-56]</sup> ist die Wahrscheinlichkeit für dieses Szenario sehr gering. Darüber hinaus gibt es bisher keine experimentellen Belege der Theorie und das Problem des Ursprungs des Lebens wird nicht gelöst, sondern nur auf einen anderen Ort verschoben.<sup>[57-58]</sup> Da Verbindungen wie Nukleinbasen und Aminosäuren jedoch auf Meteoriten gefunden wurden,<sup>[59]</sup> gibt es die abgeschwächte Pseudopanspermie-Hypothese, die besagt, dass relevantes, abiotisches Material von einem anderen Himmelskörper auf die Erde gelangt ist und dort einen Beitrag zur Entstehung von Leben geleistet hat. In diesem Kontext wird auch die Synthese in interstellaren Eisformationen untersucht.<sup>[60]</sup>

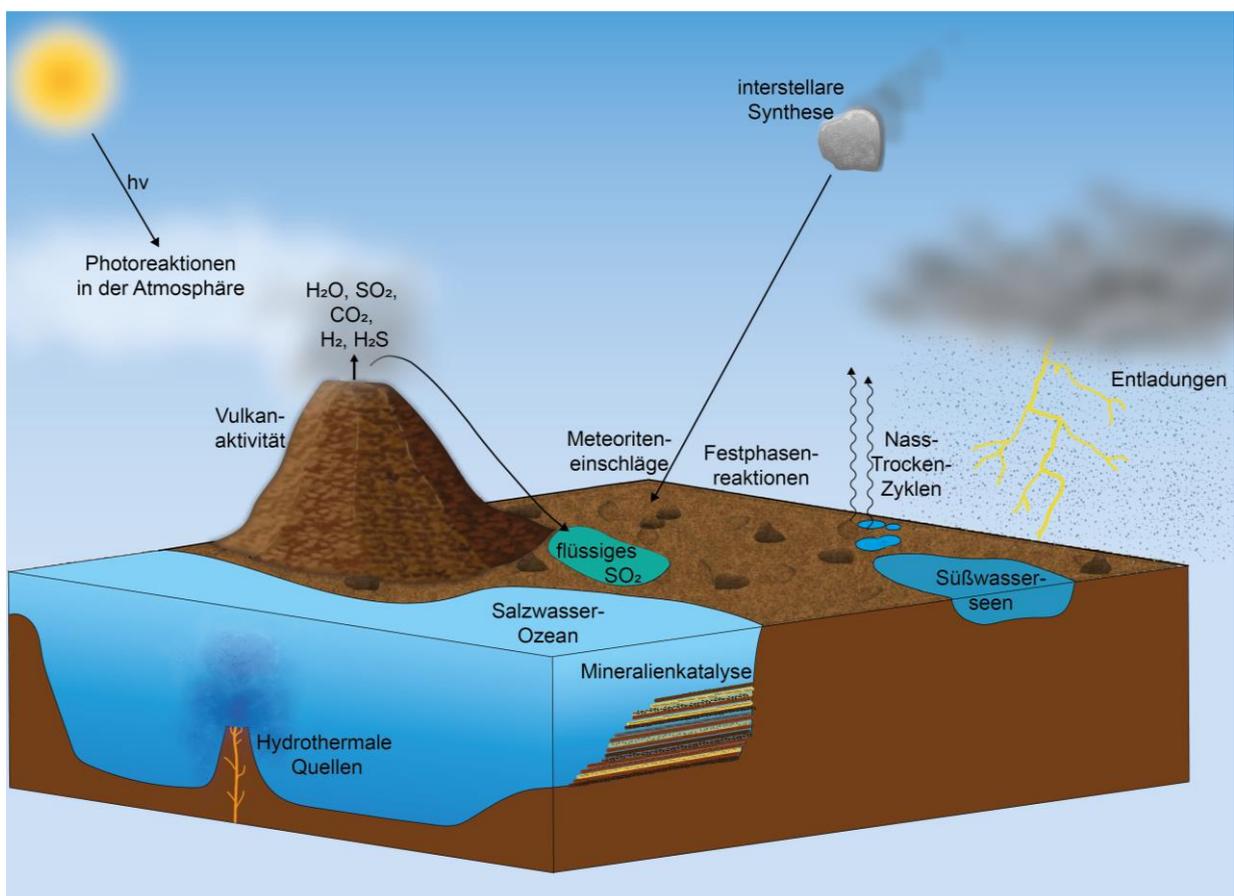


Abbildung 2-1: Mögliche Szenarien für präbiotische Reaktionen auf der frühen Erde.

Von den wässrigen Reaktionsszenarien auf der Erde ist sicherlich Darwins „warmer, kleiner Teich“ eine der bekanntesten.<sup>[61-62]</sup> Neben dem Süßwasserteich sind auch die „präbiotische Suppe“ als Salzwasserozean,<sup>[63-65]</sup> eutektische Lösungen<sup>[66]</sup> sowie hydrothermale Quellen in der Tiefsee in der Diskussion (Abbildung 2-1).<sup>[67-68]</sup> Das dabei auftretende Problem der hohen Verdünnung der Reaktanden wurde unter anderem durch die Aufkonzentration bei Verdunstung entkräftet sowie durch mögliche Thermophorese in porösen Gesteinen.<sup>[69-70]</sup>

Bei hydrothermalen Quellen tritt in der Tiefsee heißes Wasser in das kalte Ozeanwasser aus und gelöste Stoffe werden ausgefällt, welche die mineralischen Schlote sowie Wolken aus feinen Partikeln bilden. Je nach Entfernung zur vulkanischen Aktivität wird zwischen Schwarzen und Weißen Rauchern unterschieden, an denen verschiedene Bedingungen und Eigenschaften vorherrschen. Schwarze Raucher treten in größerer Nähe zur Magmaquelle auf, sind typischerweise um die 400°C heiß und haben einen sauren Charakter (pH 2-3).<sup>[71]</sup> Diese beinhalten insbesondere Sulfide und andere Eisen- und Mangan-Salze, welche für die schwarzgraue Färbung verantwortlich sind. Zudem sind Kohlenstoffdioxid, Schwefelwasserstoff, Methan sowie Ammonium vorhanden.<sup>[68, 72]</sup> In größerem Abstand finden sich die Weißen Raucher, in denen die Serpentinisierung von Olivinen stattfindet. Die helle Farbe ist aufgrund der Sulfate, Carbonate und Hydroxide zu erklären. Zusätzlich sind Wasserstoff und Methan vorhanden. Die Temperatur ist mit 40-90°C deutlich geringer und die Umgebung basisch (pH 9-11).<sup>[68, 72]</sup> Mit der vulkanischen Energiequelle, auftretenden thermischen und chemischen Gradienten und dem Vorhandensein von Metallen als Katalysatoren bieten sich hydrothermale Quellen als Szenario für präbiotische Synthese an und sind auch heute noch artenreiche Biotope.<sup>[73]</sup> Vor allem durch die von Günter Wächtershäuser in den 1980er Jahren postulierte Eisen-Schwefel-Welt wurden diese für präbiotische Reaktionen in den Fokus gestellt.<sup>[74-76]</sup> Weitere in diesem Zusammenhang diskutierte Umgebungen sind unter anderem hydrothermale Sedimentschichten,<sup>[77]</sup> subaeriale Geysire<sup>[78-79]</sup> und durch Vulkanausstöße entstehende Bimssteinflöße.<sup>[80]</sup>

Dementgegen steht jedoch die Instabilität der Produkte unter hohen Temperaturen und Hydrolyse.<sup>[81]</sup> Auch handelt es sich bei einigen Reaktionen zur Synthese biologisch relevanter Moleküle häufig um Kondensationsreaktionen, welche thermodynamisch in wässriger Lösung ungünstig sind. Daher werden darüber hinaus Nass-Trocken-Zyklen diskutiert. Diese können durch Tag-Nacht-Wechsel, Jahreszeiten, regelmäßig überschwemmende und trocknende Lagunen oder in der Nähe von Vulkanen auftreten.<sup>[82]</sup> Präbiotische Synthesen unter zyklischer Austrocknung wurden beispielsweise bereits für Nukleoside,<sup>[83]</sup> Polynukleotide<sup>[84]</sup>, Ester<sup>[85]</sup> sowie Peptide<sup>[86]</sup> vorgeschlagen.

Um die genannten Nachteile zu umgehen und die Auswahl potenzieller Reaktionsorte zu erweitern, werden neben den wässrigen Reaktionsbedingungen auch alternative Lösungsmittel sowie lösungsmittelfreie Bedingungen als mögliche Szenarien untersucht. So wurden Vulkane und magmatische Umgebung für Phosphorylierungen betrachtet<sup>[87]</sup> und Formamid als Reagenz und Lösungsmittel insbesondere für (Oligo-)Nukleotidsynthesen evaluiert.<sup>[88-89]</sup> Auch

Feststoffreaktionen als potenzielle Szenarien in Wüsten, an Stränden oder ebenfalls vulkanischen Umgebungen wurden unter anderem für Phosphorylierungen und Aminosäurepolymerisationen im präbiotischen Kontext verwendet.<sup>[90-91]</sup>

### **Energiequellen**

Für die benötigte Energiezufuhr chemischer Reaktionen ist ebenfalls eine Vielzahl an Möglichkeiten denkbar. Gerade die sich stetig verändernden Bedingungen auf der Frühen Erde können zu Auslenkungen aus dem Gleichgewicht geführt und so die chemische Entwicklung vorangetrieben haben.

Die einfachste denkbare Energiequelle ist die thermische Energie. Erhöhte Temperaturen sind je nach Hypothese als Bedingungen auf der Frühen Erde möglich,<sup>[92]</sup> diese können mit dem Einfluss von Treibhausgasen begründet werden. Auch bei einer gemäßigten Durchschnittstemperatur für die gesamte Erde, können durch lokale oder saisonale Unterschiede höhere Temperaturen stellenweise als Energiequelle vorhanden gewesen sein. Insbesondere für Feststoffreaktionen und Kondensationen wird Hitze als Triebkraft betrachtet.<sup>[86, 90]</sup> Je nach verwendeter Temperatur ist die thermische Stabilität der Produkte ein begrenzendes Kriterium für die Plausibilität der Versuche.<sup>[81]</sup> Neben erhöhten Temperaturen sind auch Temperaturgradienten als Triebkraft in der Diskussion. Diese können insbesondere in den oben genannten hydrothermalen Kontexten auftreten.<sup>[67, 70]</sup> Dabei ist auch das Zusammenspiel mehrerer Gradienten, bei Druck, Gas-, Salz- sowie Produktkonzentration, pH-Wert sowie Redoxpotential, wahrscheinlich.<sup>[67]</sup>

Durch die Abwesenheit einer Ozonschicht im Hadaikum wird trotz der geringeren Leuchtkraft der Sonne mit erhöhter UV-Strahlung gerechnet.<sup>[93]</sup> Auch wenn weitere Gase wie Kohlenstoffdioxid, Schwefeldioxid oder Schwefelwasserstoff die Erde abgeschirmt haben könnten, ist das Ausmaß der Abschirmung aufgrund der Unkenntnis über die Atmosphärenzusammensetzung nicht geklärt und von einer erhöhten UV-Strahlung im Vergleich zu heute ist dennoch auszugehen.<sup>[94]</sup> Diese Strahlung kann ebenfalls Reaktionen induzieren, wobei auch hier die potentielle Zersetzung der Produkte unter den Bildungsbedingungen problematisch ist. Die Photostabilität als evolutionärer Vorteil kann dabei jedoch selektierend gewirkt haben.<sup>[93]</sup> Neben elektromagnetischer Strahlung wird ebenfalls ionisierende Strahlung als Energiequelle für präbiotische Reaktionen diskutiert.<sup>[95]</sup>

Eine weitere Möglichkeit bieten elektrische Energiequellen. Im bekannten Miller-Urey-Experiment und späteren Variationen wurden Gasgemische bestehend aus Methan, Ammoniak,

Wasser, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefelwasserstoff, Kohlenstoffmonoxid oder -dioxid elektrischen Entladungen ausgesetzt und so relevante Verbindungen wie Aminosäuren, Carbonsäuren, Nukleinbasen und Harnstoff erhalten.<sup>[96-98]</sup> Die Verwendung der elektrischen Entladungen als Energiequelle beruht auf Gewitterblitzen oder Entladungen in Aschewolken von Vulkanen.<sup>[99]</sup>

Auch die Einschläge von Asteroiden und Meteoriten im Rahmen der späten Akkretion führen zu hochenergetischen Bedingungen, die für präbiotische Reaktionen in Betracht gezogen werden. Die Einschläge können Plasma und Spannungsdurchschläge induzieren,<sup>[100-101]</sup> Druckwellen aufbauen, Hitze erzeugen und haben eine mechanische Einschlagskraft.<sup>[49, 102]</sup> Einerseits wird eine „Sterilisation“ der Erde durch die intensiven Einschläge des LHB diskutiert,<sup>[17]</sup> andererseits bieten diese Energieeinträge möglicherweise Impulse für chemische Reaktionen.<sup>[100]</sup>

### **Reihenfolge der Entwicklung**

Auch die Vorläufer der heutigen biologischen, replizierenden Systeme sind noch unbekannt. Man geht von einem gemeinsamen Urvorfahren aller heutigen zellulären Organismen aus, dem *last common universal ancestor (LUCA)*.<sup>[103]</sup> Die Entwicklung auf der Erde dorthin, also von abiotischer Materie bis hin zu LUCA ist noch nicht ausreichend erforscht. Es herrscht eine rege Debatte, welcher Aspekt zuerst entwickelt wurde: Metabolismus,<sup>[74, 104-105]</sup> Informationsspeicherung und Replikation in einer „RNA-Welt“<sup>[106-110]</sup> oder Kompartimentalisierung in Membranen einer „Lipid-Welt“.<sup>[111-114]</sup> Zusätzlich werden noch selbstreplizierende Peptidsysteme<sup>[115-116]</sup> oder alternative Replikationssysteme diskutiert.<sup>[117-118]</sup> Ein großer Fokus liegt auf der Diskussion zwischen zwei Aspekten: Metabolismus gegenüber RNA.<sup>[119]</sup>

Die Metabolismus-Theorie ist eng verbunden mit der „Eisen-Schwefel-Welt“ und hydrothermalen Quellen als präbiotischem Szenario. Dabei wird ein selbsterhaltendes System aus chemischen Reaktionen ausgehend von Kohlenstoffdioxid ohne die Notwendigkeit einer Informationsspeicherung in den Fokus gestellt. Dies wird durch die Synthese relevanter, metabolischer Zwischenprodukte aus bekannten Stoffwechselzyklen wie dem reduktiven Acetyl-CoA-Weg oder dem Citratzyklus in abiotischen, metallkatalysierten Reaktionen gestützt.<sup>[105, 120-121]</sup>

Die Theorie einer früheren „RNA-Welt“ geht davon aus, dass die RNA als Vorläufer einerseits von DNA zur Speicherung von Erbinformationen und andererseits von Proteinen zur Katalyse chemischer Reaktionen gedient hat und im Laufe der Evolution von diesen teilweise abgelöst

wurde. Dies wird unterstützt durch das Auftreten von Ribozymen, katalytisch aktiven RNA-Molekülen. Diese können wie Proteine als Enzyme chemische Reaktionen katalysieren.<sup>[122-123]</sup> Zur Unterstützung dieser Theorie wurden verschiedene, möglicherweise präbiotische Synthesen sowohl der Komponenten der RNA wie Ribose oder den Nukleinbasen, sowie die Verknüpfung dieser zu Nukleosiden, Nukleotiden und polymeren Strukturen untersucht.<sup>[83, 124]</sup> Die Bildung von DNA nach bzw. aus der RNA ist allerdings noch ungewiss. Alternativ können auch direkt DNA-Nukleoside aus den Nukleinbasen, Acetaldehyd und Glycerinaldehyd synthetisiert werden.<sup>[125]</sup>

Weniger verbreitet ist die Hypothese einer „Peptidwelt“. Dabei wird die Replikation von Peptiden als ein weniger fehleranfälliges Informationssystem als Vorläufer der RNA diskutiert.<sup>[126]</sup> Alternativ wird ein Protometabolismus vorgeschlagen, bei dem die Peptidbildung sowie -spaltung mit Rückkopplungsmechanismen zu einer ersten Stufe der (Selbst-) Organisation führt.<sup>[127]</sup>

### 2.1.3 Flüssiges Schwefeldioxid auf der Frühen Erde

Schwefeldioxid war auf der Frühen Erde ebenso wie heute aufgrund von vulkanischen Emissionen bei Ausbrüchen sowie durch dauerhaftes Ausgasen vorhanden und wurde dabei von Schwefelwasserstoff sowie elementarem Schwefel begleitet.<sup>[128-129]</sup> Verschiedene Gasmengen der Schwefelverbindungen wurden für die Frühe Erde kalkuliert: Kasting *et al.* rechnen mit einem Partialdruck von  $p_{SO_2} = 5.8 \cdot 10^{-9}$  atm,<sup>[129]</sup> Halevy *et al.* geben die obere Grenze für das Verhältnis der Partialdrücke von Schwefeldioxid und Kohlenstoffdioxid mit  $p_{SO_2} : p_{CO_2} = 1.3 \cdot 10^{-8}$  an,<sup>[130]</sup> Ranjan *et al.* berechnen die Konzentrationen verschiedener Schwefelverbindungen für schwach reduzierende CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> Atmosphäre und geben präbiotisch relevante Mengen an SO<sub>2</sub>-abgeleiteten Ionen in Lösung an.<sup>[131]</sup> Lokale und zeitliche Veränderung der Atmosphäre sowie die Ungewissheit über die Bedingungen verhindern eine genaue Bestimmung. Unabhängig davon ist das damalige Vorkommen von Schwefeldioxid unzweifelhaft und lokale Maxima in der Nähe von Vulkanen sind wahrscheinlich und können somit als präbiotisches Szenario in Erwägung gezogen werden.<sup>[36]</sup> Aufgrund des Siedepunkts von -10.02 °C<sup>[132]</sup> sowie des geringen Dampfdrucks von Schwefeldioxid (3 bar bei 20 °C)<sup>[133]</sup> ist bei den herrschenden höheren Gesamtdrücken der frühen Erdatmosphäre das Vorkommen von flüssigem Schwefeldioxid wahrscheinlich.

In klassischer organischer oder anorganischer Synthese wird Schwefeldioxid als Reagenz für Sulfonierungen<sup>[134-135]</sup> oder als Ligand in der Komplexchemie eingesetzt.<sup>[136-138]</sup> In wenigen Fällen wird Schwefeldioxid auch als Lösungsmittel verwendet, beispielsweise bei

Umlagerungen,<sup>[139]</sup> Alkylierungen,<sup>[140]</sup> Polymerisationen,<sup>[141]</sup> der Ritter Reaktion,<sup>[142]</sup> Ringöffnungen<sup>[143]</sup> sowie -schließungen.<sup>[144]</sup> Dabei kann es gegenüber anderen organischen Lösungsmitteln zur Vermeidung ungewollter Nebenprodukte oder einer veränderten Selektivität kommen.<sup>[139]</sup>

Im präbiotischen Kontext hat Schwefeldioxid in den letzten Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen. Zwar wurde es bisher noch nicht als Lösungsmittel für präbiotische Synthesen eingesetzt, stattdessen jedoch Sulfite in wässriger Lösung, um in Wasser gelöstes Schwefeldioxid zu ersetzen. Als Reaktionen in diesem Zusammenhang wurden photochemische Reduktionen mit  $\text{Fe}^{2+}/\text{NaHSO}_3$  sowie die Schützung von Aldehyden als Bisulfidaddukte durchgeführt.<sup>[145-146]</sup> Auch Kawai *et al.* verwendeten mit Schwefeldioxid erhaltenes Hydroxymethylsulfonat (HMS) zur Schützung von Formaldehyd, um dieses in einem HMS-Reservoir zu speichern und langsam für die Formosereaktion verfügbar zu machen.<sup>[147]</sup>

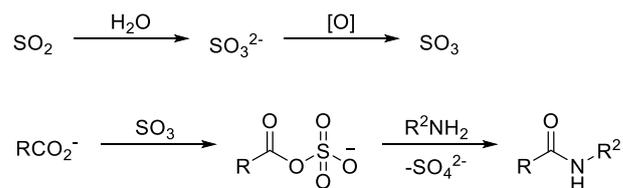


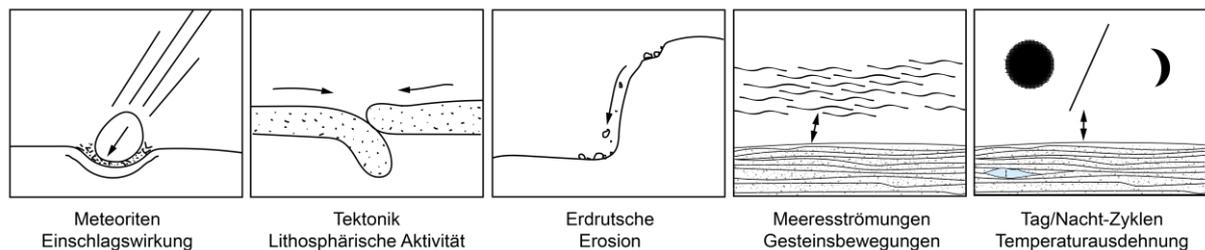
Abbildung 2-2: Peptidsynthese mit Schwefeldioxid nach Chen *et al.*<sup>[148]</sup>

Chen *et al.* konnten mit  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NaHSO}_3$  oder  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  und Kaliumhexacyanidoferrat als Oxidationsmittel die Amid-/Peptidkupplung von Carbonsäuren mit Aminen sowie von den Aminosäuren und Dipeptiden Phenylalanin, Alanin, Dialanin und Serin erzielen. Der Mechanismus wird mit der Oxidation von Schwefeldioxid zu Schwefeltrioxid, dessen Reaktion mit dem Carboxylat zum gemischten Anhydrid und einer anschließenden Reaktion mit dem Amin zum Amid beschrieben (Abbildung 2-2).<sup>[148]</sup>

#### 2.1.4 Mechanochemie auf der Frühen Erde

Wie bereits erwähnt, werden für verschiedene präbiotische Synthesen bereits Nass-Trocken-Zyklen diskutiert, um die Problematik der Kondensationen in wässriger Lösung anzusprechen. Geht man noch weiter zu vollständig trockenen, lösungsmittelfreien Bedingungen, so könnten diese Feststoffreaktionen auf der Festlandkruste der Frühen Erde entsprechen. Neben den auch für andere Reaktionsmedien diskutierten Energieeinflüssen wie UV-Strahlung oder Hitze könnten diese auch mechanischen Einflüssen unterliegen, welche zusätzlich Energie für die präbiotischen Reaktionen liefern können.

Mechanische Einflüsse können durch drastische Ereignisse wie Einschlägen von Himmelskörpern entstehen, welche auf der jungen Erde in erhöhter Frequenz auftraten.<sup>[149]</sup> Dabei sind vor allem Impakte mit niedriger Geschwindigkeit oder Landmassen in etwas größerem Abstand zum Einschlag relevant, da der Einschlag sonst durch extreme Hitzeentwicklung begleitet wird und eher destruktiv wirkt. Des Weiteren können geologische Prozesse wie lithosphärische Aktivitäten, Erosion, Diagenese oder Verwitterung Quellen für mechanische Energie sein (Abbildung 2-3). Hinweise auf die ersten plattentektonischen Bewegungen finden sich bereits in über 3.95 Ga alten suprakrustalen Gesteinen in Kanada.<sup>[150]</sup> Auch für Asteroide wurden tektonische Aktivitäten beobachtet.<sup>[151]</sup> Eine Theorie zum Einfluss von Mechanochemie im Kontext des Ursprungs des Lebens wurde von H. G. Hansma im Zusammenhang mit Schichtsilikaten, genauer Glimmern, postuliert.<sup>[152]</sup> Zwischen den Schichten können sich Moleküle einlagern, auf die durch die Bewegung der Lagen mechanische Energie übertragen wird. Diese Bewegungen können durch äußere Einflüsse wie Meeresströmungen oder Temperaturunterschiede durch Tag/Nacht-Zyklen verursacht werden und somit die präbiotischen Reaktionen an den Mineralien unterstützen.<sup>[153]</sup>



**Abbildung 2-3: Mögliche Quellen für mechanische Energieeinträge auf der frühen Erde.**

Für den Ursprung des Lebens wurden bisher vergleichsweise wenige Feststoffreaktionen mit mechanischem Energieeintrag untersucht. Die Bildung und Reaktivität von Glycolaldehyd oder auch von Aminosäuren unter Einschlagsbedingungen wurde durch Stoßexperimenten mit Projektilen beispielsweise in Leichtgaskanonen getestet.<sup>[154-155]</sup> Dabei wurde die Bildung von Tetrosen bei Eintrag von Glycolaldehyd in einer Montmorillonit-Matrix beobachtet, sowie die Bildung der Aminosäuren Glycin, Alanin, Aminobuttersäure, Isovalin und Norvalin aus kometenähnlichen Eismischungen bestehend aus Ammoniak, Wasser, Kohlenstoffdioxid und Methanol. Bei dieser experimentellen Simulation von Meteoriteneinschlägen ist jedoch auch mit deutlicher Wärmeentwicklung zu rechnen nicht nur mit mechanischer Energieübertragung. Eine mechanochemische, präbiotische Synthese von Aminosäurederivaten wurde von Bolm *et al.* in der Kugelmühle realisiert.<sup>[156]</sup> Aus Aldehyden, Aminen und Eisen-Cyanokomplexen als

Cyanidquelle wurden in einer Art mechanochemischen Strecker-Reaktion  $\alpha$ -Aminonitrile erhalten, welche im Folgenden zu Aminoamiden hydrolysiert wurden.

### 2.1.5 Präbiotische Peptidbildung

Eine Gruppe biologisch relevanter Moleküle sind die Aminosäuren und Peptide. Für Aminosäuren wurden bereits verschiedene präbiotische Entstehungsmöglichkeiten untersucht. Eines der bekanntesten Experimente der Erforschung des Ursprungs des Lebens wurde von S. Miller und H. C. Urey veröffentlicht. Dabei wurden aus Gemischen von Methan, Wasserstoff, Ammoniak und Wasser durch elektrische Entladungen Aminosäuren synthetisiert (Abbildung 2-4).<sup>[96]</sup> Der Mechanismus wird über eine Bildung von Aldehyden und Blausäure erklärt, welche im Folgenden in einer Strecker-Synthese über Aminonitrile zu den Aminosäuren reagieren.<sup>[157]</sup> Die Experimente wurden aufgrund der stark reduzierenden Gasmischung kritisiert, woraufhin diese mit weniger reduzierenden Bedingungen wiederholt wurden. Dabei ist die Ausbeute zwar geringer, aber es werden dennoch Aminosäuren gebildet.<sup>[158]</sup> In den nachfolgenden Jahren wurden die Versuche von verschiedenen Forschungsgruppen wiederholt, sowie Variationen mit anderen Gaszusammensetzungen oder anderen Energiequellen wie UV-Bestrahlung, hohen Temperaturen oder Protonenbestrahlung getestet.<sup>[159-161]</sup> Dabei wurden neben den Aminosäuren auch noch einige weitere organische Verbindungen unter anderem auch Nukleinbasen als Produkte beobachtet.<sup>[98]</sup> In Abhängigkeit von den Bedingungen werden bei diesen Versuchen verschiedene der proteinogenen Aminosäuren hergestellt sowie nicht-proteinogene Aminosäuren, beispielsweise  $\alpha$ -Aminobuttersäure oder Homoserin.<sup>[99]</sup>

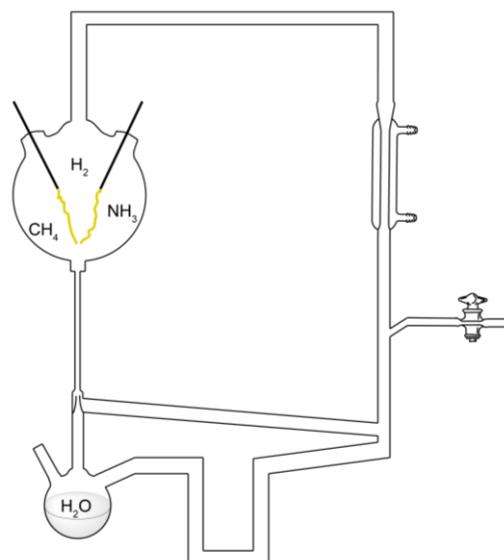


Abbildung 2-4: Aufbau des Miller-Urey-Experiments zur präbiotischen Aminosäuresynthese durch elektrische Entladungen nach Bada *et al.*<sup>[99]</sup>

Eine weitere präbiotische Synthese wurde für hydrothermale Systeme gefunden: Zhang *et al.* untersuchten die Bildung von Glycin aus Ethanolamin unter hohen Temperaturen und basischen Bedingungen mit Metallkatalysatoren.<sup>[162]</sup> Die Entstehung mehrerer proteinogener Aminosäuren wurden von Hennet *et al.* unter hohen Temperaturen und Drücken aus CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, KCN, CH<sub>2</sub>O und unter Mineralienkatalyse beobachtet.<sup>[163]</sup> Des Weiteren wurden auch in Meteoriten einige Aminosäuren gefunden, welche teilweise sogar mit Enantiomerenüberschüssen auftraten.<sup>[164]</sup> Dabei handelt es sich nicht nur um proteinogene Aminosäuren, sondern auch um deren Isomere und weitere Aminosäuren mit unterschiedlich langen Alkylketten.<sup>[165]</sup> Allerdings ist bei den Meteoritenfunden eine Kontaminierung der Proben zu diskutieren, welche durch terrestrische Quellen beim Einschlag, aber auch durch menschliches Eingreifen beim Sammeln sowie der Laborbearbeitung auftreten können.<sup>[164]</sup>

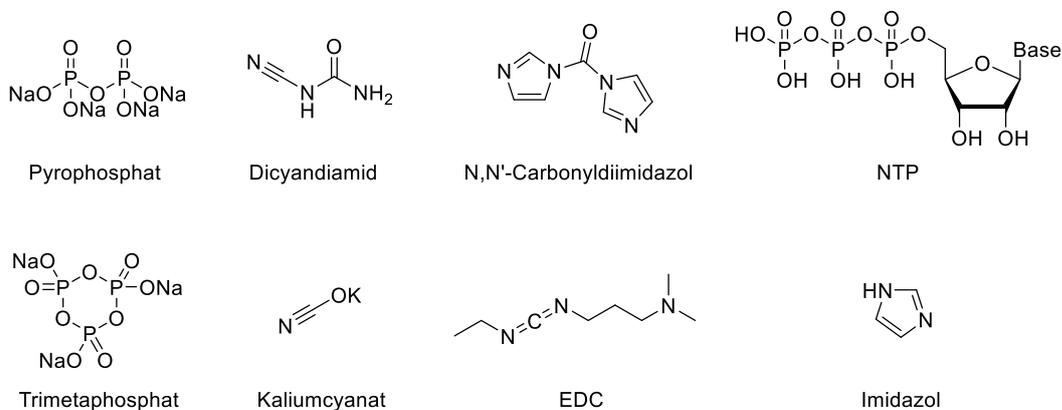
Insgesamt tritt bei diesen verschiedenen Experimenten und Quellen Glycin als häufigste der proteinogenen Aminosäuren auf, gefolgt von Alanin. Darüber hinaus werden Asparaginsäure, Glutaminsäure, Valin, Serin, Leucin, Isoleucin, Threonin und Prolin ebenfalls häufig gebildet, die weiteren proteinogenen Aminosäuren hingegen weniger.<sup>[166]</sup> Welche der Aminosäuren daher als präbiotisch plausibel angenommen werden können und welche Quellen aufgrund einer ähnlicheren Zusammensetzung relevanter für die Frühe Erde sind, wird dabei noch immer diskutiert.<sup>[167-168]</sup>

Die folgende Bildung der Peptide aus Aminosäuren weist im präbiotischen Kontext zwei Schwierigkeiten auf. Zum einen handelt es sich um eine Kondensationsreaktion, welche in den üblich diskutierten, wässrigen Reaktionsbedingungen thermodynamisch nicht bevorzugt ist. Zum anderen ist aufgrund der hohen Anzahl an möglichen Peptidsequenzen eine Selektivität in der Bildung der Peptide notwendig. Verschiedene Optionen zur präbiotischen Peptidsynthese sind dabei denkbar. Als einfachste Variante wurde das Erhitzen von Aminosäuremischungen untersucht. Dabei entstehen polymere Strukturen, welche unter dem Namen „Proteinoide“ beschrieben wurden.<sup>[91, 169]</sup> Diese entstehen vor allem in Mischungen mit größeren Mengen von Asparaginsäure und Glutaminsäure, zersetzen sich jedoch bei höheren Temperaturen wieder und sind nur geringfügig über die gewünschten Amidbindungen verknüpft.<sup>[170]</sup> Eine Alternative zu diesen Versuchen stellt die Bildung von sogenannten „Depsipeptiden“ dar. Dabei werden entweder im Feststoff oder in Nass-Trocken-Zyklen Aminosäuren mit  $\alpha$ -Hydroxysäuren wie Milchsäure oder Glycolsäure copolymerisiert.<sup>[171-172]</sup> Durch die Bildung von Esterbindungen und anschließendem Austausch durch die Amidbindungen soll so die Aktivierungsentropie gesenkt werden und die Depsipeptide als Protopeptide existiert haben.<sup>[173]</sup> Für eine Auswahl an

Aminosäuren wurde dabei der bevorzugte Einbau von proteinogenen Aminosäuren gegenüber nicht-proteinogenen Aminosäuren gefunden.<sup>[172]</sup>

Des Weiteren werden Kupplungsreagenzien eingesetzt, Metalle und Mineralienoberflächen als Katalysatoren verwendet oder statt Aminosäuren deren aktivierte Derivate polymerisiert. Diese Methoden können ebenfalls durch erhöhte Temperaturen oder Nass-Trocken-Zyklen ergänzt bzw. deren Ausbeute gesteigert werden.

Für die Kupplungsreagenzien im Kontext des Ursprungs des Lebens wurde in der Literatur eine Vielzahl an Möglichkeiten getestet, wobei deren präbiotische Plausibilität zu hinterfragen ist (Abbildung 2-5).<sup>[174]</sup> Dazu gehören lineare und zyklische Polyphosphate wie Pyrophosphat und Trimetaphosphat,<sup>[175-176]</sup> Cyanat oder Cyanamid bzw. dessen Dimer Dicyandiamid,<sup>[177-180]</sup> Imidazole und Carbodiimide wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC).<sup>[181-183]</sup> Außerdem wurden Imidazole auch insbesondere in Kombination mit Nukleosidtriphosphaten (NTPs) zur Peptidkupplung eingesetzt.<sup>[184-185]</sup> Auch konnte der positive Effekt von Mineralien(-oberflächen) wie Hydroxylapatit, Montmorillonit oder Quarz auf die Bildung von Oligopeptiden gezeigt werden.<sup>[182, 186]</sup> Bei vielen dieser Reaktionen wurden als Nebenprodukte zyklische Dipeptide, die Diketopiperazine (DKP), beobachtet.<sup>[184, 186]</sup>



**Abbildung 2-5: Mögliche Kupplungsreagenzien zur Peptidbildung.**

Eine weitere Variante zur Aminosäurenverknüpfung wurde von Rode *et al.* beschrieben: die salzinduzierte Peptidbildung (SIPF). Dabei wird ein Metallion als Katalysator verwendet und es werden in wässriger Salzlösung bei erhöhter Temperatur aus den Aminosäuren kurze Peptide gebildet.<sup>[187]</sup> Durch die hohe Konzentration der Salze ist deren Hydrathülle nicht gesättigt und sie wirken als wasserentziehendes Mittel. Zudem komplexiert das Metallion zwei Aminosäuren sowie das verwendete Salzanion (Abbildung 2-6).<sup>[188]</sup> Es wurden verschiedene Metallionen als Katalysatoren getestet und mit Kupfer(II) die besten Ergebnisse erzielt.<sup>[187]</sup> Kupfer(II) war nach Berechnungen von Ochiai ab einem Sauerstoff-Partialdruck von  $p_{O_2} = 10^{-35} \text{ atm}$  in

ausreichenden Mengen vorhanden, um für Organismen zur Verfügung zu stehen.<sup>[189]</sup> Der Umsatz der Reaktion konnte zusätzlich durch Evaporationszyklen gesteigert werden.<sup>[190]</sup> Die Reaktivität der Aminosäuren ist dabei sehr unterschiedlich, so bilden manche Aminosäuren wie z.B. Valin alleine keine Dipeptide aus. Durch den Einsatz anderer, katalytischer Aminosäuren wie Glycin werden zuerst gemischte Dipeptide gebildet und anschließend auch Homodipeptide der Aminosäuren, welche alleine keine Dipeptide bilden.<sup>[191]</sup>

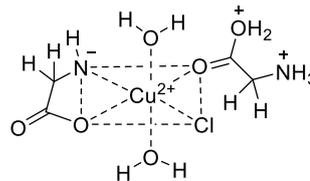


Abbildung 2-6: Kupfer-Aminosäuren-Komplex in der salzinduzierten Peptidbildung nach Rode *et al.*<sup>[188]</sup>

Wurden nicht nur  $\alpha$ -Aminosäuren eingesetzt, sondern auch  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Derivate, so wurde eine Präferenz für die  $\alpha$ -Aminosäuren beobachtet.<sup>[192]</sup> Auch bei der Verwendung von D- und L-Aminosäuren wurden Selektivitäten erhalten. So wurde ein Überschuss der optisch reinen Dimere von Alanin gegenüber den gemischten Dimeren erzielt. Außerdem war die Ausbeute für L-Alanin höher als für D-Alanin.<sup>[193]</sup> Eine Erhöhung der Kettenlänge kann durch eine mineralienkatalysierte Oligomerisierung kurzer Peptide erreicht werden.<sup>[194]</sup>

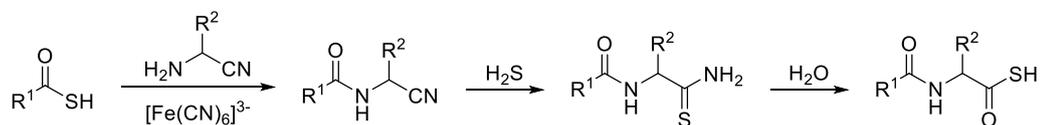


Abbildung 2-7: Peptidaufbau über Aminonitril-Kupplung und Thiolyse nach Powner *et al.*<sup>[195]</sup>

Eine Polymerisation nicht der Aminosäuren selbst, sondern verschiedener Derivate kann die Kondensation umgehen oder erleichtern. Powner *et al.* erreichten die Kettenverlängerung mit Aminonitrilen, welche im Anschluss an die Kopplung mit Schwefelwasserstoff am Nitril thiolysiert werden (Abbildung 2-7).<sup>[195]</sup> Durch Hydrolyse werden die Thiosäuren erhalten, welche im Folgenden erneut mit einem Aminonitril in Anwesenheit von Hexacyanidoferrat reagieren und zur nächsten Kettenverlängerung führen. Als längstes Peptid wurde so das Glycin Hexamer erhalten.<sup>[195]</sup>

Eine alternative Gruppe aktivierter Aminosäurederivate sind die *N*-Carboxyanhydride (NCA). Diese werden nicht nur als Zwischenstufen bei der Verwendung von Aktivierungsreagenzien diskutiert,<sup>[196-197]</sup> sondern auch selbst als präbiotisch relevante Peptidbausteine betrachtet.<sup>[198-200]</sup> Die Bildung der NCAs kann neben der Herstellung aus Aminosäuren und oben beschriebenen Aktivierungsreagenzien auch aus Carbamaten,<sup>[200]</sup> durch die Nitrosierung von

*N*-Carbamoylaminosäuren,<sup>[199]</sup> über Diacylsulfide oder mit Carbonylsulfid über Thiocarbamate erreicht werden.<sup>[201-202]</sup> Durch das gemischte Anhydrid sind NCAs nicht nur aktiviert, sondern auch an der Aminogruppe geschützt. Als weitere Vorteile der NCAs zur Peptidbildung werden die Unterdrückung der Bildung zyklischer Diketopiperazine sowie die Möglichkeit hoher Polymerisationsgrade insbesondere in Kombination mit Mineralienoberflächen genannt.<sup>[200]</sup> Zur präbiotischen Plausibilität müssen aber auch die Verfügbarkeit der Ausgangsmoleküle sowie die notwendigen Reaktionsbedingungen wie beispielsweise eine Aufkonzentrierung der Reaktanden diskutiert werden.<sup>[200, 203]</sup>

### 2.1.6 Präbiotische Zuckersynthese

Die präbiotische Synthese von Zuckern ist von großem Interesse, da sie zum einen Ribose, einen wichtigen Bestandteil der RNA liefert, sowie weitere Saccharide, die in Stoffwechselwegen, Membranen und anderen biologischen Funktionen eine Rolle spielen. Verschiedene Reaktionen wurden als mögliche präbiotische Wege zu Zuckern diskutiert. Im Folgenden wird auf zwei Möglichkeiten genauer eingegangen.

Das sogenannte „Glyoxylat Szenario“ wurde von Eschenmoser vorgeschlagen (Abbildung 2-8).<sup>[204]</sup> Basierend auf dem möglichen Zusammenhang zwischen HCN (-Oligomeren) und Bestandteilen des Citratzyklus wurden Glyoxylat und Dihydroxyfumarat als zentrale Komponenten dieses Szenarios dargestellt und deren Zugang sowohl aus HCN, als auch aus Kohlenstoffdioxid evaluiert. Das aus diesen beiden Molekülen entstehende Netzwerk soll schließlich zu Kohlenhydraten sowie Aminosäuren führen.<sup>[204]</sup> Diese Theorie wurde durch experimentelle Arbeiten von Krishnamurthy *et al.* unterstützt, in denen die Dimerisierung von Dihydroxyfumarat und die Bildung von Ketosen aus Glyoxylat und Dihydroxyfumarat gezeigt wurde.<sup>[205-206]</sup>

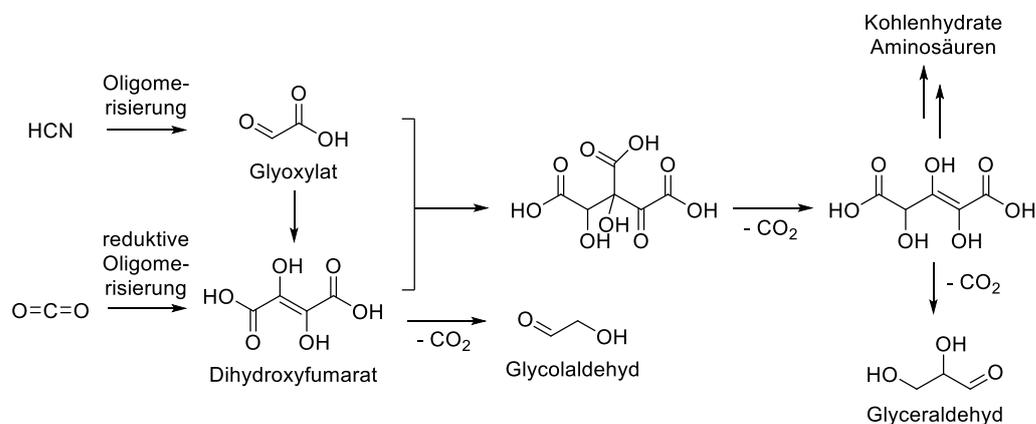


Abbildung 2-8: Ausschnitt aus Glyoxylat-Szenario zur präbiotischen Zuckersynthese nach Eschenmoser.<sup>[204]</sup>

Die Formosereaktion ist eine weitere häufig diskutierte Quelle für Zucker auf der Frühen Erde. Dabei wird ausgehend von Formaldehyd und einem Katalysator, traditionell einer anorganischen Base, ein Netzwerk an verschiedenen Zuckern und Nebenprodukten aufgebaut (Abbildung 2-9). Die Reaktion wurde von Butlerow erstmals beobachtet,<sup>[207]</sup> durch Breslow mechanistisch untersucht<sup>[208]</sup> und anschließend im präbiotischen Kontext diskutiert.<sup>[209-211]</sup>

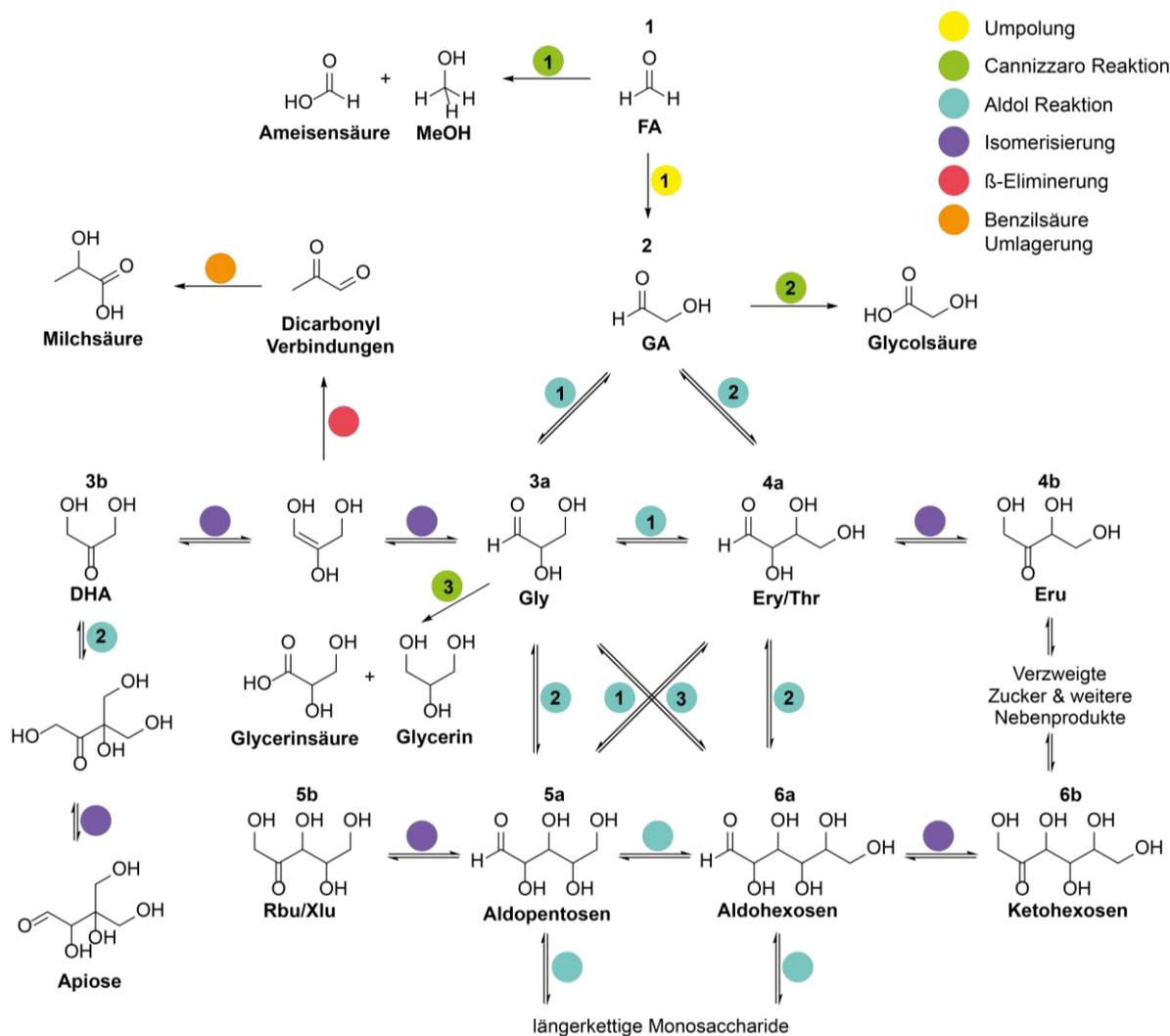


Abbildung 2-9: Ausschnitt aus dem Netzwerk der Formosereaktion. 1: Formaldehyd (FA), 2: Glycolaldehyd (GA), 3a: Glycerinaldehyd (Gly), 3b: Dihydroxyacetone (DHA), 4a: Erythrose (Ery) / Threose (Thr), 4b: Erythrulose (Eru), 5a: Aldopentosen, 5b: Ribulose (Rbu) / Xylulose (Xlu), 6a: Aldohexosen, 6b: Ketohehexosen. Abbildung angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Im ersten Schritt findet die Dimerisierung von Formaldehyd zu Glycolaldehyd statt, wofür eine Umpolung notwendig ist. Für die Funktionsweise dieses Schrittes gibt es verschiedene mechanistische Erklärungsansätze wie ein deprotoniertes Formaldehydhydrat als Zwischenprodukt,<sup>[213]</sup> ein nukleophiles Carbenanion<sup>[214]</sup> oder einen Hydridtransfer zwischen den beiden Formaldehyd-Molekülen.<sup>[215]</sup> Alternativ kann die Umpolung photochemisch

erfolgen,<sup>[216]</sup> mithilfe von Umpolungskatalysatoren wie beispielsweise Thiazoliumsalzen<sup>[217]</sup> erreicht oder über die Zugabe von enolisierbaren (Zwischen-) Produkten umgangen werden (Abbildung 2-10).<sup>[218]</sup> Neben dem Einsatz von Glycolaldehyd oder Monosacchariden, welche sofort eine Aldolreaktion ermöglichen und so die Umpolung umgehen, sind auch andere enolisierbare Verbindungen als Katalysatoren möglich. Diese bilden in einem ersten Schritt mit Formaldehyd selbst Aldolreaktionsprodukte. Handelt es sich bei den Katalysatoren nicht um Zuckerbausteine, so sind die Produkte selbst noch keine Monosaccharide, sondern diese müssen erst durch Retroaldolreaktionen freigesetzt werden. Bei der Verwendung von Thiazoliumsalzen als Umpolungskatalysatoren werden diese durch eine zugesetzte Base am C<sub>2</sub>-Kohlenstoff deprotoniert und können so nukleophil am Formaldehyd angreifen. Nach einer Kettenverlängerung kann anschließend der Zucker abgespalten werden.<sup>[217]</sup> Photochemisch wird Hydroxymethylen als reaktive Zwischenstufe der Dimerisierung vermutet.<sup>[219-220]</sup>

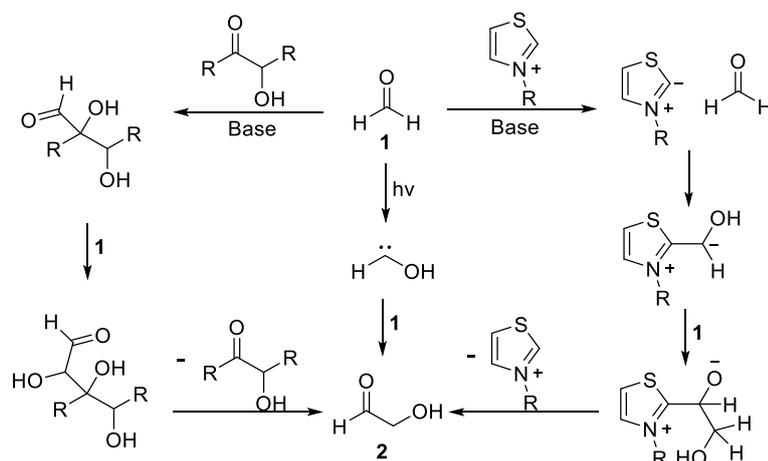


Abbildung 2-10: Vorgeschlagene Möglichkeiten für die Umpolung bzw. Dimerisierung von Formaldehyd.<sup>[217-219]</sup>

Nach der Bildung von Glycolaldehyd entwickelt sich ein Netzwerk aus Verbindungen über Aldol-/Retroaldolreaktionen sowie Isomerisierungen wie der Lobry-deBruyn-Alberda-van-Ekenstein-Umlagerung.<sup>[221]</sup> Zusätzlich sorgen verschiedene Neben- und Abbaureaktionen zur Bildung von Nebenprodukten und nach längerer Reaktionszeit zur Bildung eines unlöslichen, dunklen „Teer“. Bei diesen Reaktionen handelt es sich um Cannizzaro-Reaktionen,  $\beta$ -Eliminierungen, Benzilsäureumlagerungen und Polymerisationen, aus denen Zuckersäuren, -alkohole, Dicarbonylverbindungen und weitere Nebenprodukte entstehen.<sup>[222]</sup>

Die Wahl des Katalysators hat einen erheblichen Einfluss auf die Reaktion. So ist neben der Basizität vor allem auch das metallische Gegenion von Bedeutung, da es durch Komplexierung einen zusätzlichen Einfluss auf die Reaktion nehmen kann.<sup>[222-223]</sup> Die Hauptkritikpunkte an der Formosereaktion als Zuckerquelle sind die fehlende Selektivität,<sup>[224]</sup> sowie die Instabilität der

Produkte in der wässrigen, alkalischen Lösung.<sup>[225-226]</sup> Dies wurde von Benner *et al.* durch die Stabilisierung von Ribose mit Boraten adressiert.<sup>[227]</sup> Im präbiotischen Kontext wurde außerdem die wässrige Reaktion mit Mineralienkatalyse,<sup>[211, 228]</sup> eine hydrothermale Reaktion<sup>[229]</sup> und sogar eine interstellare Synthese untersucht.<sup>[230]</sup> Darüber hinaus wurde das Vorkommen von Ribose und anderen Zuckern auf Meteoriten mit der Formosereaktion, möglicherweise während Prozessen wie der wässrigen Alteration der Mutterkörper, in Verbindung gebracht.<sup>[231]</sup>

Als Alternative zu den wässrigen Reaktionsbedingungen mit den beschriebenen Problemen wurde von S. Lamour die lösungsmittelfreie Aldolreaktion ausgehend von Glycolaldehyd (und Glycerinaldehyd) mit Calciumhydroxid und anderen Hydroxiden und Carbonaten als Katalysator untersucht. Dabei wurde der Aufbau von Tetrosen und Hexosen beobachtet, eine mechanochemische Beschleunigung der Reaktion sowie eine höhere Selektivität im Vergleich zu der wässrigen Reaktion beobachtet.<sup>[232]</sup>

## 2.2 Analyse komplexer Mischungen kleiner Moleküle

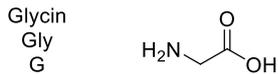
Da es sich bei den untersuchten chemischen Reaktionen im Kontext des Ursprungs des Lebens nicht um isolierte Synthesen einzelner Komponenten handelt, sondern eine hohe Komplexität der Reaktionsmischungen gegeben ist, sind hoch entwickelte Trenn- sowie Analysemethoden mit hoher Sensitivität notwendig.

### 2.2.1 Trennung und Analyse von Mischungen kurzer Peptide & Aminosäuren

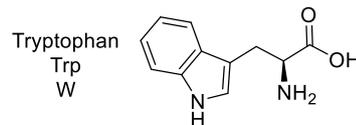
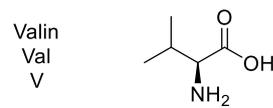
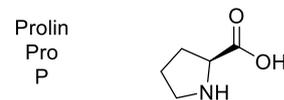
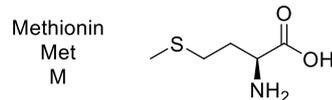
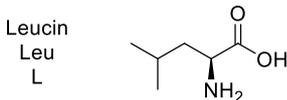
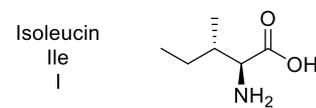
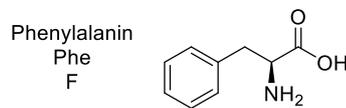
Bei den im genetischen Code vorkommenden, kanonischen Aminosäuren handelt es sich um eine vielfältige Gruppe aus 20  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren in L-Konfiguration (Ausnahme: Glycin) mit unterschiedlichen Seitenketten. Diese werden allgemein mit einem 3- und 1-Buchstabencode abgekürzt (Abbildung 2-11). Bei den Seitenketten gibt es eine große Diversität von hydrophoben Alkyl- oder Arylresten über polare, neutrale Alkohole, Thiole und Amide bis hin zu geladenen, basischen oder sauren Substituenten. Aufgrund der gemeinsamen Amino- sowie Carboxygruppe sind einige Eigenschaften innerhalb der Gruppe ähnlich, durch die Variation in der Seitenkette unterscheidet sich ihr Verhalten in Bezug auf andere Eigenschaften jedoch stärker. Ein Vergleich bzw. eine Einteilung der Aminosäuren in Gruppen kann z.B. nach Größe, Polarität, aromatischem/aliphatischem Rest oder Ladung erfolgen und dient zum Verständnis der Eigenschaften, Funktionen und dem Austausch in Proteinen.<sup>[233-234]</sup> Da keine einheitliche Gruppierung vorhanden ist, wird in dieser Arbeit eine Unterteilung nach der Polarität der Seitenketten verwendet (Abbildung 2-11).<sup>[234]</sup>

Die Trennung und Detektion von Aminosäuren kann nativ (HPLC, CE) sowie derivatisiert (HPLC, GC, CE) erfolgen. Für die Gaschromatographie kann dabei die Volatilität durch die Silylierung oder Trifluoracetylierung der Amino- und ggf. der Säuregruppen erhöht werden. Mit Oligomeren ist die notwendige Volatilität jedoch auch nach Derivatisierungsschritten kaum zu erreichen, so dass der Fokus im Folgenden auf den Methoden für die Flüssigkeitschromatographie und die Kapillarelektrophorese liegt.

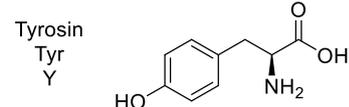
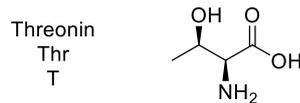
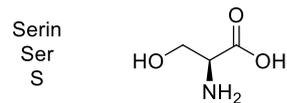
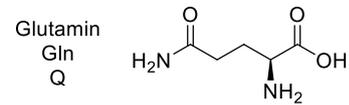
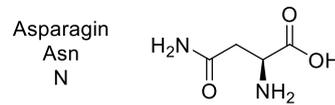
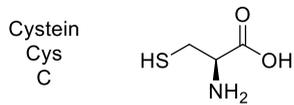
#### Ohne Seitenkette:



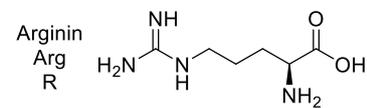
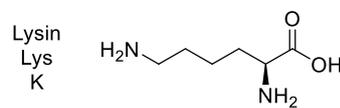
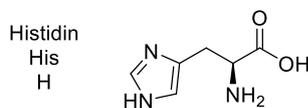
#### Unpolare Seitenkette:



#### Polare, neutrale Seitenkette:



#### Basische Seitenkette:



#### Saure Seitenkette:

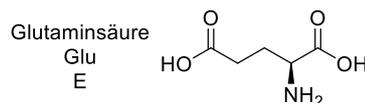
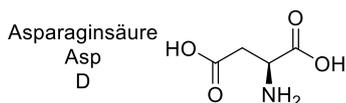


Abbildung 2-11: Gruppierung der 20 kanonischen Aminosäuren nach der Polarität der Seitengruppen und Bezeichnungen nach dem 3- und 1-Buchstabencode.

## Methoden für die HPLC

Da nur ein Teil der Aminosäuren eine chromophore Einheit beinhaltet, sind für die Flüssigchromatographie eine Reihe an Derivatisierungsmitteln bekannt, die eine UV- oder Fluoreszenz-Detektion ermöglichen (Abbildung 2-13). Eine häufige Verwendung findet *o*-Phthalaldehyd (OPA) in Kombination mit Thiolen wie 3-Mercaptopropionsäure (MPA) oder *N*-Acetyl-L-cystein (NAC),<sup>[235-236]</sup> welches mit den Aminosäuren Isoindolderivate bildet (Abbildung 2-12). Dieses Reagenz ist allerdings nur für primäre und nicht für sekundäre Aminosäuren geeignet. Aufgrund der Instabilität des Derivatisierungsreagenz sowie der Addukte wird häufig eine automatisierte On-Line Vorsäulenderivatisierung durchgeführt.<sup>[235]</sup>

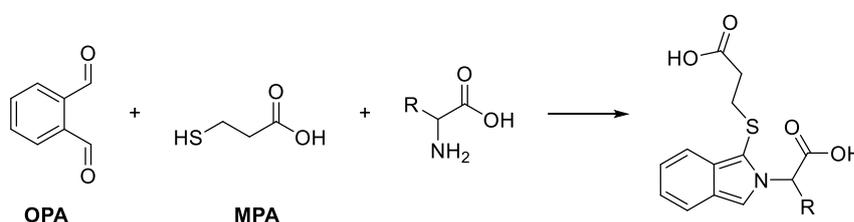


Abbildung 2-12: Derivatisierung von Aminosäuren mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) und 3-Mercaptopropionsäure (MPA).

Außerdem können Aminosäuren auch mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat (Fmoc-Cl) zu Fmoc Carbamaten,<sup>[237]</sup> mit Phenylisothiocyanat (PITC) zu Phenylthiocarbamylderivaten,<sup>[238]</sup> mit 1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulphonylchlorid (Dansyl-Cl) zu Sulfonamiden<sup>[239]</sup> sowie 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbammat (AQC / AccQ) zu Harnstoff-Derivaten umgesetzt werden.<sup>[240-241]</sup> Durch die Vielzahl an Anforderungen an die Derivatisierungsmethoden und darauffolgenden Trennungen, wie Anwendbarkeit für alle gewünschten Verbindungen, Auflösung der Trennung, Detektionsgrenzen, Dauer der Analyse, Probenvorbereitung, Stabilität der Reagenzien und Derivate, Robustheit gegenüber Matrixeffekten, gibt es kein optimales Universalmittel, sondern jede der Methoden hat ihre Vor- und Nachteile, welche für die gewünschte Anwendung evaluiert werden müssen.<sup>[242]</sup> Eine Anwendung der Derivatisierungsmethoden findet vor allem für die Aminosäuren selbst und nicht für Peptide statt.

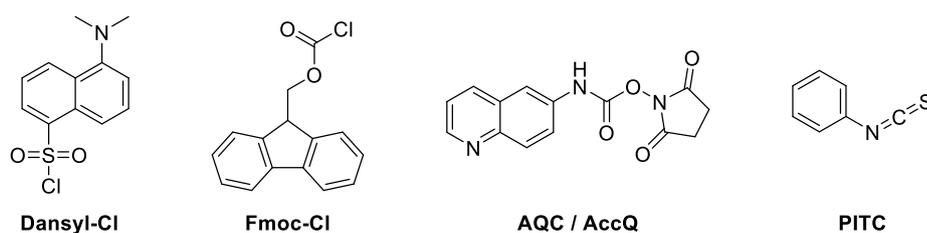


Abbildung 2-13: Auswahl an Derivatisierungsreagenzien für die HPLC-Analyse von Aminosäuren.

Aufgrund der verbesserten Detektoren, die in der HPLC-Analytik Anwendung finden, können mittlerweile auch native Aminosäuren analysiert werden. Ein Vergleich verschiedener LC-kompatibler Detektoren ergab für mehrere Aminosäuren die geringsten Detektionslimits mit Massenspektrometern.<sup>[243]</sup> In Kombination mit den zusätzlichen strukturellen Informationen, welche durch die Massenspektren geliefert werden können, ist diese Kopplung die vielversprechendste zur Analyse von underivatisierten Aminosäuren und Peptiden. Allerdings weisen die verschiedenen Aminosäuren sehr unterschiedliche Sensitivitäten und Detektionslimits aufgrund unterschiedlicher Ionisationswahrscheinlichkeiten auf.<sup>[244]</sup> Die Sensitivität zur Detektion der  $[M+H]^+$  Ionen im positiven Modus ist höher als diejenige zur Detektion der  $[M-H]^-$  Ionen im negativen Modus.<sup>[245]</sup> Die mitunter schlechte Ionisation kann durch das Vorliegen der Aminosäuren als Zwitterionen vor allem bei neutralen Laufmitteln begründet werden.<sup>[244]</sup> Bei Verwendung von Umkehrphasenbedingungen, liegt eine schlechte Wechselwirkung der Aminosäuren mit der unpolaren stationären Phase (C18) vor. Diese kann durch die Verwendung von Ionenpaar-Reagenzien verbessert werden, indem sich mit den ionischen Analyten ein Ionenpaar ausbildet, dessen stärker hydrophobe Charakter besser mit der stationären Phase wechselwirken kann, so dass eine höhere Auflösung erreicht wird.<sup>[246]</sup> Jedoch können Probleme wie eine Verschiebung der Retentionszeiten durch Akkumulation des Ionenpaar-Reagenz oder eine geringe Sensitivität für einzelne Verbindungen durch Ionensuppression auftreten.<sup>[246-248]</sup> Eine weitere Trennmöglichkeit bietet die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC), welche polare stationäre Phasen mit gebundenen Amino-, Amido- oder (zwitter-) ionischen Gruppen in Kombination mit ACN/Wasser als mobiler Phase verwendet, häufig mit ionischen Additiven wie Ammoniumformiat oder -acetat. Mehrere Methoden für Aminosäuren und einzelne Di- und Tripeptide zur Untersuchung von Blutplasma oder Zellextrakten wurden auf diese Weise entwickelt.<sup>[249-251]</sup>

### Methoden für die CE

Da die Aminosäuren mit geeignetem Hintergrundelektrolyten (BGE) und entsprechendem pH-Wert als Ionen vorliegen, kann die Kapillaronenelektrophorese genutzt werden. Eine Detektion hierbei kann unter anderem mit einem Leitfähigkeitsdetektor oder in Kopplung zu einem Massenspektrometer erfolgen. Eine Trennung der Aminosäuren erfolgt als Kationen bei niedrigem pH-Wert. Als BGE wurden unter anderem Ameisensäure,<sup>[252]</sup> Essigsäure / Hydroxyethylcellulose,<sup>[253]</sup> Octansulfonate /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,<sup>[254]</sup> Ethansulfonate<sup>[254]</sup> oder Phosphatpuffer verwendet.<sup>[255]</sup> Bei einer Kopplung mit einem Massenspektrometer werden volatile Elektrolyte benötigt, so dass nicht alle Hintergrundelektrolyte kompatibel sind. Zusätzlich wird zur

Stabilisierung des Elektrosprays eine Sprayflüssigkeit (*sheath liquid*) zugegeben, welche auch einen signifikanten Einfluss auf die Sensitivität der Detektion hat.<sup>[252]</sup> Auch die Position der Elektrosprayspitze relativ zur Kapillare des Massenspektrometers am Einlass beeinflusst die Sensitivität in hohem Maße.<sup>[256]</sup> Durch die Verwendung von Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) kann die Detektion weiter verbessert werden<sup>[256]</sup> und es können inzwischen nicht nur Aminosäuremischungen, sondern auch Proteine nach Protease-Verdau mit hoher Trennleistung in kurzer Zeit untersucht werden.<sup>[257]</sup> Dies führt zur aktuellen Anwendung von CE-MS Methoden im Bereich der Proteomik, wobei tausende von Peptiden gleichzeitig analysiert werden und welche bisher vorwiegend von HPLC-MS Methoden beherrscht wurde.<sup>[258]</sup>

Für Kapillarelektrophorese werden standardmäßig von innen unbeschichtete Kapillaren aus Quarzglas verwendet (*bare fused silica*, BFS), welche außen mit einer Polyimidbeschichtung zur Erhöhung der Flexibilität und Stabilität ausgestattet sind. Die Silanolgruppen ionisieren in Lösung und sorgen durch die Oberflächenladung für die Ausbildung einer Doppelschicht mit dem Elektrolyten. Dies führt zum Auftreten des elektroosmotischen Flusses (EOF) bei Anlegen einer Spannung.<sup>[259]</sup> Zusätzlich können die Analyten mit der Kapillarwand wechselwirken, was sich negativ auf die Auflösung und Signalform auswirken kann oder auch die Adsorption der Analyten an die Wand und eine schlechte Reproduzierbarkeit zur Folge haben kann. Dies ist insbesondere auch bei Peptiden der Fall.<sup>[260]</sup> Aufgrund dessen wurden verschiedene Beschichtungen für die Kapillarinnenseiten entwickelt. Es wird grundsätzlich zwischen dynamischen und permanenten Beschichtungen unterschieden, wobei erstere durch Adsorption an die Kapillarwand gebunden sind, letztere durch kovalente Bindungen.<sup>[259]</sup> Für eine Kombination mit einem Massenspektrometer sind permanente Beschichtungen zu bevorzugen, damit der Detektor nicht mit den verwendeten Zusätzen kontaminiert wird. Mögliche Optionen liefern Polyamide, Epoxide, Polyvinylalkohol, Polyethylenglykole sowie Derivate der Cellulose.<sup>[259]</sup> Dabei ist die Stabilität der Beschichtung über den gewünschten pH-Bereich zu beachten, sowie weitere Eigenschaften, wie die potenziell komplette Unterdrückung des EOF. Die meisten Methoden zur Beschichtung bestehen aus mehrschrittigen Verfahren. Durch eine Vorbehandlung kann die Quarzglas-Oberfläche aktiviert werden, anschließend eine Zwischenschicht durch Derivatisierung der Silanolgruppen erfolgen und im Folgenden daran das Polymer gebunden werden. Weitere Wasch- bzw. Immobilisationsschritte können folgen.

Polyvinylalkohol-beschichtete (PVA) Kapillaren haben bereits Anwendung in der Peptid-/Proteintrennung gefunden.<sup>[261]</sup> Es gibt verschiedene Methoden zur Herstellung der PVA-

Kapillaren (Abbildung 2-14). Nach Karger *et al.* wird die Oberfläche in einem ersten Silanisierungsschritt mit einem oligomeren Vinylsilanol behandelt, an dessen Vinylgruppen im Folgenden Vinylacetat copolymerisiert wird, welches anschließend in einem Verseifungsschritt zum Polyvinylalkohol umgewandelt wird (A).<sup>[262]</sup> Yu *et al.* verwendeten als Zwischenschicht Diazoharze, welche durch eine Photoreaktion an die Silanolgruppen der Kapillaroberfläche sowie an die Hydroxylgruppen des Polyvinylalkohols gebunden wurden (B).<sup>[263]</sup> Eine Alternative wurde von Belder *et al.* beschrieben, welche Glutaraldehyd als Linker einsetzt und damit gelösten Polyvinylalkohol in der Kapillare quervernetzt und so immobilisiert (C).<sup>[264]</sup>

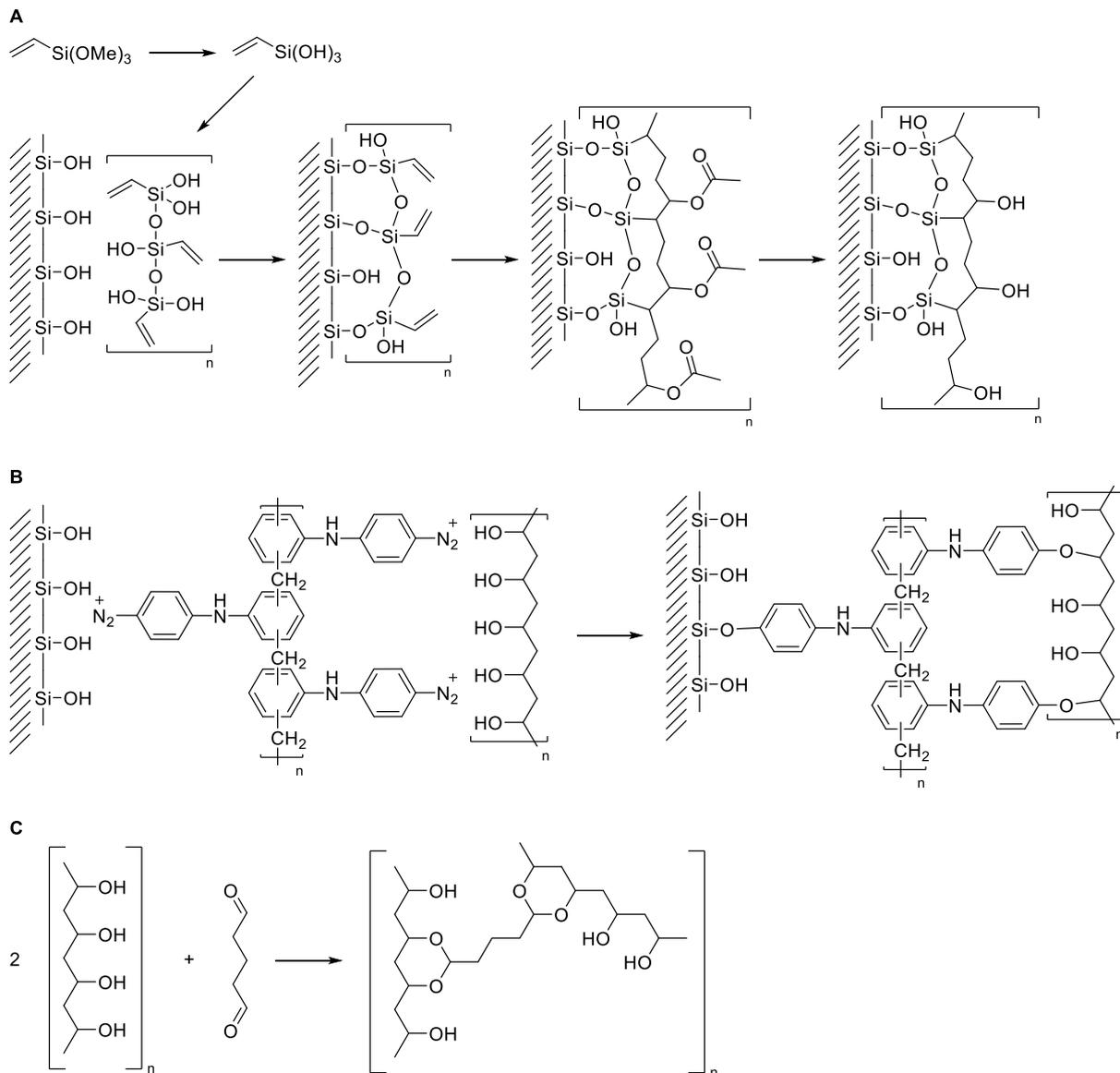


Abbildung 2-14: Methoden zur Polyvinylalkoholbeschichtung von Kapillaren für die Elektrophorese nach A: Karger *et al.*<sup>[262]</sup>, B: Yu *et al.*<sup>[263]</sup>, C: Belder *et al.*<sup>[264]</sup>

In CE-MS-MS-Methoden für Proteomik-Analysen ist lineares Polyacrylamid (LPA) das vorherrschende Beschichtungsmaterial.<sup>[258]</sup> Hjertén beschrieb 1985 eine der ersten

Beschichtungsmethoden.<sup>[265]</sup> In der Kapillare wird mit 3-(Trimethoxysilyl)-propylmethacrylat ( $\gamma$ -MAPS) eine Silanolzwichenschicht aufgebaut, an dessen Doppelbindung im nächsten Schritt das Acrylamid mit einem Persulfat Initiator und *N*-, *N*′-, *N*′′-, *N*′′′-Tetramethylethylendi-amin (TEMED) Katalysator polymerisieren kann (Abbildung 2-15). Diese Methode wurde in den folgenden Jahren automatisiert sowie für spezielle Anwendungen abgewandelt.<sup>[266-268]</sup>

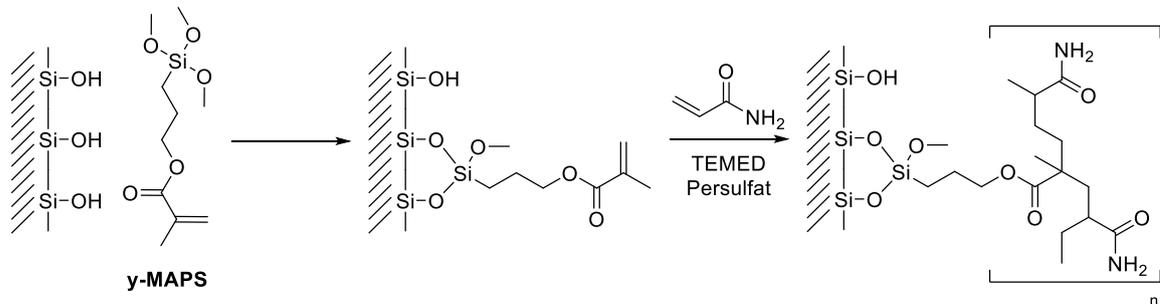


Abbildung 2-15: Lineare Polyacrylamidbeschichtung der Kapillaroberfläche für Elektrophorese.

### MS-MS von Peptiden

Peptide zeigen im Massenspektrum je nach Sequenz der Aminosäuren charakteristische Fragmente, so dass MS-MS-Experimente einen großen Beitrag zur Strukturaufklärung liefern können. Um die Beschreibung und Diskussion dieser Fragmentierungen zu vereinheitlichen wurde von Roepstorff und Fohlman eine Nomenklatur vorgeschlagen.<sup>[269]</sup> Peptide haben je Aminosäure drei mögliche Bindungen, die entlang der Peptidkette gespalten werden können: Zwischen dem C $\alpha$ -Atom und der Carboxygruppe (a, x), zwischen der Carboxygruppe und dem Amidstickstoff (b, y) und zwischen dem Amidstickstoff und dem C $\alpha$ -Atom (c, z). Mit Ladung am N-Terminus werden diese Fragmente mit a, b und c bezeichnet, am C-Terminus mit x, y, und z. Mit einer tiefgestellten Zahl wird beschrieben, welche Peptidbindung, also welche durchnummerierte Aminosäure gespalten wurde jeweils vom N- bzw. C-Terminus aus (Abbildung 2-16).

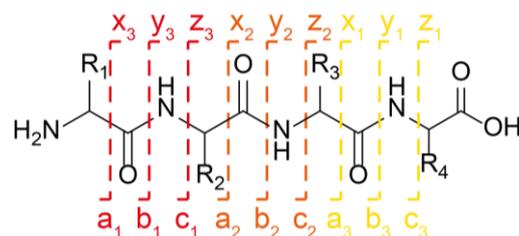


Abbildung 2-16: Nomenklatur zur charakteristischen Fragmentierung von Peptiden nach Roepstorff und Fohlman.<sup>[269]</sup>

Mithilfe von Tandem-Massenspektrometrie kann dadurch die Sequenzierung von Peptiden erfolgen.<sup>[270]</sup> Zusätzlich zu den oben beschriebenen Bindungsspaltungen kann auch Wasser

oder Ammoniak abgespalten werden oder eine Fragmentierung der Seitenketten erfolgen.<sup>[271]</sup> Durch Abgleich der massenspektrometrischen Daten mit Proteindatenbanken und durch Unterstützung moderner Software kann so eine schnelle und detaillierte Analyse großer Mengen an Proteinproben durchgeführt werden.<sup>[272-274]</sup>

### 2.2.2 Monosaccharid-Trennung und Analyse

Monosaccharide bilden die einfachste Stoffgruppe innerhalb der Kohlenhydrate und bestehen aus einem Kohlenstoffgerüst mit mindestens drei Kohlenstoffatomen, einer Carbonylgruppe und mehreren Hydroxygruppen. Zur Analyse komplexer Zuckerreaktionsgemische ist deren Trennung inklusive ihrer Bausteine Formaldehyd und Glycolaldehyd notwendig.

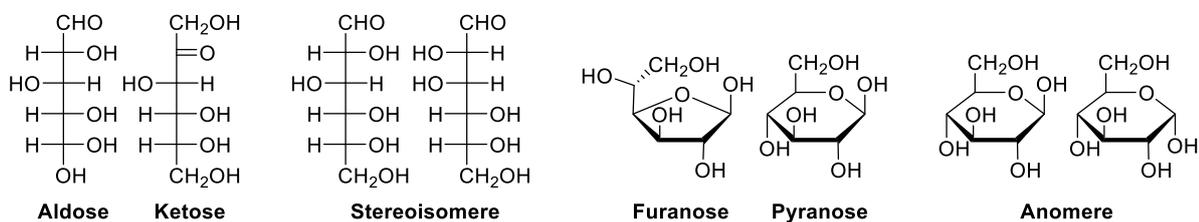


Abbildung 2-17: Mögliche Isomere der Monosaccharide.

Innerhalb der gleichen Anzahl an Kohlenstoffatomen, also beispielsweise innerhalb der Tetrosen, Pentosen oder Hexosen, gibt es bereits bei unverzweigten Ketten eine Vielzahl isomerer Strukturen (Abbildung 2-17). Es wird, je nach Position der Carbonylgruppe, zwischen Aldosen und Ketosen unterschieden sowie innerhalb der Stereoisomere durch die möglichen räumlichen Anordnungen der Hydroxygruppen. Zusätzlich liegen die Monosaccharide nicht nur in der linearen Anordnung vor, sondern ab einer Kettenlänge von vier Kohlenstoffatomen können zyklische Halbacetale gebildet werden, je nach Ringgröße die Furanosen oder Pyranosen. Auch bei diesen ist je nach räumlicher Anordnung eine weitere Unterscheidung in Anomere mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfiguration möglich. Bei den Diosen und Triosen ist eine intramolekulare Ringbildung nicht möglich, jedoch bilden diese dimere Ringstrukturen aus. In Lösung liegen diese mit den Monomeren sowie deren Hydraten im Gleichgewicht.<sup>[275]</sup>

Durch diese Vielzahl an Isomeren und strukturell ähnlichen Molekülen stellt die chromatographische Auftrennung und Analyse von komplexen Monosaccharidmischungen eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Eine direkte Analyse der Produktmischungen ist mit Flüssigchromatographie theoretisch möglich. Aufgrund des fehlenden Chromophors können zur direkten Analyse jedoch keine Standard-Detektoren wie UV- oder Fluoreszenz-Detektoren verwendet werden. Brechungsindexdetektoren bieten eine Alternative, sind jedoch nicht so sensitiv und stabil.<sup>[276]</sup> Weitere Möglichkeiten sind Lichtstreu- oder *Charged Aerosol*

Detektoren, welche allerdings nichtlineare Signalabhängigkeiten aufweisen.<sup>[277]</sup> Auch Massenspektrometer können zur Detektion von Zuckern herangezogen werden,<sup>[278]</sup> jedoch ist dabei gerade bei kleinen Molekülen aufgrund der geringen Molekülmasse eine Derivatisierung vorzuziehen.

### Derivatisierungen für HPLC

Bei der Derivatisierung für Flüssigchromatographie wird vorwiegend ein Chromophor zur Detektion über UV oder Fluoreszenz eingefügt. Zusätzlich wird häufig eine Kompatibilität mit anschließender massenspektrometrischer Analyse gewünscht. Eine Vielzahl an Methoden ist in der Literatur bereits bekannt. Diese beinhalten reduktive Alkylierung,<sup>[279]</sup> per-*O*-Benzylierung,<sup>[280]</sup> Aminierung,<sup>[281]</sup> reduktive Aminierung,<sup>[282]</sup> Hydrazon-<sup>[283-284]</sup> sowie Pyrazolon-Bildung.<sup>[285-286]</sup> Eine vollständige Umsetzung der zu analysierenden Zucker sowie die Vermeidung von Nebenprodukten sind für die Analyse notwendig. Da einige dieser Methoden Nachteile wie Informationsverlust durch Reduktion, fehlende Anwendbarkeit für Ketosen oder Optimierung nur für Oligo- und nicht für Monosaccharide aufweisen,<sup>[287]</sup> werden nur Hydrazon- sowie Pyrazolon-Bildung im Folgenden genauer betrachtet.



Abbildung 2-18: Auswahl an Derivatisierungsreagenzien zur Hydrazonbildung mit Monosacchariden.

Durch Einsatz von Hydrazinen reagiert die Carbonylgruppe der Monosaccharide in einer Kondensation zu Hydrazonen. Die Verwendung aromatischer Substituenten am Hydrazin führt so ein Chromophor ein, beispielsweise (Nitro-)phenyle oder eine Dansylgruppe (Abbildung 2-18).<sup>[223, 284, 288-289]</sup> Eine weitere Möglichkeit bietet das „Girard's T“ Reagenz, welches mit einem tertiären Amin eine ionische Verbindung einbaut, welche die Sensitivität für massenspektrometrische Versuche erhöht.<sup>[290]</sup> Das Auftreten von mehreren Signalen pro Analyt wurde in der Literatur entweder einem Gleichgewicht zwischen Hydrazon und bei Überschuss des Derivatisierungsmittels gebildeten Osazonen zugeordnet oder dem Auftreten von *E/Z*-Isomeren.<sup>[291-292]</sup> Die Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde bereits erfolgreich zur Analyse von Formosereaktionsgemischen angewandt.<sup>[293]</sup>

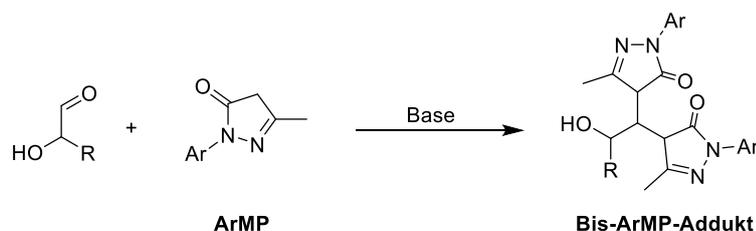


Abbildung 2-19: Derivatisierung von Monosacchariden mit 1-Aryl-3-methyl-5-pyrazolonen.

Eine weitere Möglichkeit bieten 1-Aryl-3-methyl-5-pyrazolone (ArMP, Ar = Phenyl, 4-Methoxyphenyl, 2-Naphthyl), welche unter Wasserabspaltung und folgender 1,4-Michaeladdition zweifach an reduzierende Zucker addieren (Abbildung 2-19).<sup>[294]</sup> Die hier verwendeten basischen Bedingungen führen zur Vermeidung von Sialinsäurenabspaltung, welche bei den häufig sauren Bedingungen anderer Derivatisierungen problematisch ist.<sup>[294]</sup> Die Bis-ArMP-Addukte eignen sich sowohl zur UV-Detektion als auch zur massenspektrometrischen Analyse mit charakteristischen Fragmenten.<sup>[285-286]</sup>

### Derivatisierungen für gaschromatographische Analyse

Um die Volatilität der Monosaccharide zu erhöhen und somit eine thermische Zersetzung zu verhindern, ist eine Schützung der Hydroxygruppe notwendig. In der Literatur finden sich Vorschriften zur Etherbildung,<sup>[295-296]</sup> Silylierung,<sup>[297]</sup> (Trifluor-)Acetylierung<sup>[298]</sup> sowie zur Bildung der *O*-Isopropylidenderivate.<sup>[299]</sup> Während die Methylether aufgrund ihrer aufwändigen Herstellung sowie schlechter chromatographischer Auflösung wenig angewendet werden, liegt der Nachteil der *O*-Isopropylidenderivate in der Notwendigkeit benachbarter Hydroxygruppen. Dadurch können zum Beispiel Formaldehyd und Glycolaldehyd nicht analysiert werden, so dass diese Methode nicht relevant für die Analyse von Formosereaktionsgemischen ist.

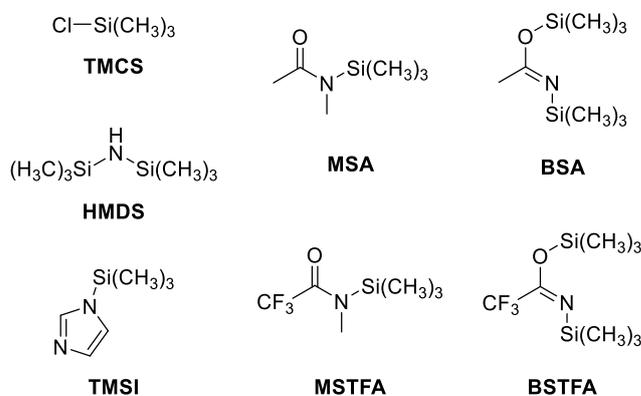


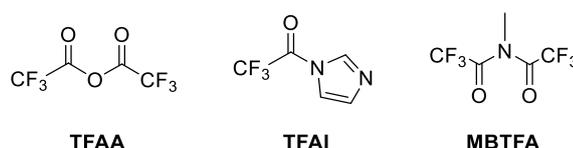
Abbildung 2-20: Auswahl an Derivatisierungsmitteln für die Silylierung von Monosacchariden.

Die Silylierung ist die verbreitetste Methode mit den Vorteilen der hohen Flüchtigkeit sowie

thermischen Stabilität der gebildeten Trimethylsilylether und einer großen Auswahl an verschiedenen Derivatisierungsmitteln (Abbildung 2-20).<sup>[300]</sup>

Die zuerst eingesetzten Silylierungsmittel waren Trimethylchlorsilan (TMCS)<sup>[301]</sup> sowie Hexamethyldisilazan (HMDS).<sup>[297]</sup> Letzteres wird durch die Einfachheit der Methode weiterhin häufig verwendet, allerdings sind mittlerweile reaktivere Derivatisierungsmittel vorhanden. Das hochreaktive *N*-Trimethylsilylimidazol (TMSI) wird vor allem für sterisch gehinderte Alkohole und Steroide verwendet.<sup>[302]</sup> Die silylierten Acetamide *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)acetamid (MSA) sowie *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) zeichnen sich durch ihre Volatilität und Reaktivität aus.<sup>[303]</sup> Durch den Einsatz der fluorierten Analoga *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) sowie *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) konnte die Löslichkeit sowie Volatilität für Kohlenhydratanalysen erneut verbessert werden.<sup>[304-305]</sup>

Die Trifluoracetate zeichnen sich durch ihre hohe Flüchtigkeit aus, welche die Analyse bei geringeren Temperaturen ermöglicht. Dadurch findet diese Methode insbesondere bei chiralen Trennungen Anwendung.<sup>[306-307]</sup> Neben dem Anhydrid der Trifluoressigsäure (TFAA) sowie Trifluoracetylimidazol (TFAI) wird zur Acetylierung auch *N*-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) eingesetzt (Abbildung 2-21). Bei dessen Verwendung wird als Nebenprodukt keine Trifluoressigsäure, sondern das flüchtige und für GC-Anwendungen daher unproblematische *N*-Methyltrifluoracetamid frei. Zudem konnte MBTFA erfolgreich für Kohlenhydrate verwendet werden ohne die bei anderen Derivatisierungsmitteln beobachteten Nebenprodukte hervorzurufen.<sup>[298]</sup>

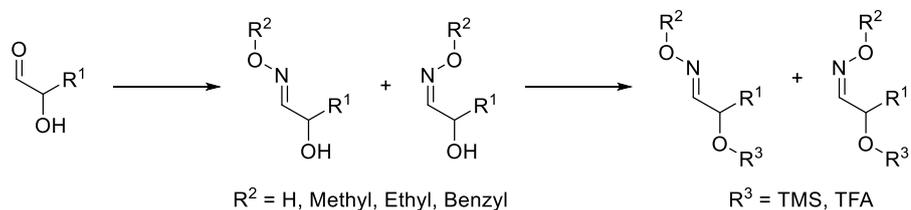


**Abbildung 2-21: Auswahl an Derivatisierungsmitteln für die Trifluoracetylierung von Monosacchariden.**

Der Nachteil dieser einstufigen Derivatisierungen, welche lediglich die Hydroxylgruppen schützen, liegt an dem Vorhandensein der zahlreichen Isomere. Durch offenkettige, Pyranose, Furanose sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen, sind bei den Pentosen und Hexosen bis zu fünf Signale pro Zucker möglich, was die Trennung und Auswertung deutlich erschwert. Vermieden werden kann dies durch Derivatisierung am Carbonylkohlenstoff, wodurch nur die offenkettige Form erhalten wird. Um die Verdampfbarkeit zu gewährleisten, muss dabei in einem zweiten Schritt erneut die Hydroxylgruppe geschützt werden. Dies wird in der Regel durch Silylierung oder

Acetylierung erreicht. Auch für diese zweistufigen Derivatisierungen sind verschiedene Methoden bekannt. Die mögliche Bildung von Aldononitril- sowie Alditol-Derivaten soll im Folgenden nicht weiter beschrieben werden, da diese durch Bildung nichtflüchtiger Produkte für Ketosen bzw. durch den Informationsverlust bei Reduktion nicht für die gewünschte Anwendung geeignet ist.<sup>[300]</sup> Auch bei der Bildung von Dialkyldithioacetalen treten (zum Teil unverdampfbare) Nebenprodukte und Zersetzungsprodukte bei Verwendung von Ketosen auf, so dass diese Methode ebenfalls nicht den Anforderungen entspricht.<sup>[308-309]</sup>

Der Einsatz von Hydroxylaminen stellt eine vielversprechende Derivatisierungsmethode dar. Die Zucker werden in Oxime und damit in ihre offenkettige Form überführt, wodurch eine Reduktion der Signale von (bis zu) fünf auf zwei erreicht wird. Diese sind durch das Auftreten von *E/Z*-Isomeren zu erklären (Abbildung 2-22). Neben dem unsubstituierten Hydroxylamin werden hierzu auch *O*-alkylierte Varianten verwendet.<sup>[310-315]</sup> Dabei wird die unsubstituierte Hydroxylgruppe im Gegensatz zu den substituierten Hydroxylaminen im zweiten Derivatisierungsschritt ebenfalls mit einer TMS- oder TFA-Gruppe geschützt. Neben der Vereinfachung der Chromatogramme wurde die Verwendung der Oxime auch zur verbesserten Quantifizierung im Vergleich zu reinen Trimethylsilylethern entwickelt.<sup>[311]</sup>



**Abbildung 2-22: Bildung der Trimethylsilylether oder Trifluoracetate der Zuckeroxime.**

Ein Vergleich der *O*-Ethyl- sowie *O*-Benzylhydroxylamine als TMS- sowie TFA-Derivate bezüglich der chromatographischen Eigenschaften, Massenspektren, Detektionslimits und Matrixeffekte wurde von Becker *et al.* durchgeführt.<sup>[316]</sup> Durch die höheren Retentionszeiten sowie die Dominanz der Benzylgruppe in den Massenspektren und dem daraus folgenden geringeren Informationsgehalt, wird die Ethylgruppe als Substituent bevorzugt. Dabei zeichneten sich die Oxim-TMS-Derivate durch die vollständige Anwendbarkeit auf alle getesteten Stoffe, Robustheit gegenüber Matrixeffekten sowie niedrigen Detektionslimits aus. Die TFA-Derivate zeigten zwar eine bessere Trennung lieferten allerdings Schwierigkeiten bei der Detektion von Ketosen.<sup>[316]</sup> Dies bestätigt die Beobachtung von Andrews, welcher von einer erhöhten Signalanzahl, zeitlich veränderten Peakverhältnissen sowie der Zersetzung der Ketosen bei Oxim-TFA Derivatisierung berichtete. Eine Begründung fand er in den, durch geringe Spuren an Trifluoressigsäure erzeugten, cyclischen Oximen.<sup>[314]</sup> Ebenfalls wurden

Hydroxycarbonsäuren als Zerfallsprodukte der trifluoracetylierten Oxime der Ketosen beobachtet und die Neutralisation mit Kaliumcarbonat zur Hinderung der Zersetzungsreaktionen eingesetzt.<sup>[317]</sup> Durch den Wechsel der stationären Phase zu einem polarerem Polymer konnten Zweckmair *et al.* mithilfe der EtOx-TFA Derivatisierung alle syn- und anti-Signale von zwei Pentosen und drei Hexosen voneinander trennen.<sup>[317]</sup>

Weiterhin steht jedoch eine erfolgreiche Anwendung der bisher etablierten Methoden auf die gesamte Monosaccharidmischung der Formosereaktion, um eine ausreichende Trennung und detaillierte quantitative Analyse dieser komplexen Mischungen zu erhalten.

### 3 Zielsetzung

Bei der Untersuchung von Reaktionen im Kontext des Ursprungs des Lebens wird überwiegend Wasser als Lösungsmittel verwendet. Jedoch ist dies nur schlecht mit den in Wasser thermodynamisch ungünstigen Kondensationsreaktionen oder der Instabilität einiger Reaktionsprodukte in wässriger Lösung zu vereinbaren. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit nichtwässrige Bedingungen für präbiotische Synthesen mit komplexen Mischungen untersucht werden.

Zum einen soll die Kupfer-katalysierte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid als ein Szenario für die frühe Erde betrachtet werden. Schwefeldioxid war durch vulkanische Emissionen vorhanden, ist unter moderaten, plausiblen Bedingungen flüssig und soll somit als präbiotisches Lösungsmittel evaluiert werden. Hierzu sollen in einem ersten Schritt Trennmethoden für komplexe Mischungen aus Aminosäuren und kurzen Peptiden entwickelt werden, um die Reaktionsprodukte zu analysieren. Mithilfe dieser Methoden soll zuerst die Peptidbildung in Schwefeldioxid aus einzelnen Aminosäuren getestet werden, um sie dann auf Mischungen kanonischer Aminosäuren auszuweiten und mögliche Selektivitäten hinsichtlich des Einbaus einzelner Aminosäuren oder der Sequenzen zu identifizieren. Außerdem sollen die Ergebnisse der Peptidbildung in Schwefeldioxid mit den Produkten der salz-induzierten Peptidbildung in wässriger Lösung verglichen werden, welche anstelle des hygroskopischen Lösungsmittels hohe Salzkonzentrationen zur Wasserentziehung nutzt.

Zum anderen soll die mechanochemische Formosereaktion als präbiotisches Szenario untersucht werden. Formaldehyd und Glycolaldehyd, sowie katalytisch aktive Mineralien waren bereits im Hadaikum auf der Erde vorhanden und mechanische Energie konnte durch Einschläge und geologische Prozesse wie Tektonik oder Erosion übertragen werden. Zur Analyse dieser Reaktionen und deren Produktmischungen sollen ebenfalls zuerst Methoden für die Trennung von Monosacchariden entwickelt werden. Dafür soll eine möglichst vollständige Trennung der verschiedenen unverzweigten Monosaccharide und Nebenprodukte erzielt und eine quantitative Analyse ermöglicht werden. Diese Methoden sollen dann angewandt werden, um das mechanochemische Formosenetzwerk auf präbiotische Plausibilität zu untersuchen. Dabei soll die katalytische Aktivität von Mineralien, welche auf der Frühen Erde existent waren, getestet und der Einsatz von Formaldehyd als Ausgangsstoff der Formosereaktion ermöglicht werden.

## 4 Kupferkatalysierte Peptidsynthese in SO<sub>2</sub>

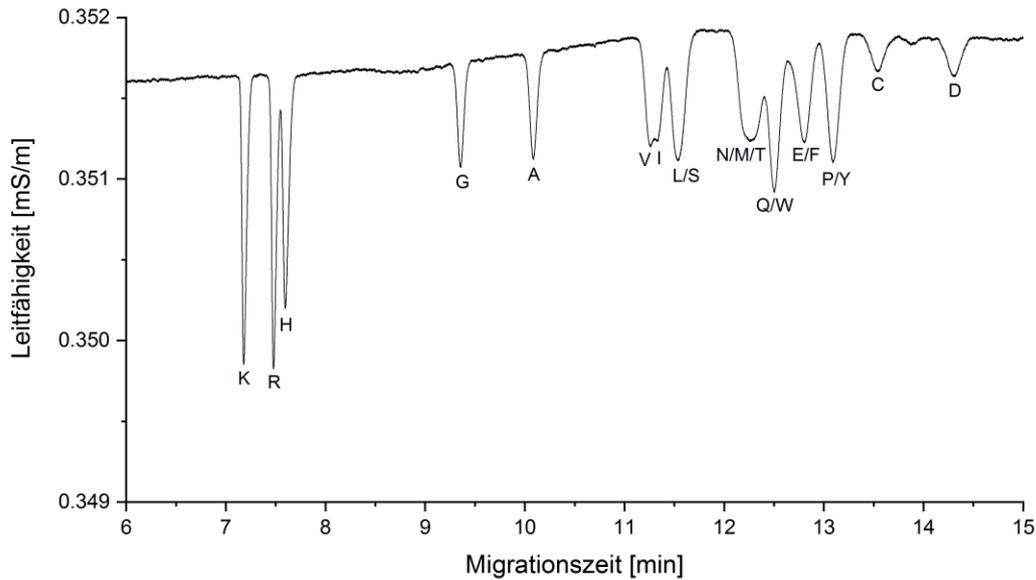
### 4.1 Analyse komplexer Aminosäuren- und Peptidmischungen

Zur Untersuchung der vielfältigen Produktmischungen wie sie bei der Peptidbildung aus mehreren Aminosäuren entstehen können, wurden zunächst Analysemethoden entwickelt und getestet. Dabei wurde eine native, underivatisierte Analyse gewählt, um eine Veränderung der Probenzusammensetzung zu verhindern, und die Kapillarelektrophorese (CE) sowie die Flüssigchromatographie (HPLC) zur Trennung verwendet. Zuerst wurde jeweils die Mischung der 20 proteinogenen Aminosäuren, eine Mischung verschiedener Di- und Tripeptide aus Alanin und Glycin und im Anschluss eine Testmischung aus den Aminosäuren Arginin, Histidin und Tryptophan sowie den Di- und Tripeptiden Glycyl-Alanin (GA), Alanyl-Alanin (AA), Glycyl-Glycyl-Glycin (GGG) und Alanyl-Glycyl-Glycin (AGG) in den zu erwartenden Konzentrationsbereichen zur Evaluation der jeweiligen Trenn- und Detektionsmethode verwendet.

#### 4.1.1 Peptid-Trennungen *via* Kapillarelektrophorese

Zur Detektion nach der Trennung mittels Kapillarelektrophorese wurde zunächst ein Leitfähigkeitsdetektor eingesetzt. Für die Analyse komplexer Proben und für eine erhöhte Sensitivität wurde anschließend die Kopplung mit einem ESI-Interface an ein hochauflösendes Orbitrap-Massenspektrometer verwendet. Die Auswahl des Hintergrundelektrolyten (BGE) wurde bereits in Hinblick auf die MS-Kopplung auf flüchtige, mit dem Massenspektrometer kompatible Komponenten beschränkt. Dabei werden in der Literatur vor allem Ameisensäure und Essigsäure in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.<sup>[258]</sup>

Zunächst wurde die Trennung der Aminosäuren auf den in der Kapillarelektrophorese standardmäßig eingesetzten *bare fused silica* (BFS) Kapillaren durchgeführt. Mit einem BGE von 2 mol/L Essigsäure konnten dabei die basischen Aminosäuren (K, R, H) sowie Alanin und Glycin getrennt werden (Abbildung 4-1). Bei den weiteren Aminosäuren überlappten die Signale jedoch und es wurden nicht alle Komponenten getrennt. Dies liegt auch an der Verbreiterung der Signale durch die Interaktion der Aminosäuren mit der geladenen Kapillarwand.



**Abbildung 4-1:** Elektropherogramm der Trennung der 20 proteinogenen Aminosäuren (100 µmol/L) auf einer BFS-Kapillare (80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 25°C).

Um diese Interaktionen und eine daraus folgende Verfälschung der Analyseergebnisse zu verhindern sowie die elektrophoretische Trennung zu verbessern, wurden im Folgenden verschiedene Beschichtungen für die Kapillarenwand getestet. Zuerst wurde Polyvinylalkohol als Beschichtungsmaterial untersucht, welches bereits in der Literatur für Proteintrennungen eingesetzt wird.<sup>[261]</sup> Dazu wurde zunächst eine PVA-beschichtete Kapillare nach der Methode von Belder *et al.* hergestellt, bei der Glutaraldehyd als Linker verwendet wird. Diese zeichnet sich durch ihre Einfachheit gegenüber weiteren bekannten, vielschrittigen Methoden aus (siehe Kap. 2.2.1). Im ersten Schritt wird die Kapillare unter Anlegung von Druck mit einer sauren Glutaraldehyd-Lösung gefüllt. Im Anschluss wird eine geringe Menge Polyvinylalkohol-Lösung eingefüllt und sofort im Stickstoffstrom durch die Kapillare gedrückt, wobei die Verlinkung an der Grenzfläche der beiden Lösungen stattfindet. Dadurch kann die Kapillarwand zunächst in einer unteren Teilschicht mit hochvernetztem PVA beschichtet werden, gefolgt von der oberen, weniger stark vernetzten PVA-Schicht.<sup>[264]</sup> Diese Methode wurde zunächst im CE-System getestet, wobei maximal ein Druck von 1 bar angelegt wurde. Dabei verstopfte die Kapillare allerdings während des Prozesses. Um einen stärkeren Druck und höheren Durchfluss zu erreichen, wurde eine Swagelok-Apparatur verwendet, bei der 5 bar Stickstoffdruck zur Verfügung standen. Um weitere mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurde die BFS-Kapillare vor der Beschichtung ausgeheizt, ein Polymer mit höherem Molekulargewicht verwendet und zusätzlich die Glutaraldehyd- sowie PVA-Lösungen vor Verwendung filtriert. Jedoch konnten auch mit diesen Maßnahmen die Probleme der Beschichtung nicht vollständig behoben werden. Zwar wurde so ein vollständiges Blockieren

der Kapillare verhindert, die Beschichtung erfolgte jedoch nicht gleichmäßig und konnte daher keine reproduzierbaren Ergebnisse, sowie nur eine unstete Basislinie in der Elektrophorese erzielen. Daher wurde für die folgende Trennung eine PVA-beschichtete Kapillare kommerziell erworben (Agilent Technologies).

Für die PVA-Kapillare wurden verschiedene Hintergrundelektrolyte getestet (Ameisensäure, Ammoniumacetatpuffer, Essigsäure) sowie das unterstützende Anlegen von Druck während der Trennung, da die Migration durch die Unterdrückung des EOF verlangsamt war. Bei der Verwendung von Ameisensäure trat eine geringe Stabilität der Messung und Schwankungen der Basislinie auf. Die Verwendung von 1 mol/L Essigsäure (pH 2.4) bei 30 kV Spannung und 10 mbar Druck zeigte die besten Trennergebnisse (Abbildung 4-2). Einige Aminosäuren überlagerten zwar weiterhin, jedoch konnten mehr Signale voneinander getrennt werden als auf der unbeschichteten Kapillare. Die Notwendigkeit eines niedrigen pH-Wertes zur Ionisation der Aminosäuren stand dabei im Konflikt mit der Stabilität der Kapillarbeschichtung (Einsatzbereich pH 2.5 - 9.5). Daher wurde neben der PVA-Beschichtung eine weitere Kapillarbeschichtung untersucht.

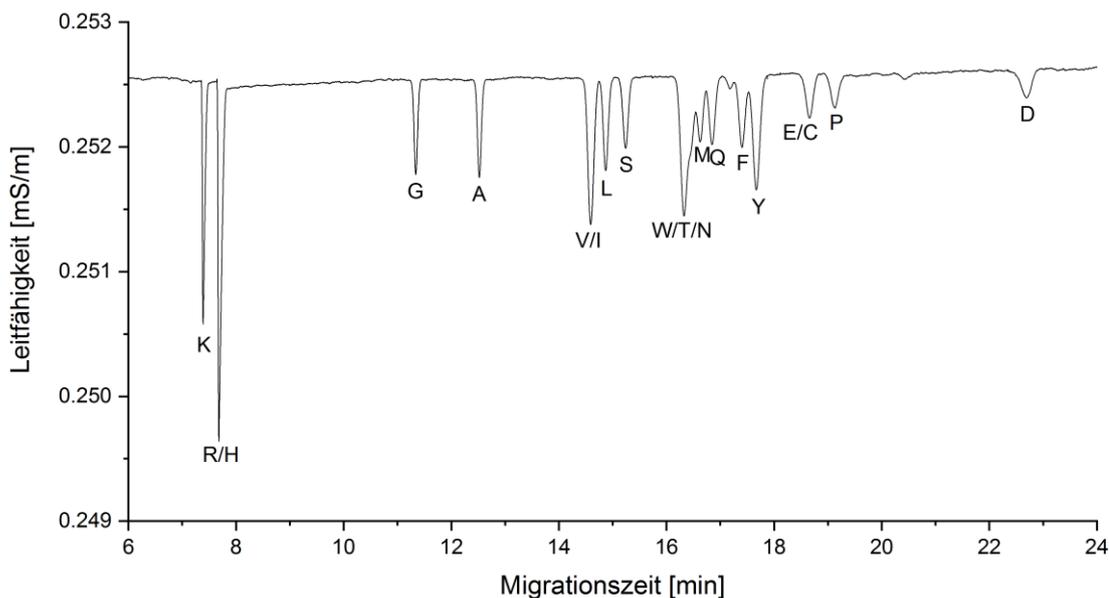
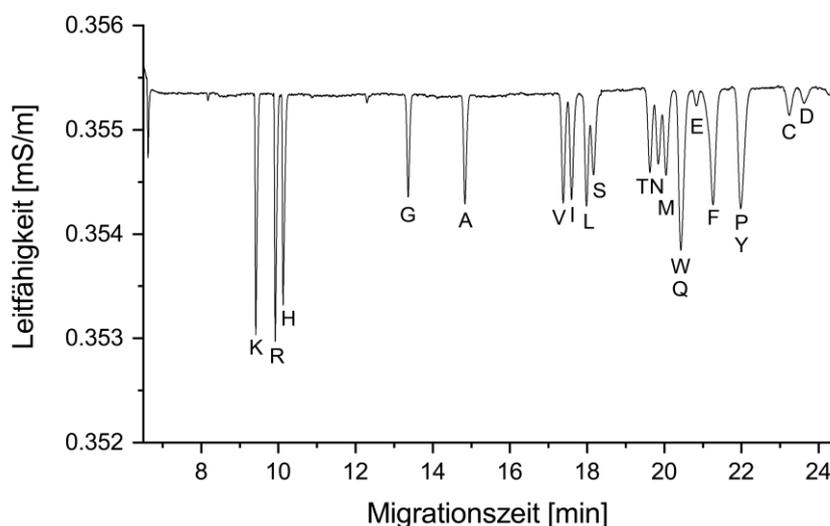


Abbildung 4-2: Elektropherogramm der Trennung der 20 proteinogenen Aminosäuren auf der Agilent PVA-Kapillare (77 cm, 1 mol/L AcOH, 10 mbar, 30 kV, 25°C).

Die Beschichtung mit Polyacrylamid wurde angelehnt an die Methode von Beneito-Cambra *et al.* in einem automatisierten Verfahren in der CE-Apparatur sowie angelehnt an die Methode von Zhang *et al.* manuell unter höherem Druck durchgeführt.<sup>[267-268]</sup> Bei beiden Methoden wurde die Kapillare zur Vorbehandlung mehrschrittig gespült, im Anschluss die Kapillarwand in einem Silanisierungsschritt mit  $\gamma$ -MAPS vorbereitet und schließlich die Polymerisation mit

Acrylamid und APS als Initiator durchgeführt. Dabei unterschieden sich die Vorgehensweisen nicht nur in der Automatisierung und dem angelegten Druck, sondern auch in weiteren Details der Beschichtungsschritte. So wurde bei der automatisierten Methode katalytische Mengen TEMED zur Polymerisation zugefügt und die Konzentration der Reaktanden, die verwendeten Lösungsmittel, Dauer sowie Temperatur der verschiedenen Schritte wichen voneinander ab. Die Methode nach Zhang *et al.* lieferte dabei eine beschichtete LPA-Kapillare, welche sich in den anschließenden elektrophoretischen Messungen gegenüber der automatisiert-beschichteten Kapillare durch eine bessere Unterdrückung des EOF sowie einen stabileren Hintergrund abhob. Dabei waren für gleichmäßige, reproduzierbare Ergebnisse der Beschichtung und die Vermeidung von Blockaden insbesondere die Dauer der Silanisierung sowie die Menge des Initiators relevant.



**Abbildung 4-3:** Elektropherogramm der Trennung der 20 proteinogenen Aminosäuren auf einer nach Zhang *et al.* beschichteten LPA-Kapillare (80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

Für die LPA-beschichtete Kapillare wurde sowohl Ameisensäure (300 mmol/L) als auch Essigsäure (2 mol/L) als BGE getestet. Mit Essigsäure konnten eine stabilere Messung sowie gute Trennung erreicht werden, so dass von den 20 proteinogenen Aminosäuren 16 getrennt wurden und nur Phenylalanin mit Asparaginsäure sowie Prolin mit Tyrosin überlagerte (Abbildung 4-3). Die Messung der Testmischung zeigte deutlich getrennt die Komponenten R, H, GA, AGG sowie W, wohingegen AA sowie GGG aufgrund der geringen Konzentration mit der Sensitivität des Leitfähigkeitsdetektors kaum zu erkennen waren (Abbildung 4-4).

Zur Untersuchung der Di- und Tripeptide wurde im Folgenden eine Kopplung mit einem hochauflösenden Massenspektrometer mit einem *sheath flow CE-ESI-MS-interface* vorgenommen. Aufgrund der geringen Flüssigkeitsmengen aus der Kapillarelektrophorese

wurde dabei zur Stabilisierung des Elektrosprays unter Zufluss eines *sheath liquids* bestehend aus Isopropanol, Wasser und Ameisensäure (50:50 + 0.05%) gemessen. Mit einer Flussrate von 5 µL/min wurde ein Kompromiss zwischen stabiler Spraybildung und geringer Verdünnung erzielt. Für die Kopplung wurde eine hohe Abhängigkeit der Stabilität und Sensitivität des Massenspektrometers von der Position der Sprayspitze gefunden. Auch Parameter der Umgebung wie die Temperatur sowie die Luftfeuchtigkeit beeinträchtigten die Stabilität der Kopplung.

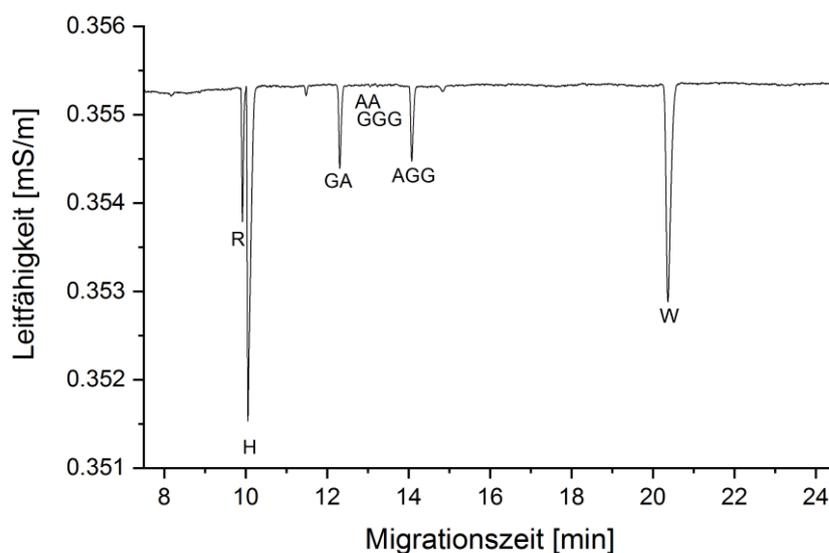
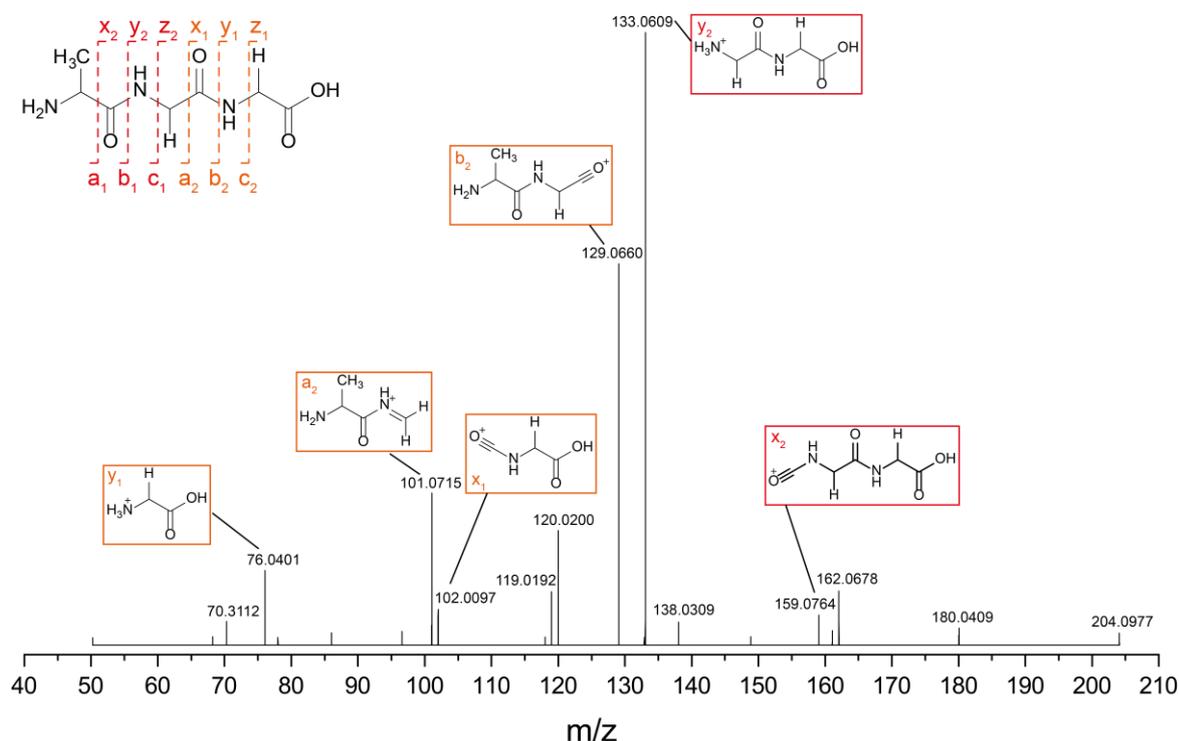


Abbildung 4-4: Elektropherogramm der Testmischung auf einer nach Zhang *et al.* beschichteten LPA-Kapillare (80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

Bei den Messungen der Referenzsubstanzen konnte die Kopplung schon zu Beginn der CE-Trennung gestartet werden, bei Proben mit Kupfersalzen wurde das Massenspektrometer erst ab 9 min nach der Migration der Kupferionen zugeschaltet. Zunächst wurde im *full scan*-Modus im Massenbereich von  $m/z$  74 – 750 gemessen, um auch alle Aminosäuren zu detektieren. Allerdings war durch das Laufmittel und den Hintergrundelektrolyten bei kleineren  $m/z$ -Werten ein hoher Hintergrund zu beobachten. Insbesondere wurde mit  $m/z$  121.1223 ein intensives Signal erhalten, welches  $[2 i\text{-PrOH} + \text{H}]^+$  entspricht. Dies führte zwar zur Stabilisierung des Totalionenstroms (*total ion current, TIC*), jedoch auch zu einem Verlust der Sensitivität der Messung der Analyten. Daher wurde für die Detektion der Peptide der Messbereich für den *full scan*-Modus auf  $m/z$  129 – 750 eingegrenzt. So konnten die Referenzsubstanzen AA, GG, AG, GA, AGG und GGG bei einer Probenkonzentration von 1 µmol/L bei einem Scanbereich von  $m/z$  129 – 750 mit einer Intensität von etwa  $3 \cdot 10^5$  detektiert werden, wohingegen die Peptide bei gleicher Konzentration und einem Scanbereich von  $m/z$  74 – 750 nicht mehr sichtbar waren und erst ab etwa 5 µmol/L detektiert werden

konnten. Für die Identifizierung der Peptide wurde auch eine anschließende  $\text{MS}^2$ -Messung mit datenabhängiger Fragmentierung durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) durchgeführt. Dazu wurden Inklusionslisten der detektierten bzw. zu erwartenden Peptide verwendet.

Eine Detektion der Peptide mit Analyse per  $\text{MS}^2$ -Messung anhand der Fragmentierung konnte auch bei den zu erwartenden unterschiedlichen Konzentrationen erhalten werden. Allerdings konnte nahe am Detektionslimit keine erfolgreiche  $\text{MS}^2$ -Messung mehr durchgeführt werden, sondern erst ab etwas höheren Intensitäten ( $\approx 8 \cdot 10^5$ ), welche bei den Referenzpeptiden meist ab einer Probenkonzentration von 2 – 5  $\mu\text{mol/L}$  erhalten wurde. Die Fragmentierung wurde bei geringer Kollisionsenergie durchgeführt (NCE 30%) und lieferte für die Peptide die bekannten Fragmentierungsmuster. Beispielhaft ist in Abbildung 4-5 das  $\text{MS}^2$ -Spektrum von Alanyl-Glycyl-Glycin (AGG), welches nach der CE-MS-Kopplung erhalten wurde, gezeigt. Deutlich traten dabei insbesondere die y- und b-Fragmentationen auf. Mithilfe der Fragmentierungsmuster konnte so im Folgenden auch gezielt bei einzelnen Peptiden ohne vorhandene Referenzsubstanzen ein Rückschluss auf die Sequenz der Aminosäuren erhalten werden.



**Abbildung 4-5:** Zuordnung der Fragmentionen im  $\text{MS}^2$ -Spektrum von Alanyl-Glycyl-Glycin (AGG) nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals bei  $t_{\text{mig}} = 14.0$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

Somit konnte mit der Beschichtung der Kapillaren mit linearem Polyacrylamid eine Methode gefunden werden, um Wand-Analyt-Wechselwirkungen zu unterbinden und eine gute kapillarelektrophoretische Trennung der Aminosäuren mit scharfen Signalen und hoher

Sensitivität erreicht werden. Auch die Kopplung mit der massenspektrometrischen Analyse konnte erfolgreich durchgeführt werden, so dass mit MS<sup>2</sup>-Experimenten die Grundlage für eine Identifizierung der kleinen Peptide auch bei einer Überlagerung möglicher Isomere in den zu untersuchenden Probenmischungen gelegt werden konnte.

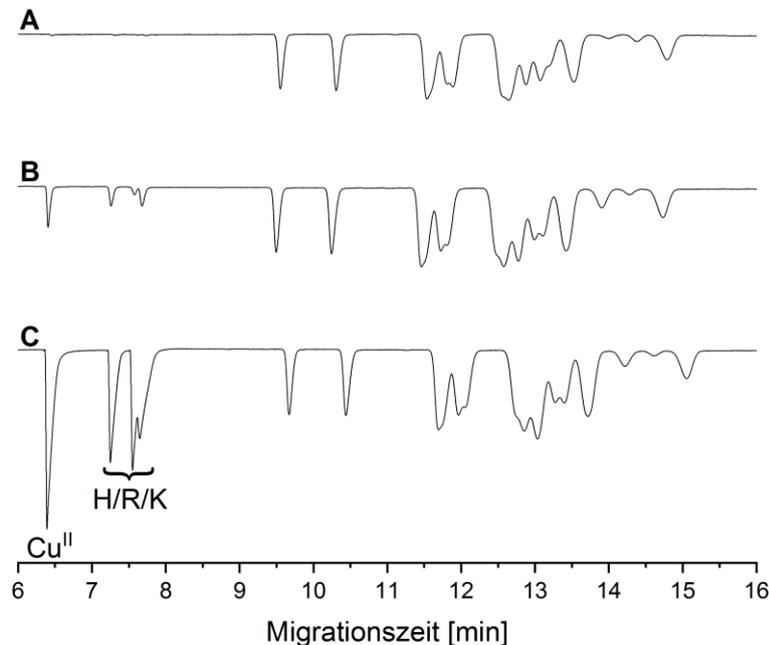
#### 4.1.2 Entfernung der Kupfer(II)-Ionen aus den Peptidmischungen

Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung liegt die Migrationszeit der basischen Aminosäuren und Dipeptide im Bereich der Kupfer(II)-Ionen. Zudem soll die Trennung durch Flüssigkeitschromatographie ergänzt werden. Die in den Reaktionsproben enthaltenden Kupfersalze sind jedoch nicht kompatibel mit massenspektrometrischer Kopplung sowie mit HPLC-Trennungen, da sie die stationäre Phase kontaminieren und verändern, und müssen daher vor der Analyse aus der Probe entfernt werden. Dabei darf keine Beeinflussung der Probenzusammensetzung stattfinden, also keine Wechselwirkung mit den Aminosäuren und Peptiden. Eine Möglichkeit zur Entsalzung von Proben bietet die Festphasenextraktion (SPE). Die Verwendung von C18-SPE-Kartuschen lieferte allerdings nicht die gewünschte Extraktion der Proben und wurde daher nicht weiter untersucht. Stattdessen wurde die Entfernung von Kupfer(II)-Ionen mit Ionenaustauschern getestet.

Veli *et al.* berichteten von der Entfernung von Kupferionen mit den starken Kationenaustauschern Dowex HCR S/S und Dowex Marathon C und untersuchten detailliert den Einfluss des pH-Werts, der Konzentration und Menge des Harzes und des Kupfersalzes sowie die Kontaktzeit.<sup>[318]</sup> Beide Harze erzielten eine Effizienz der Kupferentfernung aus wässriger Lösung von über 98% bei pH-Werten unter 6, wobei der Dowex Marathon C eine höhere Adsorptionskapazität aufwies und kürzere Kontaktzeiten benötigte.<sup>[318]</sup> Daher wurde dieser ausgewählt, um die Kupferentfernung aus den Aminosäuremischungen zu testen. Als Analysemischung wurde eine Mischung aus allen 20 proteinogenen Aminosäuren und Kupfer(II)chlorid in Wasser gewählt. Es wurde die Menge an Dowex Marathon C sowie der pH-Wert der Lösung variiert und über Nacht (16 h) gerührt. Eine Durchführung des Ionenaustauschs über einen Säulenaufbau erzielte nicht die gewünschte Kupferentfernung, wahrscheinlich aufgrund zu geringer Kontaktzeit. Anschließend wurde die Lösung mittels Kapillarelektrophorese auf der BFS-Kapillare mit Leitfähigkeitsdetektion untersucht, um die Konzentration der Kupferionen und der Aminosäuren zu beobachten.

Für basische Bedingungen wurde keine Entfernung des Kupfers beobachtet. Für neutrale oder saure Bedingungen wurden die Kupfer(II)-Ionen zwar aus der Lösung entfernt, zusätzlich wurde jedoch auch die Konzentration der basischen Aminosäuren (H, R, K) und bei größeren

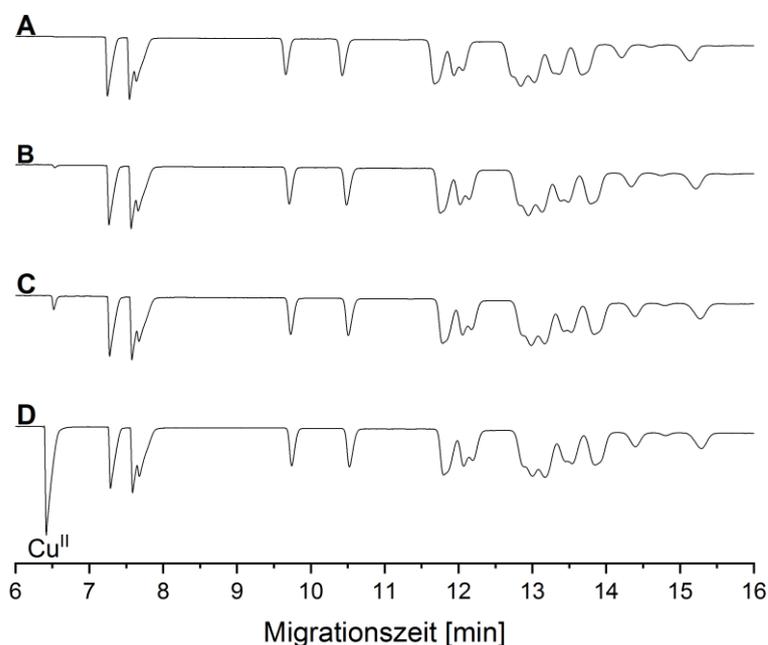
Mengen des Ionentauschers auch die Konzentration weiterer Aminosäuren in Lösung verringert (Abbildung 4-6). So konnten mit dem Dowex Marathon C zwar effektiv die Kupfer(II)-Ionen entfernt werden, allerdings wechselwirkte der Ionentauscher auch mit den Aminosäuren und veränderte dadurch die Probenzusammensetzung, so dass dies keine geeignete Methode für die Probenvorbereitung darstellt.



**Abbildung 4-6:** Elektropherogramm der Proben nach der Kupferentfernung mit dem Dowex Marathon C Ionentauscher aus der Gesamtmischung der Aminosäuren und Kupfer(II)chloridlösung. A: 40 mg, B: 20 mg, C: 0 mg Dowex Marathon C. Trennbedingungen: 80 cm BFS-Kapillare, 2 mol/L Essigsäure, 30 kV Spannung.

Aufgrund dessen wurde ein weiterer Kationentauscher getestet. Der Amberlite IRC-748 ist ein chelatbildendes Harz mit Iminodiessigsäuregruppen, wodurch eine Selektivität für Ionen wie Kupfer(II) erhalten wird.<sup>[319]</sup> Unter analogen Bedingungen wie für den Dowex Marathon C wurde die Menge an Ionentauscher und der pH-Wert variiert. Dabei wurde eine Abnahme des Kupfergehalts bei gleichbleibenden Aminosäurenkonzentrationen beobachtet, mit den besten Werten bei pH 4-5. Allerdings wurde zunächst auch bei größeren Mengen des Harzes keine vollständige Entfernung des Kupfers erreicht und da der Ionentauscher als Natriumform erhältlich ist, wurden anstelle der Kupfer(II)-Ionen Natriumionen frei. Daher wurde zunächst der Amberlite IRC-748 durch ausgiebiges Spülen mit 2 mol/L Salzsäure in die  $\text{H}^+$ -Form überführt und damit der Ionenaustausch durchgeführt, welcher weiterhin vergleichbar stattfand. Da es sich bei dem Ionenaustausch um Gleichgewichtsreaktionen handelt, wurde die Methode auf eine zweiseitige Durchführung geändert, um eine vollständige Entfernung des Kupfers zu erreichen. So wurde das Harz zur Lösung hinzugegeben, über Nacht gerührt, anschließend das Harz entfernt und durch frischen Ionentauscher ersetzt und erneut über Nacht gerührt. Nach

dieser Methode mit verschiedenen Mengen an Ionentauscher wurde im Elektropherogramm kein Signal mehr für Kupfer(II)-Ionen erhalten (Abbildung 4-7).



**Abbildung 4-7:** Elektropherogramm der Proben nach der Kupferentfernung mit dem Amberlite IRC-748 Ionentauscher aus der Gesamtmischung der Aminosäuren und Kupfer(II)chloridlösung. A: 2 x 20 mg, B: 40 mg, C: 20 mg, D: 0 mg Amberlite IRC-748. Trennbedingungen: 80 cm BFS-Kapillare, 2 mol/L Essigsäure, 30 kV Spannung.

Um eine vollständige Entfernung zu bestätigen, wurde eine Elementaranalyse (ICP-OES) durchgeführt. Dabei wurde für 2 x 20 mg Amberlite IRC-748 eine Konzentration von 0.28 µg/mL und für 2 x 30 mg eine Konzentration von 0.09 µg/mL gemessen. Letztere ist vergleichbar mit den Qualitätsstandards für Lösungsmittel für die HPLC und damit ist diese Methode geeignet für die Kupfer(II)-Entfernung aus den Reaktionsmischungen als Probenvorbereitung für die HPLC. Zuletzt wurde die Kontaktdauer untersucht, um die Probenvorbereitung schnellstmöglich durchführen zu können. Jedoch wirkte sich eine kürzere Kontaktzeit negativ auf die Kupferentfernung aus und wurde daher für die Probenvorbereitung nicht verkürzt.

Mit dem Amberlite IRC-748 und dem Austausch des Harzes nach 16 h wurde somit eine Methode erarbeitet, welche die Kupfer(II)-Ionen ausreichend aus den Proben entfernt, ohne dabei Aminosäuren zu binden und somit die Probenzusammensetzung zu beeinflussen.

### 4.1.3 Peptid-Trennungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Zur Analyse der Peptidmischungen und Entwicklung geeigneter Trennmethode mittels Flüssigchromatographie wurde ein hochauflösendes Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS)

verwendet. Verschiedene stationäre Phasen wurden auf ihre Eignung anhand der Trennung der 20 proteinogenen Aminosäuren untersucht.

Zunächst wurde eine unpolare C18-Phase verwendet und mit verschiedenen Laufmitteln getestet. Sowohl mit Gradienten aus Wasser und Acetonitril mit Ameisensäure als auch durch den Einsatz von Ammoniumsalzen konnte keine ausreichende Interaktion der Aminosäuren mit der stationären Phase erreicht werden. Daher erfuhren nur diejenigen Aminosäuren, welche hydrophobe Gruppen wie aromatische Reste oder Alkylketten beinhalten, eine signifikante Retention und wurden aufgetrennt, wohingegen ein Großteil der Aminosäuren mit der Laufmittelfront der Säule eluiert wurde (Abbildung 4-8).

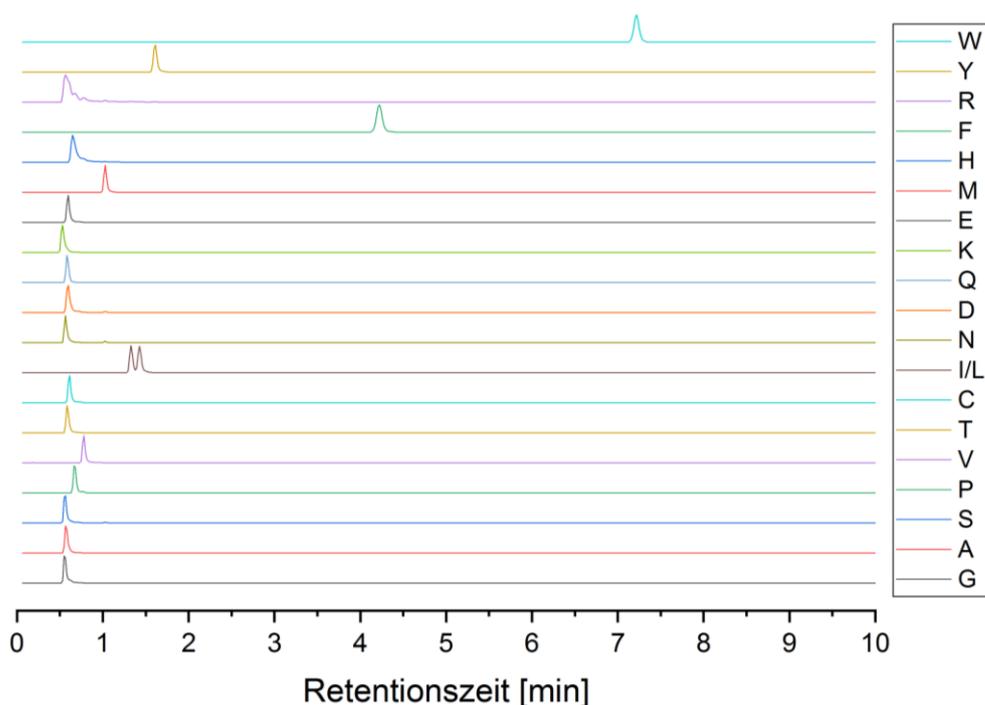


Abbildung 4-8: Normalisierte extrahierte Ionenchromatogramme der 20 proteinogenen Aminosäuren der HPLC-Trennung auf einer Thermo Acclaim RSLC 120 C18 Säule (2.1x100 mm, 2.2  $\mu\text{m}$ ), Fluss 0.5 mL/min, T = 30°C; A: 20 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}_{(\text{aq})}$ , B:  $\text{ACN}/20 \text{ mmol/L } \text{NH}_4\text{OAc}_{(\text{aq})} 90/10$ , Gradient: 0-20 min 0-20% B.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Folgenden (zwitter-) ionische stationäre Phasen und die hydrophile Interaktionschromatographie für die Trennung der Aminosäuren und Peptide in Betracht gezogen. Dabei wurden stark unterschiedliche Intensitäten des Detektorsignals je nach Aminosäure beobachtet. Bei einer 100  $\mu\text{mol/L}$  Mischung hoben sich die Signale einiger Aminosäuren kaum vom Hintergrundrauschen ab (z.B. G, C, D), wohingegen andere Aminosäuren auch bei drei Größenordnungen geringeren Konzentrationen noch detektierbar waren (z.B. I, L, F, W). Durch die Verwendung von Ammoniumsalzen im Eluenten ist dabei eine Ionensuppression möglich, welche diese Unterschiede begünstigt. Dadurch war außerdem

eine höhere Konzentration der Referenzsubstanzen zur internen Massenkalkulation bei den HILIC-Methoden im Vergleich zur Umkehrphasen-Methode notwendig.

Die zwitterionische Säule Chiralpak ZWIX ist laut Hersteller für die chirale Trennung von Aminosäuren und Peptiden entwickelt worden. Die Wechselwirkungen mit dem Chinin- und 2-Aminocyclohexansulfonsäure-basierten Selektor hatten unter den getesteten Bedingungen zwar für alle 20 proteinogenen Aminosäuren eine Retention zur Folge, jedoch eluierten 14 der 20 Aminosäuren innerhalb von zwei Minuten, so dass die Trennung auch mit dieser Phase nicht ausreichend war (siehe Anhang). Zudem fehlten die Signale für einzelne Aminosäuren innerhalb der Analyse vollständig (H, C) oder wiesen ein verbreitertes Profil auf. Mit der achiralen Nucleodur Hilic-Säule, welche auf einem Ammonium-Sulfonsäure-Liganden basiert, konnte nach der Variation der mobilen Phase und des Gradienten eine bessere Trennung der 20 proteinogenen Aminosäuren innerhalb von 12 min erreicht werden (siehe Anhang). Allerdings koeluierten einzelne Aminosäuren und die Peakprofile insbesondere von Histidin und Asparaginsäure waren unter den gewählten Bedingungen deutlich verbreitert.

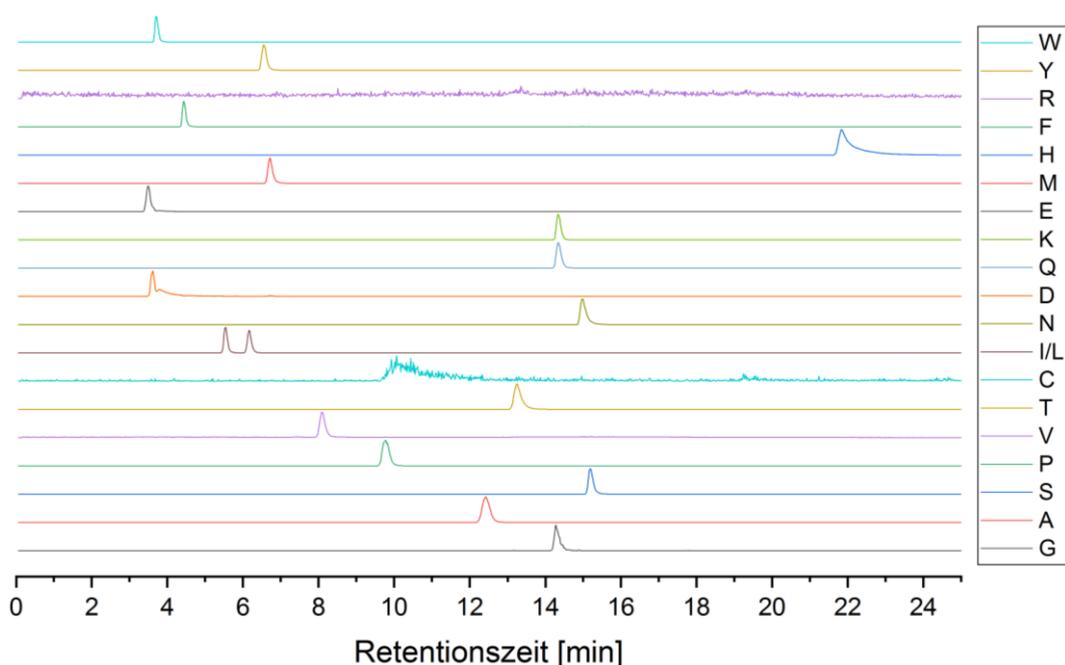
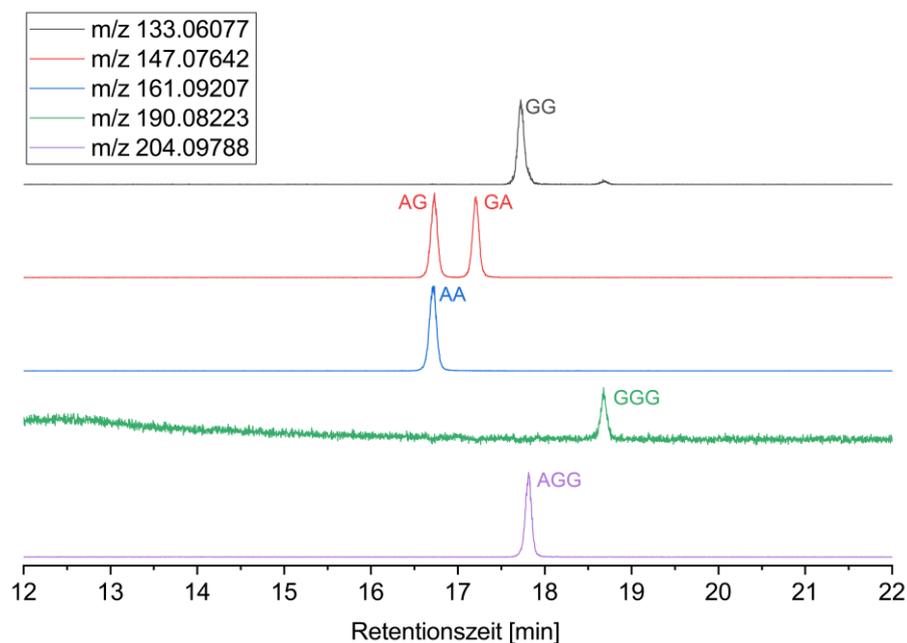


Abbildung 4-9: Normalisierte extrahierte Ionenchromatogramme der 20 proteinogenen Aminosäuren der HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 1 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.

Zusätzlich wurde die DCpak PTZ Säule zur Trennung verwendet, welche auf Poly-N-(1H-tetrazol-5-yl)-methacrylamid basiert. Bei einer Untersuchung dieser Phase von Lu *et al.* wurde beobachtet, dass die NH-Gruppe des Tetrazols bei pH ≥ 5 dissoziiert. Dadurch können polare Analyte mit der hydrophileren Phase besser wechselwirken, so dass unter diesen Bedingungen die Trennleistung höher ist.<sup>[320]</sup> Dies wurde auch für die Aminosäuren beobachtet, weshalb als

mobile Phase ein Gradient aus Ammoniumacetat (pH 6.9) und Acetonitril gewählt wurde. Die Trennung der 20 proteinogenen Aminosäuren konnte so größtenteils mit einer Retentionszeit im Bereich von 3.5 – 22 min erreicht werden, wobei auch die Isomere Isoleucin und Leucin Basislinien-getrennt wurden (Abbildung 4-9). Jedoch konnte Arginin nicht detektiert werden und Cystein wies wiederum ein sehr schwaches, breites Signal auf. Dies kann zum einen an einer hohen Wechselwirkung der Analyten mit den zwitterionischen Phasen und deren nahezu kompletter Retention zusammenhängen oder auch durch die Verwendung des Ammoniumacetat-Puffers, welcher bei der Detektion andere Ionen unterdrückt.

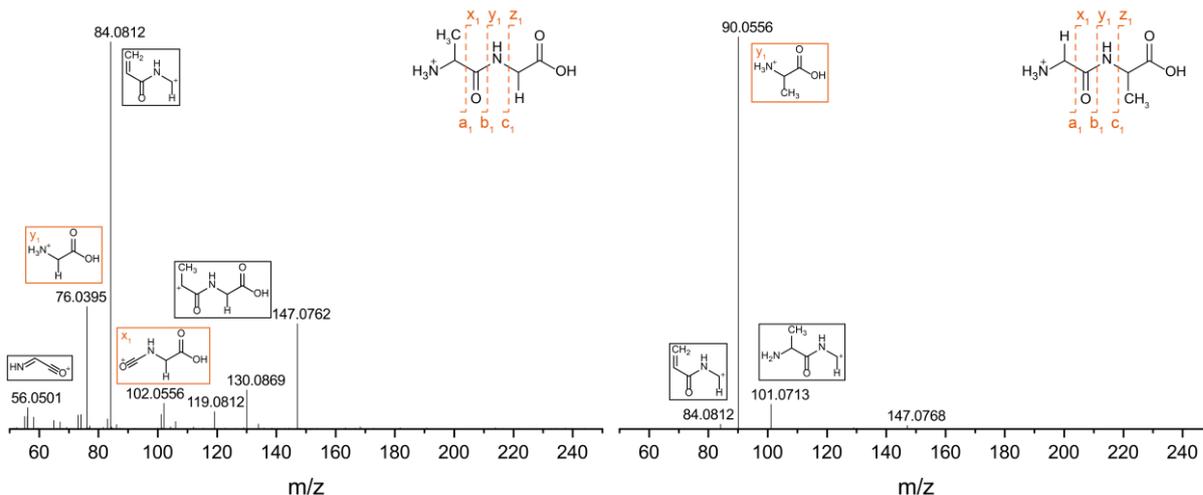
Zur Untersuchung der Di- und Tripeptide wurde zusätzlich eine 100  $\mu\text{mol/L}$  Mischung von Glycyl-Glycin (GG), Glycyl-Alanin (GA), Alanyl-Glycin (AG), Alanyl-Alanin (AA), Glycyl-Glycyl-Glycin (GGG) und Alanyl-Glycyl-Glycin (AGG) getestet. Dabei konnten insbesondere die Isomere GA und AG Basislinien-getrennt werden (Abbildung 4-10), so dass hierbei auch anhand der Retentionszeit eine Unterscheidung möglich ist. Wiederum auffällig war die unterschiedliche Intensität der Signale bei gleicher Konzentration, so dass insbesondere GGG ein hohes Hintergrundrauschen und eine geringe Intensität aufwies. Die sehr unterschiedlichen Nachweisgrenzen sind dementsprechend bei der Probenanalyse zu beachten.



**Abbildung 4-10:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Alanin und Glycin enthaltenden Peptidreferenzen der HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}_{(\text{aq})}$ , B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.

Zur Identifikation der Peptide ohne vorhandene Referenzsubstanzen wurden ebenfalls  $\text{MS}^2$ -Spektren mithilfe von Inklusionslisten aufgenommen, um durch die Fragmentierung auf die Sequenz der Peptide Rückschlüsse zu ermöglichen. Zur kollisionsinduzierten Dissoziation

wurden verschiedene Energiewerte getestet. Bei 15 eV erfolgte bereits eine deutliche Fragmentierung, welche eine Zuordnung der Fragmente und Bestimmung der Sequenz zuließ. Höhere Energiewerte lieferten sehr stark fragmentierte Massenspektren, so dass im Folgenden mit 15 eV gemessen wurde. In Abbildung 4-11 sind die MS<sup>2</sup>-Spektren der Referenzpeptide AG und GA gezeigt, welche sich nicht nur anhand der abweichenden Retentionszeiten, sondern auch durch die Fragmentierung insbesondere mithilfe der y-Fragmentionen unterscheiden lassen.



**Abbildung 4-11:** Zuordnung der Fragmentionen im MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Glycin und Glycyl-Alanin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (15 eV) der Signale bei  $t_{\text{ret}} = 16.7$  min / 17.1 min nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc(aq), B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.

Für die HPLC-MS-Analyse zeigte insgesamt die Trennung auf der PTZ-HILIC-Säule die besten Ergebnisse. Durch die Interaktion mit der zwitterionischen Phase konnten einerseits sehr gute Trennungen der Aminosäuren und auch isomerer Peptide wie AG/GA erhalten werden, andererseits eignet sich die Methode nicht für alle Aminosäuren, da teilweise entweder eine zu starke Wechselwirkung oder eine schlechte Detektion bzw. Ionensuppression die Analyse stört. Daher kann die HPLC-MS-Methode nicht universell, allerdings unterstützend zur CE-MS-Methode hinzugezogen werden, insbesondere bei den Reaktionsproben, welche nur aus Alanin und Glycin und nicht aus den vollständigen Mischungen der Aminosäuren erhalten werden.

## 4.2 Reaktionen in Schwefeldioxid

Bei der salzinduzierten Peptidbildung (SIPF) werden neben Metallsalzen, insbesondere Kupfer(II)-Salzen, auch hohe Mengen an Natriumchlorid zur Wasserentfernung verwendet. Diese Reaktion wurde in flüssigem Schwefeldioxid als Lösungsmittel untersucht in Hinblick darauf, ob die hochkonzentrierte Salzlösung durch das hygroskopische Schwefeldioxid ersetzt werden kann und ob dies ein präbiotisch plausibles Szenario zur Peptidbildung darstellt. Die Reaktion wurde auf komplexe Mischungen an Aminosäuren angewandt, um Wechselwirkungen und Selektivitäten unter realistischen Bedingungen zu untersuchen. Aufgrund der Ergebnisse von Rode *et al.* wurde Kupfer(II) für die Untersuchung der Peptidbildung in Schwefeldioxid gewählt und als Startbedingungen ein Verhältnis von Cu(II) zu den Aminosäuren von 1:2 mit einer Konzentration von 400 mM als angemessen betrachtet.<sup>[190]</sup>

### 4.2.1 SIPF-analoge Reaktion in Schwefeldioxid

Zunächst wurde die Peptidbildung ausgehend von den einfachsten Aminosäuren Glycin und Alanin in Schwefeldioxid getestet. Dadurch konnten die Reaktionsbedingungen auch in Hinblick auf Heterodimere untersucht werden, ohne bereits die Komplexität der Mischungen aus mehreren Aminosäuren zu erhalten. Es wurden gleiche Mengen L-Alanin, Glycin und Kupfer(II)chlorid in einem Reagenzglas vorgelegt, dieses in eine spezialangefertigte Druckapparatur eingebaut, woraufhin flüssiger Schwefeldioxid einkondensiert wurde. Die Reaktionsmischung wurde für 1, 3, 7, 14 oder 21 Tage bei Raumtemperatur gerührt (Abbildung 4-12), das Lösungsmittel entfernt und die Produktmischung zur Analyse in Wasser mit einer Konzentration der Aminosäuren von 1 mmol/L gelöst. Die Analyse erfolgte qualitativ nach kapillarelektrophoretischer Trennung mit einer LPA-beschichteten Kapillare. Zusätzlich wurde zur Unterscheidung der Dipeptide AG und GA nach Entfernung der Kupferionen eine HPLC-Trennung auf der PTZ Hilic-Säule durchgeführt.

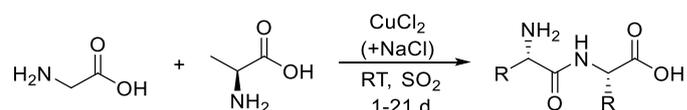


Abbildung 4-12: Untersuchung der kupferkatalysierten Peptidbildung in Schwefeldioxid ausgehend von Glycin und Alanin.

Bereits nach einem Tag konnten Spuren des Dipeptids GG beobachtet werden, nach einer Woche waren diese erhöht, so dass sie nicht nur mit der sensitiveren massenspektrometrischen Detektion beobachtet wurden, sondern bereits im Leitfähigkeitsdetektor sichtbar waren. Zudem konnten weitere Dipeptide (AG/GA) und sogar geringe Mengen des Tripeptids GGG detektiert

werden. Diketopiperazine, zyklische Dipeptide, welche bei einigen Peptidbildungsreaktionen als unerwünschte Nebenprodukte auftreten und auch in der wässrigen SIPF-Reaktion detektiert wurden,<sup>[190]</sup> wurden in Schwefeldioxid nicht beobachtet. Auch eine Reaktion mit dem Lösungsmittel zu anderen Nebenprodukten wurde nicht festgestellt. Eine längere Reaktionszeit (14 bzw. 21 d) sorgte für eine weitere geringfügige Zunahme der Intensität und Anzahl der Peptide. Die Zugabe von zehn Äquivalenten Natriumchlorid als wasserentziehendes Mittel war nicht notwendig, sondern wirkte sich stattdessen hemmend aus, so dass nur Spuren an Dipeptiden entstanden. Da diese großen Mengen Natriumchlorid in Schwefeldioxid nicht löslich sind und große Feststoffmengen vorlagen, war die Durchmischung der Reaktion gestört. Auch geringere Mengen an Natriumchlorid (1 Äq.) wirkten sich nicht positiv auf die Reaktion aus, die hygroskopischen Eigenschaften des Schwefeldioxids reichten zur Peptidkondensation aus.

Des Weiteren wurde Harnstoff als Zusatz getestet, dessen präbiotische Synthese bereits beschrieben wurde.<sup>[321-322]</sup> Ein positiver Effekt der Harnstoffzugabe auf die Phosphorylierung von Nucleosiden wurde für verschiedene Phosphorquellen beobachtet.<sup>[90, 323-324]</sup> Der Mechanismus und die Wirkungsweise sind nicht aufgeklärt, eine Hydrolyse der Harnstoffs wurde jedoch diskutiert.<sup>[323]</sup> Da es sich dabei auch um eine Kondensationsreaktion handelt, ist ebenfalls eine Verbesserung der Kondensation der Aminosäuren zu Peptiden denkbar. Die Reaktion von Alanin und Glycin mit Kupfer(II)chlorid unter Zugabe von Harnstoff lieferte bereits nach kürzerer Reaktionszeit und auch deutlich intensivere Signale an Dipeptiden (GG, AG, GA) und außerdem die Di- und Tripeptide AA, AAA, AAG & AGG, welche ohne Harnstoff nicht beobachtet wurden. Die Begünstigung der Kondensation durch Harnstoff konnte also auch für Peptidkupplungen beobachtet werden.

Ohne die Zugabe von Kupfer(II)chlorid wurde keine Reaktion beobachtet. Die hygroskopischen Eigenschaften von Schwefeldioxid reichen dementsprechend allein nicht zur Peptidbildung aus, stattdessen wird ein Metallsalz benötigt. In der wässrigen Reaktion ist Kupfer(II) im Vergleich zu anderen Metallionen deutlich aktiver. Für Eisen(II), welches auch präbiotisch relevant ist, wurde in der Natriumchloridlösung keine bzw. nur Spuren von Glycyl-Glycin-Bildung beobachtet.<sup>[187, 190]</sup> In Schwefeldioxid wurde mit Eisen(II)chlorid ebenfalls nur das Dipeptid GG gebildet. Eine Zugabe von Harnstoff wirkte sich hierbei im Gegensatz zur Reaktion mit Kupfer(II)chlorid nicht positiv auf die Peptidbildung aus. Mit anderen Metallionen kann daher also auch eine Peptidbildung erreicht werden, aufgrund der Aktivität wurde jedoch im Folgenden weiterhin mit Kupfer(II) gearbeitet.

Neben dem Metallkation ist auch das Anion relevant. Im von Rode *et al.* postulierten Mechanismus der wässrigen Reaktion koordiniert das Chlorid an das Kupfer und verhindert somit die Chelatbindung der zweiten Aminosäure, so dass es notwendig für die Peptidbildung ist (Abbildung 2-6).<sup>[188]</sup> Daher wurde anstelle von Kupferchlorid auch Kupfersulfat getestet. Die Reaktion von Alanin und Glycin mit Kupfersulfat ergab nach einer Woche keine Peptide. Wurde jedoch zusätzlich Harnstoff zugesetzt, konnte immerhin das Dipeptid GG beobachtet werden. So ist die Verwendung eines Chloridsalzes zwar nicht unbedingt notwendig, jedoch ist die Aktivität bei Verwendung von Kupferchlorid höher im Vergleich zu Kupfersulfat. Neben der von Rode *et al.* beschriebenen Rolle als Ligand im Katalysezyklus ist in Schwefeldioxid auch ein Löslichkeitseffekt als Grund dafür denkbar.

Da bei der wässrigen SIPF-Reaktion erhöhte Temperaturen (70-85°C) benötigt werden, um eine Produktbildung zu erzielen, wurde die Reaktionstemperatur variiert. Dazu wurde die Druckapparatur im Wasserbad bei 22°C, 50°C oder 85°C erhitzt. Die detektierten Produkte für 22°C und 50°C unterschieden sich nicht. Bei der erhöhten Temperatur von 85°C wurden die Druckapparaturen undicht und die Reaktion konnte daher nicht untersucht werden. Da bei der erhöhten Temperatur von 50°C kein positiver Effekt beobachtet wurde und die Reaktion in Schwefeldioxid bereits bei geringeren Temperaturen stattfindet, wurde für weitere Versuche bei Raumtemperatur gearbeitet.

Ein möglicher Kritikpunkt für präbiotische Plausibilität chemischer Reaktionen ist häufig die notwendige hohe Konzentration der Reaktanden. Die Standardbedingungen der SIPF-Reaktion liegen bei 400 mmol/L der Aminosäuren. Um den Einfluss der Konzentrationen zu untersuchen, wurden die Verhältnisse zwischen Aminosäuren und Kupfer(II)chlorid konstant gehalten. Es wurde neben den 400 mmol/L, auch 200 mmol/L, 100 mmol/L, und 50 mmol/L getestet und bei allen Konzentrationen wurden Peptide gebildet. Dabei war bei geringen Konzentrationen sogar ein Anstieg der Peptidbildung zu beobachten, so dass bei 50 mmol/L Reaktionslösung auch vermehrt Tripeptide und nach 21 d auch Tetrapeptide detektiert wurden. Damit ist der Kritikpunkt der hohen Konzentrationen der Reaktanden für die Reaktion in Schwefeldioxid nichtzutreffend, stattdessen ist bei geringeren Konzentrationen eine höhere Reaktivität zu beobachten. Bei den vorherigen Versuchen wurde Kupferchlorid nicht katalytisch, sondern stöchiometrisch im Verhältnis A:G:Cu(II) 1:1:1 eingesetzt, da in der wässrigen SIPF-Reaktion nur mit Glycin ein Verhältnis von G:Cu(II) von 2:1 als beste Bedingungen erhalten wurden.<sup>[190]</sup> Da im Folgenden bei der Verwendung von Aminosäuremischungen die Aminosäuren auch in Konkurrenz miteinander reagieren sollen,

um so mögliche Selektivitäten zu beobachten, wurde die Reaktion des Weiteren mit einer geringeren Kupferchloridmenge durchgeführt. Dabei wurden auch bei einer katalytischen Menge von 1 mol% nach 7 d Reaktionszeit Spuren von den Dipeptiden GG, AG und GA detektiert.

In der wässrigen SIPF-Reaktion zeigen einzelne Aminosäuren keine oder nur sehr geringe Reaktivität und können erst durch das Hinzufügen katalytischer Aminosäuren zu Peptiden umgesetzt werden.<sup>[191, 325]</sup> So beobachteten Rode *et al.* auch für Alanin alleine kaum Peptidbildung und nur durch Hinzufügen von Glycin konnte ein signifikanter Umsatz erreicht werden.<sup>[326]</sup> In Schwefeldioxid wurde dies bei Verwendung von Alanin nicht bestätigt. So bildete Alanin auch ohne Zugabe von Glycin ein Di- und Tripeptid. Zudem wurden bei Reaktionen mit Alanin und Glycin bei den Tri- und Tetrapeptiden vermehrt Peptide mit höherem Alaninanteil beobachtet.

**Tabelle 4-1: Vergleich verschiedener Einflüsse auf die kupferkatalysierte Peptidbildung in Wasser und Schwefeldioxid.**

<b>Einfluss</b>	<b>Wasser</b>	<b>Schwefeldioxid</b>
Metallion	notwendig <sup>[187]</sup>	notwendig
➤ Kupfer(II)	aktivster Katalysator <sup>[190]</sup>	aktiv
➤ Eisen(II)	nicht/kaum aktiv <sup>[187, 190]</sup>	wenig aktiv
Chlorid	notwendig <sup>[188]</sup>	positiv
Salzzugabe (NaCl)	positiv (notwendig) <sup>[187]</sup>	negativ
Harnstoff	-	positiv (bei Kupfer(II))
Temperatur	> 60°C notwendig, > 80°C Hydrolyse, Optimum 70 - 80°C <sup>[190]</sup>	kein deutlicher Einfluss
Konzentration G	höhere Konzentration positiv <sup>[190]</sup>	geringe Konzentration positiv
Reaktionsdauer	ab 1 d; häufig 14 - 28 d <sup>[191]</sup>	ab 1 d; signifikant ab 7 d
Glycin (bei A)	positiv <sup>[326]</sup>	kein deutlicher Einfluss
Evaporationszyklen	positiv <sup>[190]</sup>	-

Eine Peptidbildung in Schwefeldioxid kann also erfolgreich durchgeführt werden, wobei ein Metallsalz für die Reaktion notwendig ist und mit Kupfer(II)chlorid die meisten Peptide gebildet wurden. Als längste Peptidketten wurden Tetrapeptide beobachtet. Im Vergleich zur wässrigen Reaktion zeigten sich deutliche Unterschiede. So wirkte die notwendige Salzzugabe (NaCl) für die Reaktion in Schwefeldioxid inhibierend, es wurden keine hohen Temperaturen und Konzentrationen benötigt, stattdessen konnte die Reaktion auch unter milden Bedingungen durchgeführt werden. Zudem konnte die Kondensation durch die Zugabe von Harnstoff gefördert werden und auch das in Wasser unreaktive Alanin bildete in Schwefeldioxid Peptide.

#### 4.2.2 Kupfer(II)-katalysierte Peptidbildung in komplexen Mischungen

Da im präbiotischen Kontext nicht einzelne, sondern eine Vielzahl an Aminosäuren vorhanden waren, ist die Untersuchung von Mischungen mehrerer Aminosäuren von Interesse. Bei der Verwendung der 20 proteinogenen Aminosäuren ist nicht nur relevant, ob mit der kupferkatalysierten Variante alle Aminosäuren in Peptide eingebaut werden, sondern auch ob es bei geringeren Mengen an Kupfer und der daraus folgenden Konkurrenz der Aminosäuren, Selektivitäten hinsichtlich des Einbaus einzelner Aminosäuren oder der Sequenzen in der Peptidbildung gibt. Dazu wurden neben der Gesamtmischung der Aminosäuren, auch verschiedene Mischungen entsprechend der Klassifizierung in Gruppen nach der Polarität der Seitenketten (siehe Abbildung 2-11) verwendet. Glycin, als Aminosäure ohne Seitenkette, wurde der polaren Mischung zugegeben. Eine mögliche katalytische Wirkung einzelner basischer und saurer Aminosäuren wurde durch die Zugabe von Histidin oder Asparaginsäure zu der unpolaren sowie polaren Mischung untersucht. Zusätzlich wurde eine präbiotische Mischung untersucht, welche mit Glycin, Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin, Serin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Threonin diejenigen Aminosäuren enthielt, welche nach heutigem Kenntnisstand durch ihr Auftreten in abiotischen Quellen oder präbiotischen Experimenten als am präbiotisch relevantesten oder als zuerst vorhanden angesehen werden.<sup>[167]</sup> Aufgrund der Ergebnisse mit Alanin und Glycin wurden die Reaktionen mit den Aminosäuremischungen bei Raumtemperatur für 7 bzw. 21 d durchgeführt ohne die Zugabe von Natriumchlorid und mit einem Äquivalent Harnstoff (Abbildung 4-13). Um eine Konkurrenz der Aminosäuren zu erhalten, wurden bei  $n$  Aminosäuren pro Mischung  $1/n$  Äquivalente Kupferchlorid zugegeben.

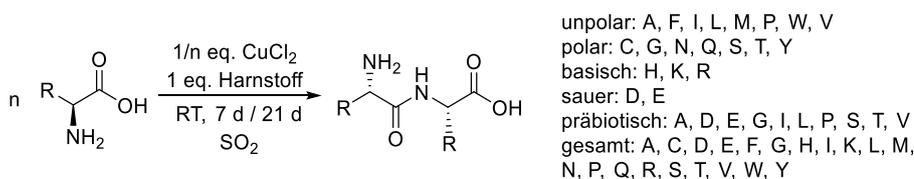
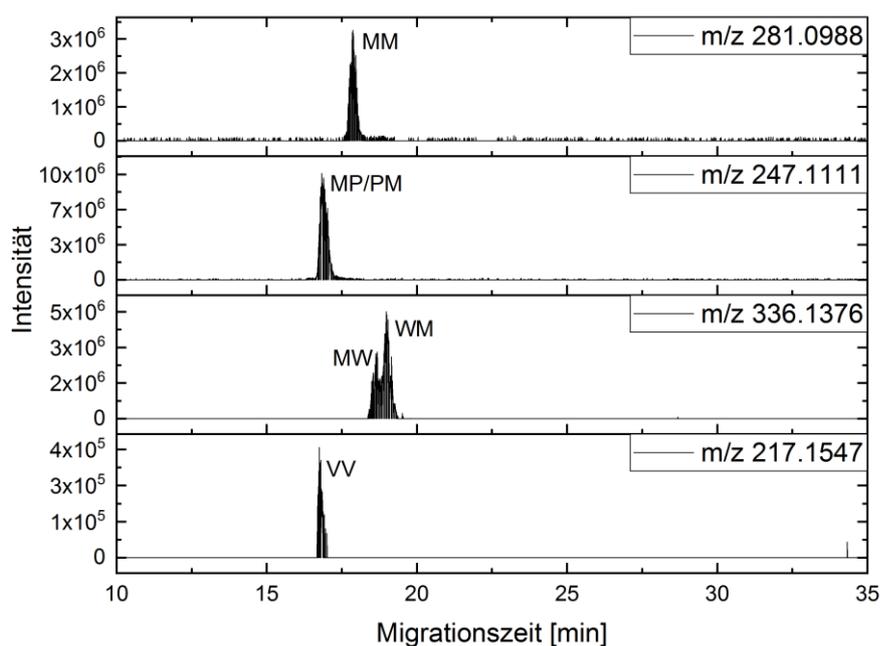


Abbildung 4-13: Kupferkatalysierte Peptidbildung aus Aminosäuremischungen in Schwefeldioxid.

Die Proben wurden in Wasser gelöst und kapillarelektrophoretisch mit Kopplung zur Orbitrap-MS untersucht. Da die basischen Peptide eine vergleichbare Migrationszeit wie die Kupferionen aufwiesen, wurde bei denjenigen Proben, welche basische Aminosäuren enthielten, vor der Analyse mit dem Amberlite IRC-748 Ionentauscher die Kupferionen entfernt. Reaktionsproben ohne basische Aminosäuren wurden direkt analysiert und die Kopplung zum Massenspektrometer erst nach 9 min, nachdem die Kupferionen bereits migriert waren, hinzugeschaltet. Es wurde mit Inklusionslisten der möglichen Dipeptide gearbeitet, um so auch datenabhängige MS<sup>2</sup>-Spektren zu erhalten. Neben dem hochauflösenden Masse-zu-

Ladung-Verhältnis des Molekülpeaks sowie der Migrationszeit konnte damit anschließend aufgrund der Fragmentierung eine eindeutige Bestätigung der Produktpeptide erfolgen.

Zur Veranschaulichung der Auswertung sind extrahierte Ionenelektropherogramme ausgewählter Dipeptide in Abbildung 4-14 dargestellt. Die Intensität der Signale lag typischerweise in der Größenordnung von  $10^6$  counts. Abgebildet sind Methionyl-Methionin, die überlagernden Isomere Methionyl-Prolin und Prolyl-Methionin, die angetrennten Isomere Methionyl-Tryptophan und Tryptophyl-Methionin, sowie Valyl-Valin.



**Abbildung 4-14:** Ausgewählte extrahierte Ionenelektropherogramme nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C) und gekoppelter Massenspektrometrie (Orbitrap-MS, full scan  $m/z$  129-750 und datenabhängige MS<sup>2</sup> mit NCE = 30%) der kupferkatalysierten Peptidbildung aus der unpolaren Aminosäuremischung in Schwefeldioxid nach 21 d.

Eine Zuordnung der Sequenzen erfolgte anhand der Fragmentierungen. Es wurden für die Peptide neben dem Verlust von Ammoniak, Wasser und Decarboxylierung insbesondere die Spaltung entlang des Peptidrückgrats beobachtet und somit die a-, b-, c-, x-, y- und z-Fragmentationen detektiert (siehe Abbildung 2-16 und Tabelle 8-1). Eine weitere Fragmentierung zu d-, v- und w-Fragmentationen wurde in der Regel nicht beobachtet, so dass nicht zwischen Isoleucin und Leucin unterschieden werden konnte. Die zugehörigen MS<sup>2</sup>-Spektren zu den extrahierten Ionenelektropherogrammen aus Abbildung 4-14 befinden sich in Abbildung 4-15. Wie im MS<sup>2</sup>-Spektrum des Vorläuferions  $m/z$  281.0985 zu sehen, handelt es sich dabei eindeutig um das Dipeptid MM. So lassen sich die zu erwartenden Fragmente beobachten. Neben einem Verlust an NH<sub>3</sub> ( $m/z$  264.0742) und Decarboxylierung ( $m/z$  235.0916) sind insbesondere das a- ( $m/z$  104.0528) und y-Fragmentation ( $m/z$  150.0556) deutlich zu sehen. Auch

das b- ( $m/z$  132.0478) sowie das z-Fragmentation ( $m/z$  133.0318) sowie die Fragmentierung der Seitenkette ( $m/z$  61.0115) wurden beobachtet. Im MS<sup>2</sup>-Spektrum des Vorläuferions  $m/z$  247.1109 überlagern die Fragmente der beiden Isomere. Es dominiert zwar das a-Fragmentation von PM ( $m/z$  70.0660) mit dem zugehörigen y-Fragmentation ( $m/z$  150.0592), jedoch sind in geringerer Intensität auch das a- ( $m/z$  104.0528) und das y-Fragmentation ( $m/z$  116.0713) des Isomers MP zu sehen. Eine Zuordnung der beiden Signale mit  $m/z$  336.1376 zu den beiden Isomeren MW und WM kann eindeutig durch die Fragmentierung erfolgen. So zeigt das zugehörige MS<sup>2</sup>-Spektrum bei einer Migrationszeit von 18.6 min das a- ( $m/z$  104.0528), y- ( $m/z$  205.0969) und z-Fragmentation ( $m/z$  188.0719) des Dipeptids MW. Diese sind durch die leichte Überlappung der Signale in geringer Intensität zwar auch im MS<sup>2</sup>-Spektrum bei einer Migrationszeit von 19.0 min zu sehen, insgesamt wird dieses jedoch dominiert durch das a- ( $m/z$  159.0914) sowie auch das z-Fragmentation ( $m/z$  133.0319) von WM.

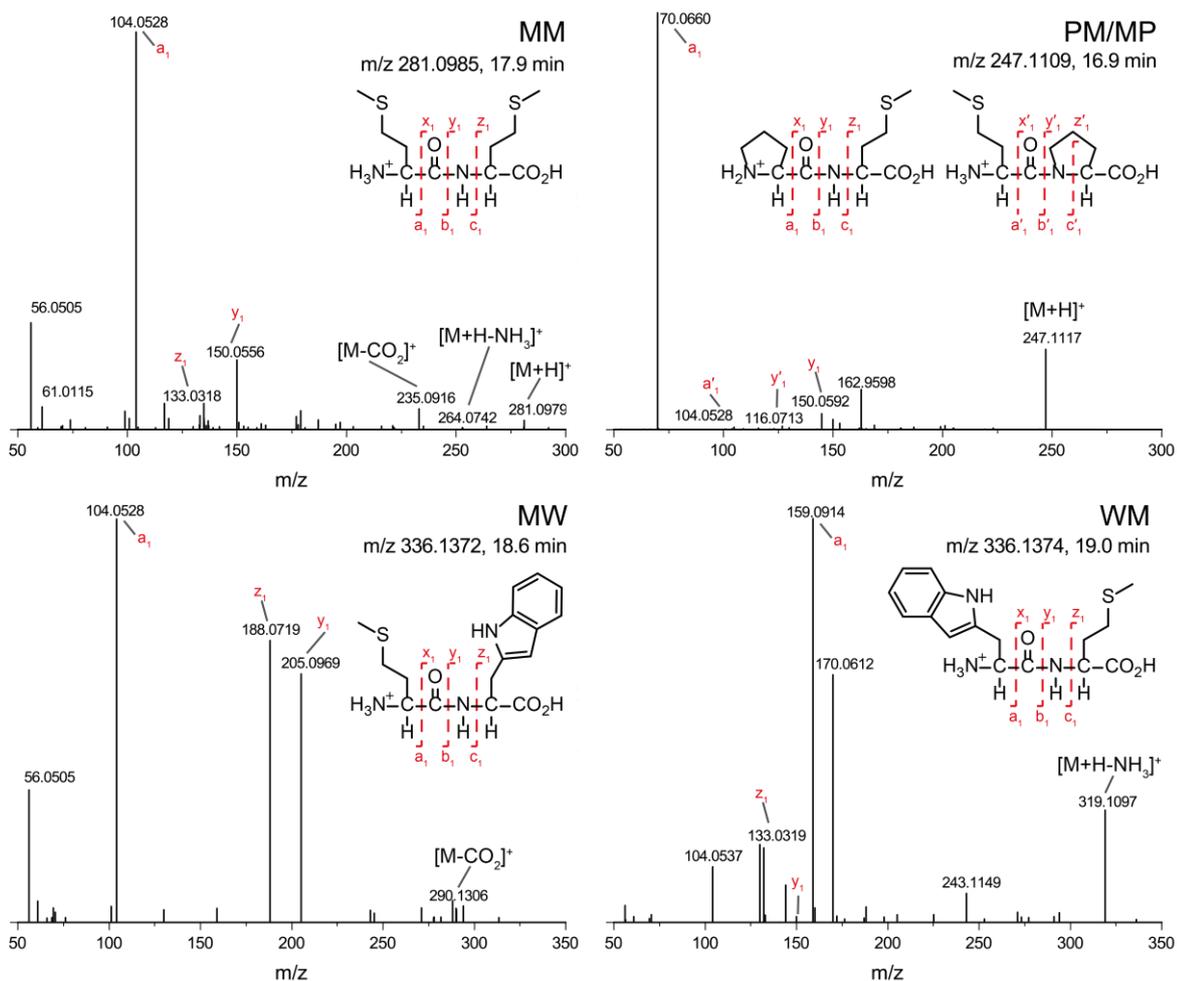


Abbildung 4-15: Zugehörige MS<sup>2</sup>-Spektren zu den ausgewählten Peptiden MM, MP/PM, MW und WM nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C) und gekoppelter Massenspektrometrie (Orbitrap-MS, full scan  $m/z$  129-750 und datenabhängige MS<sup>2</sup> mit NCE = 30%) der kupferkatalysierten Peptidbildung aus der unpolaren Aminosäurenmischung in Schwefeldioxid nach 21 d.

Aufgrund der geringeren Intensität des Molekülions von VV ( $m/z$  217.1547) konnte kein MS<sup>2</sup>-Spektrum aufgenommen werden. Jedoch konnte ein Signal mit übereinstimmenden hochaufgelöstem  $m/z$ -Wert des Molekülions von VV erhalten werden, dessen Intensität ( $> 10^5$ ) und Migrationszeit auf das Dipeptid schließen lassen. Da dieses nicht zusätzlich durch die Fragmentationen bestätigt werden konnte, wurden derartige Signale nur unter Vorbehalt bzw. als Spuren der jeweiligen Dipeptide gewertet.

Eine Quantifizierung konnte aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten des Detektors je nach Molekül (Ionisationswahrscheinlichkeit/Ionensuppression) und der daraus resultierenden Notwendigkeit von Eichgeraden für jedes Peptid bei der extrem hohen Anzahl an möglichen Produkten nicht durchgeführt werden. Eine Unterscheidung der beobachteten Peptide wurde daher nur in drei Kategorien durchgeführt anhand folgender Kriterien: 1. nicht detektiert, 2. Spuren (HR-MS Signalintensität ( $> 10^5$ ), Signalform) und 3. vorhanden (HR-MS Signalintensität ( $> 10^6$ ), Signalform, MS<sup>2</sup> Fragmentierung).

		C-Terminus														
		7 d							21 d							
		A	F	I/L	M	P	V	W	A	F	I/L	M	P	V	W	
N-Terminus	A	■														
	F	■														
	I/L	■														
	M	■														
	P	■														
	V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	W	■														

Abbildung 4-16: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in flüssigem Schwefeldioxid ausgehend von der unpolaren Aminosäurenmischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

Die kupferkatalysierte Peptidkondensation ausgehend von den Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten lieferte bereits innerhalb von 7 d fast alle möglichen Kombinationen an Dipeptiden (Abbildung 4-16). Nur Valin reagierte etwas schlechter als die anderen Aminosäuren, so dass das Homopeptid VV sowie die Reaktion mit Phenylalanin zu FV erst nach 21 d und die Bildung von VF nicht beobachtet wurde. Eine geringere Reaktivität von Valin als Elektrophil wurde auch in der wässrigen SIPF-Reaktion beobachtet und mit der sterischen Hinderung der Seitenkette begründet.<sup>[191]</sup> Zusätzlich zu den Dipeptiden konnten Spuren von Tripeptiden detektiert werden, welche aufgrund der geringen Konzentration jedoch nicht mit MS<sup>2</sup>-Messungen bestätigt und somit auch nicht auf ihre Sequenz untersucht werden konnten.

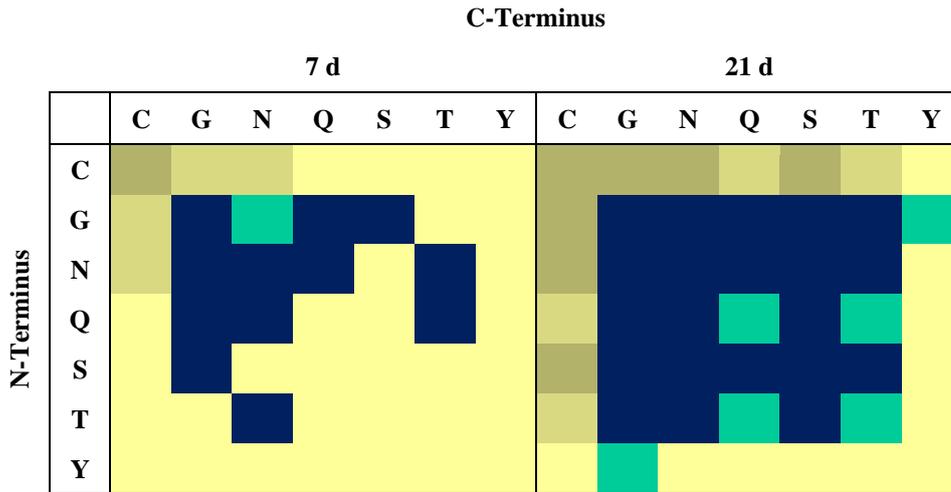


Abbildung 4-17: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der polaren Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, □ = nicht detektiert, ■ = Cystin vorhanden, ■ = Cystin Spuren).

Im Vergleich dazu wurden bei der Peptidkondensation der Aminosäuren mit polaren, neutralen Seitenketten deutlich weniger Dipeptide detektiert (Abbildung 4-17). Dabei wurde auch ein deutlicher Zuwachs an Peptiden mit längerer Reaktionszeit beobachtet. Insbesondere Cystein- sowie Tyrosin-haltige Dipeptide wurden kaum detektiert. Für Cystein konnte als Ursache dafür die Oxidation zum Disulfid Cystin (Cys)<sub>2</sub> gefunden werden. Bei einer Migrationszeit von  $t_{\text{mig}} = 22.2$  min konnte ein intensives Signal (Intensität  $> 10^8$ ) mit  $m/z = 241.0309$  gefunden werden, welches aufgrund der Fragmentierung im Vergleich zur Literatur eindeutig Cystin zugeordnet werden konnte (Abbildung 4-18).<sup>[327-328]</sup>

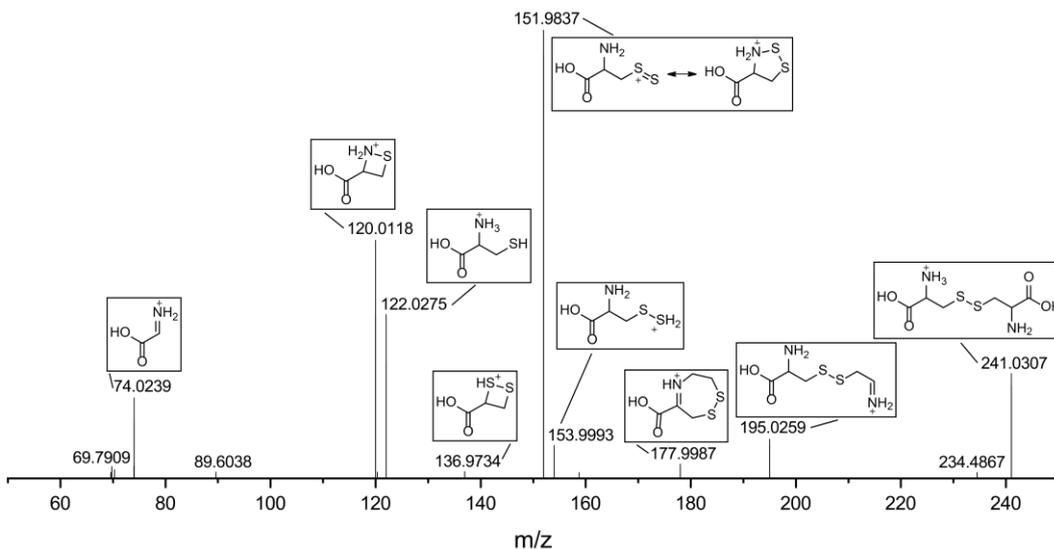
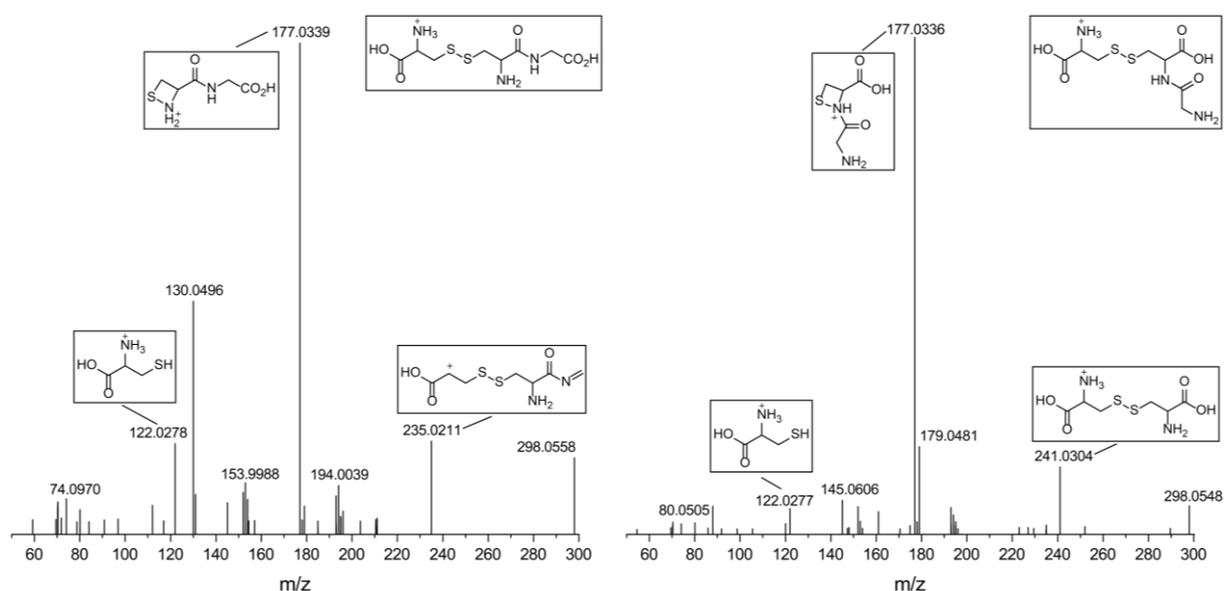


Abbildung 4-18: Zuordnung der Fragmentationen im MS<sup>2</sup>-Spektrum von Cystin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals mit  $m/z = 241.0309$  bei  $t_{\text{mig}} = 22.2$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

Da das Standardredoxpotential von Cystein/Cystin ( $E'_0 = -0.22 \text{ V}$ )<sup>[329]</sup> negativer ist als das Standardredoxpotential von Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>+</sup> ( $E_0 = 0.153 \text{ V}$ )<sup>[330]</sup> kann die Oxidation des Cysteins durch die Reduktion des Kupfer(II)katalysators hervorgerufen worden sein. Es wurde jedoch nicht nur Cystin selbst, sondern auch Peptide der anderen Aminosäuren mit Cystin gebildet. Dabei wurde Cystin sowohl N-terminal als auch C-terminal in Dipeptide eingebaut, wie am Beispiel der zwei Signale des Dipeptids mit Glycin gezeigt (Abbildung 4-19). Neben Glycin wurden auch Dipeptide mit Asparagin und Serin gebildet, welche mit MS<sup>2</sup>-Spektren bestätigt werden konnten. Des Weiteren wurden Spuren an Dipeptiden mit Glutamin und Threonin detektiert. So ist durch die kupferkatalysierte Peptidkondensation in Schwefeldioxid auch der Einbau von Cystinpeptiden möglich, welche mit der Disulfidbrücke ein wichtiges Strukturelement für die Tertiärstruktur von Proteinen liefern.



**Abbildung 4-19:** Zuordnung der Fragmentationen im MS<sup>2</sup>-Spektrum von Cystinylglycin und Glycylcystin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) der Signale mit  $m/z = 298.0522$  bei  $t_{\text{mig}} = 15.7 \text{ min}$  und  $t_{\text{mig}} = 16.3 \text{ min}$  nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 80 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

Zusätzlich wurden aus den Aminosäuren mit polarer Seitenkette Tripeptide gebildet. Dabei wurden hauptsächlich Tripeptide mit zwei Glycin-Molekülen beobachtet. Neben dem Homopeptid GGG wurden Tripeptide mit Asparagin, Glutamin, Serin und Threonin gebildet, welche mit MS<sup>2</sup>-Spektren auf ihre Sequenz untersucht werden konnten. Für Asparagin und Glutamin wurden nur die Tripeptide aus der Reaktion mit Glycyl-Glycin gebildet (GGN, NGG und GGQ, QGG). Für Serin und Threonin konnten jedoch drei Signale mit unterschiedlichem Fragmentierungsmuster detektiert und den Peptiden GGS, GSG, SGG sowie GGT, GTG und TGG zugeordnet werden.

Für die Aminosäuren mit basischer Seitenkette wurden bereits nach 7 d alle möglichen Kombinationen der Dipeptide detektiert und mit MS<sup>2</sup>-Messungen bestätigt (Abbildung 4-20). Bei den sauren Aminosäuren wurde aus Asparaginsäure neben dem Homopeptid DD auch beide möglichen Kombinationen mit Glutaminsäure DE und ED gebildet. Das Homopeptid EE hingegen konnte nicht beobachtet werden und die Reaktionsmischung zeigte auch nach der längeren Reaktionsdauer von 21 d keine Veränderung. Sowohl für die basischen als auch die sauren Aminosäuren wurden keine Tripeptide detektiert.

		C-Terminus					
		7 d			21 d		
N-Terminus	H	■			■		
	K	■			■		
	R	■			■		
		■			■		

		C-Terminus			
		7 d		21 d	
N-Terminus	D	■		■	
	E	■	■	■	■
		■	■	■	■

Abbildung 4-20: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von A) der basischen oder B) der sauren Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

Der Zusatz der basischen Aminosäure Histidin zu der Aminosäuremischung mit unpolarer Seitenkette wirkte sich nicht signifikant auf die Reaktivität aus, da bereits ohne die Zugabe von Histidin fast alle möglichen Dipeptide gebildet wurden. Zusätzlich wurden hierbei schon nach 7 d alle Dipeptide mit Histidin beobachtet (Abbildung 8-18). Mit der sauren Aminosäure Asparaginsäure wurden nicht alle Dipeptide beobachtet und die Peptidkondensation war langsamer (Abbildung 8-19). Nach 21 d wurden neben den Dipeptiden aus zwei unpolaren Aminosäuren auch die Dipeptide aus Asparaginsäure und Isoleucin/Leucin, Prolin, Valin und Tryptophan gefunden. Der Zusatz einer basischen oder sauren Aminosäure zu der Aminosäuremischung mit polarer, neutraler Seitenkette veränderte die Produktzusammensetzung nur leicht (Abbildung 8-14/Abbildung 8-15). Ein deutlicher Anstieg an Produkten war auch hier nicht zu sehen. Die Dipeptide aus der Kombination mit der zugesetzten Aminosäure wurden sowohl bei Histidin als auch bei Asparaginsäure erst nach 21 d beobachtet. Dabei traten hier ebenso wie bei den unpolaren Aminosäuren weniger Dipeptide mit Asparaginsäure als mit Histidin auf.

Aus der Gesamtmischung der 20 Aminosäuren wurde in der kupferkatalysierten Kondensation in Schwefeldioxid eine Vielzahl an Dipeptiden gebildet (Abbildung 4-21). Die Anzahl der Produkte erhöhte sich dabei mit längerer Reaktionszeit (Vgl. Abbildung 8-10). Einige der in den Untergruppen beobachteten Trends setzten sich auch in der Gesamtmischung fort. So war die Reaktivität der unpolaren Aminosäuren gegenüber den polaren, neutralen Aminosäuren

leicht erhöht und die der basischen Aminosäuren deutlich gegenüber den sauren Aminosäuren. Mögliche Ursachen dafür könnten die Löslichkeit der Aminosäuren im Lösungsmittel sein, die Lewis-Azidität von Schwefeldioxid oder die Koordination an den Katalysator. Zudem waren einzelne Aminosäuren wie Tyrosin weiterhin nahezu unreaktiv. Ob dies an der Löslichkeit oder Polarität in Schwefeldioxid liegt oder generell in der kupferkatalysierten Reaktion auftritt, konnte aufgrund der fehlenden Daten zur wässrigen SIPF-Reaktion nicht aufgeklärt werden. Cystein reagierte wie zuvor beobachtet teilweise zu Cystin. Es wurden auch hier Peptide mit Cystin beobachtet mit der unpolaren Aminosäure Phenylalanin und der basischen Aminosäure Histidin.

		C-Terminus																		
		A	F	I/L	M	P	V	W	C	G	N	Q	S	T	Y	H	K	R	D	E
N-Terminus	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	I/L	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	M	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	P	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	W	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Y	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	H	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	K	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	R	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 4-21: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid nach 21 d ausgehend von der gesamten Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert, ■ = Cystin Spuren).

Im Vergleich zu den einzelnen Untergruppen zeigten sich in der Gesamtmischung jedoch auch Abweichungen in den Produktpeptiden. So wurden einige Dipeptide, welche in den Untergruppen gebildet wurden, in Konkurrenz mit allen 20 Aminosäuren nicht mehr detektiert

(z.B. MI, ST, HH, DD). Des Weiteren war innerhalb der unpolaren Aminosäuren Valin am unreaktivsten, in der Gesamtmischung hingegen wurden von den unpolaren Aminosäuren mit Tryptophan die wenigsten Dipeptide detektiert. Das heißt, dass die Zusammensetzung der Aminosäuren in der Reaktionsmischung durch Wechselwirkungen und Konkurrenz untereinander die Produktpalette und Selektivität beeinflussen kann.

Die Konzentration der einzelnen Aminosäuren lag in der Gesamtmischung mit insgesamt 400 mmol/L pro Aminosäure bei 50 mmol/L. Dies war die niedrigste der getesteten Konzentrationen in den Versuchen ausgehend von Alanin und Glycin und diejenige mit der meisten Produktbildung. Zusätzlich wurde die Peptidkondensation aus der Gesamtmischung bei einer Konzentration von 50 mmol/L, dementsprechend 2.5 mmol/L pro Aminosäure, durchgeführt. Dabei konnte weiterhin eine Vielzahl an Dipeptiden gebildet werden, auch wenn insgesamt die Anzahl und Konzentration sank (Abbildung 8-12). Folglich sind für die Durchführung der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid im Kontext des Ursprungs des Lebens nur geringe Aminosäurenkonzentrationen im Vergleich zu anderen Peptidbildungsreaktionen und auch im Vergleich zur SIPF-Reaktion in Wasser notwendig. Dies erhöht die Plausibilität dieses Szenarios für die Frühe Erde.

Um die Auswirkungen der SIPF-Reaktion als präbiotische Peptidkondensation zu untersuchen, wurden von Rode *et al.* die Präferenzen innerhalb der Dipeptidprodukte mit der Häufigkeit der Verknüpfung der Aminosäuren in den Proteinen von heutigen Archaeen und Prokaryoten verglichen.<sup>[331]</sup> Jedoch wurden dabei keine Experimente zwischen Mischungen mehrerer Aminosäuren durchgeführt, sondern nur ein oder zwei Aminosäuren gleichzeitig zu Peptiden kondensiert. Eine Beeinflussung der Produktbildung durch Wechselwirkung und Konkurrenz der Aminosäuren untereinander wurde daher nicht in die Selektivitäten einbezogen. Darüber hinaus sind heutige Proteine durch Evolution und Biosynthese derart weiterentwickelt, dass eine hohe Übereinstimmung mit ursprünglichen abiotischen Synthesewegen unwahrscheinlich ist. Aus diesem Grund wurde für die Peptidbildung in Schwefeldioxid ein Vergleich mit möglichst alten Peptidsequenzen angestrebt. Mit dem Urvorfahren oder LUCA (*last universal common ancestor*) wird eine hypothetische Lebensform beschrieben, welche die letzte gemeinsame Stammform vor der Diversifizierung zu Eukaryoten, Archaeen und Bakterien darstellt. Die zeitliche Einordnung dieser wird noch diskutiert; möglicherweise liegt das Alter sogar bei mehr als 3.9 Ga.<sup>[332]</sup> Für ein genaueres Verständnis über LUCA werden moderne Genome auf ihre Proteinsequenzen untersucht, um unter Ausschluss von horizontalem Gentransfer durch hohe Übereinstimmungen universale Ur-Sequenzen und Gene zu finden.<sup>[333]</sup>

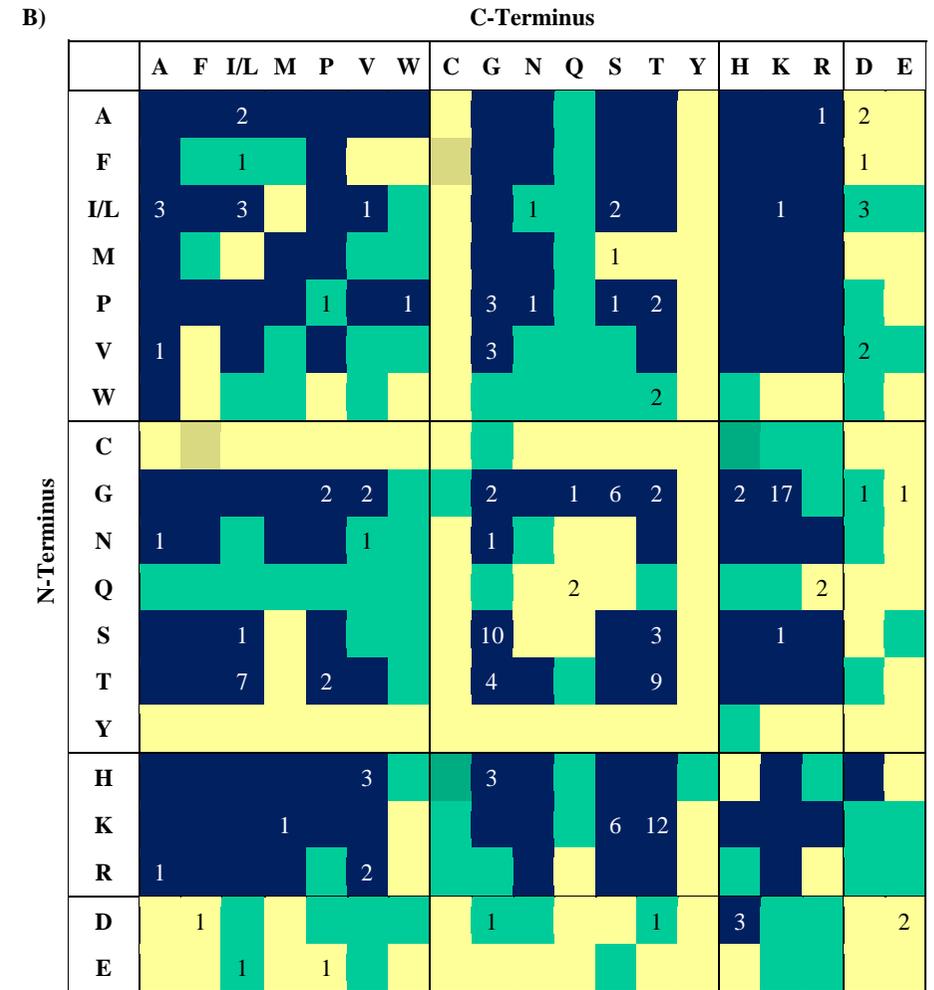
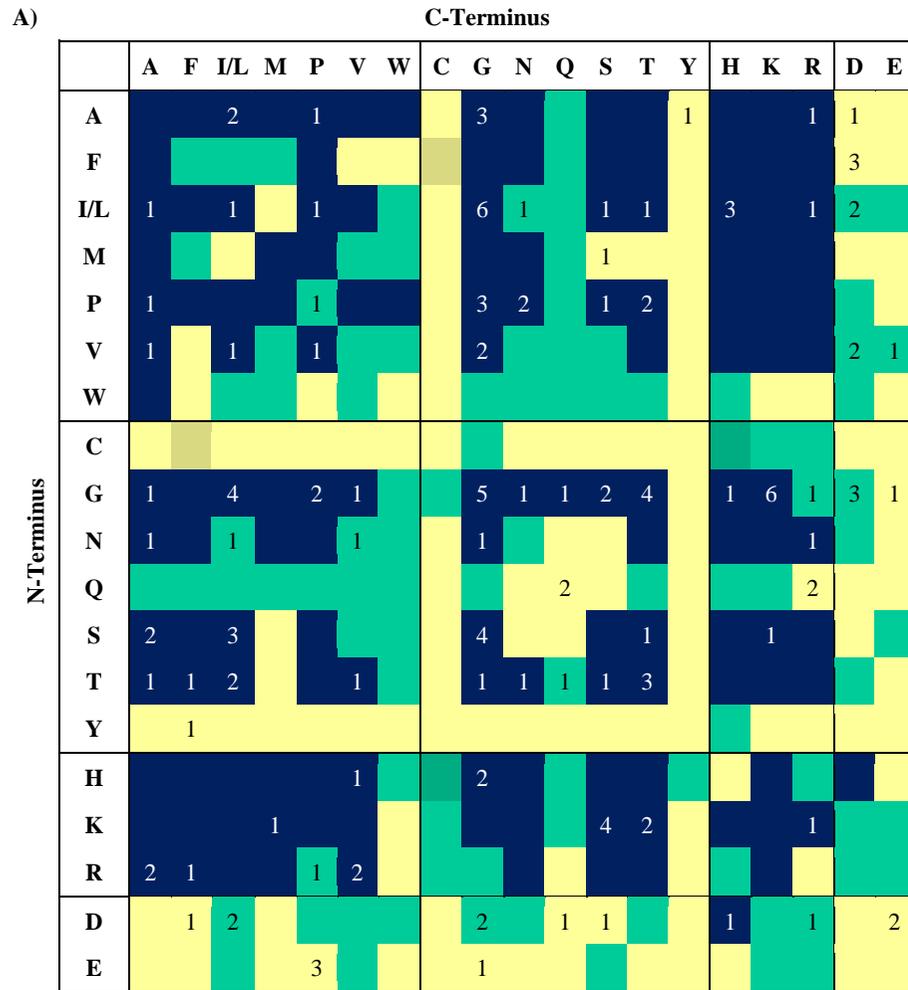


Abbildung 4-22: Vergleich der detektierten Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid nach 21 d ausgehend von der gesamten Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert, ■ = Cystin Spuren) mit der Häufigkeit der Peptidverknüpfungen in alten Sequenzen (Zahlen) nach Trifonov *et al.* A) 2006<sup>[334]</sup> und B) 2007.<sup>[335]</sup>

Trifonov *et al.* haben verschiedene Proteome auf gemeinsame Peptidsequenzen untersucht und dabei hexamere bis octamere Peptidsequenzen gefunden, die omnipresent und daher möglicherweise LUCA-basierend sind.<sup>[334-337]</sup> Um die gebildeten Dipeptide in der kupferkatalysierten Reaktion in Schwefeldioxid nun mit diesen alten Peptidsequenzen zu vergleichen, wurde die Anzahl der jeweiligen Verknüpfung in diesen Sequenzen für zwei Publikationen als Zahlen in die Abbildungen der detektierten Dipeptide eingefügt (Abbildung 4-22). Dabei treten hohe Übereinstimmungen zwischen den häufig gefundenen Sequenzen und den gebildeten Dipeptiden aus unpolaren, polaren und basischen Aminosäuren auf. So sind ein Großteil der Verknüpfungen solche, die eindeutig als Produkte in den durchgeführten Experimenten bestätigt wurden; insbesondere häufig auftretende Verknüpfungen wie GK, GG, TT, SG, KS und KT. Nur die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure treten in den Peptidsequenzen häufiger auf als bei den Produkten der Peptidbildung in Schwefeldioxid. Es wurden in den Reaktionen allerdings auch equimolare Verhältnisse der Aminosäuren eingesetzt. Für die Frühe Erde ist aus präbiotischen Reaktionen hingegen eine Mischung in unterschiedlichen Konzentrationen realistischer. Diese könnte die Produktbildung weiterhin beeinflussen und zum Beispiel bei höheren Anteilen der sauren Aminosäuren auch zu einer stärkeren Produktbildung der D-/E-haltigen Peptide führen.

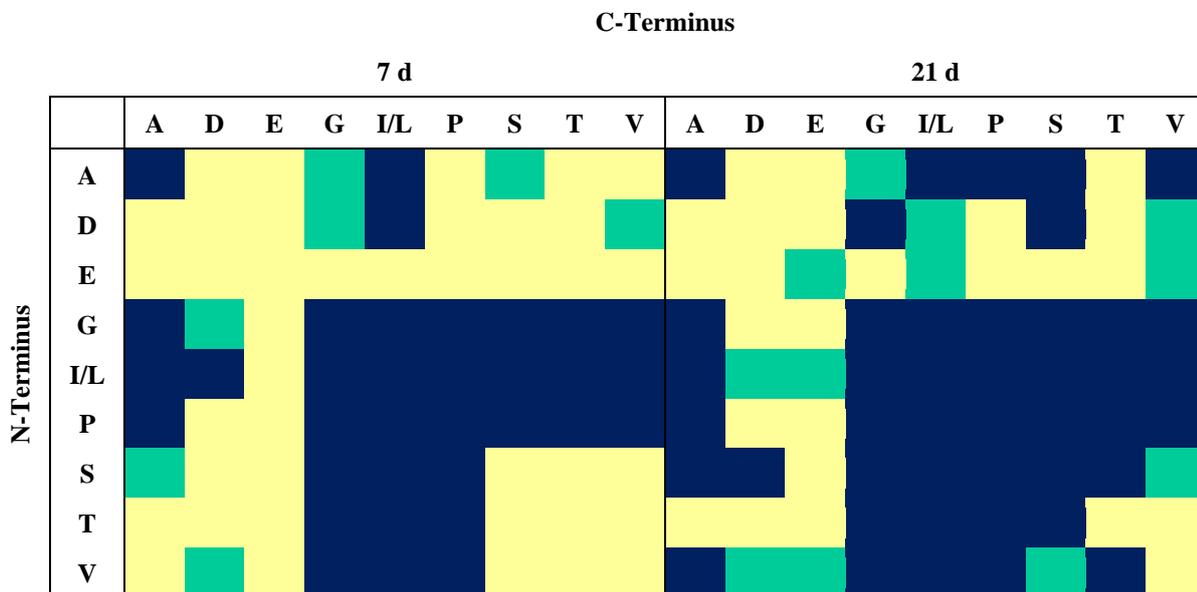


Abbildung 4-23: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der präbiotischen Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

Welche der proteinogenen Aminosäuren bereits im Hadaikum auf der Erde durch abiotische Synthesen vorhanden war, wird in der Forschung diskutiert. Eine Abschätzung der wahrscheinlichsten Aminosäuren wurde von Higgs und Pudritz gegeben.<sup>[167]</sup> Aufgrund dessen wurde zusätzlich eine Mischung von zehn möglichen präbiotischen Aminosäuren in der

kupferkatalysierten Peptidbildung in Schwefeldioxid untersucht. Dabei wurde eine Produktbildung mit allen zehn Aminosäuren sowie eine Steigerung dieser mit längerer Reaktionszeit beobachtet (Abbildung 4-23). Besonders reaktiv waren dabei Glycin, Isoleucin/Leucin und Prolin. Weniger Peptide wurden wiederum mit den sauren Aminosäuren gebildet. In einigen Fällen trat auch die Bevorzugung einer Sequenz gegenüber dem isomeren Dipeptid auf (VT ggü. TV, DG ggü. GD).

Neben dem Aufbau von Proteinvorläufern können kleine Peptide auch aus katalytischer Sicht interessant sein. So sind eine Vielzahl von Di-, Tri- und Tetrapeptiden bekannt, welche katalytische Eigenschaften besitzen und beispielsweise in (asymmetrischen) Aldol-, Michael- und Additions-Reaktionen genutzt werden.<sup>[338-342]</sup> Obwohl Peptide verschiedener Aminosäuren als Katalysatoren dienen können, so zeigten Histidin- und insbesondere Prolin-haltige Peptide herausragende Ergebnisse.<sup>[342-345]</sup> Peptide dieser Aminosäuren wurden in der untersuchten Peptidkondensation in Schwefeldioxid in hoher Anzahl gebildet und standen somit in diesem Szenario als Katalysatoren für weitere präbiotische Reaktionen zur Verfügung.

Insgesamt konnten aus Mischungen der Aminosäuren in einer kupferkatalysierten Kondensation in Schwefeldioxid eine Vielzahl an Peptiden gebildet sowie mithilfe von CE-MS<sup>2</sup> untersucht und zugeordnet werden. Dabei waren die unpolaren Aminosäuren reaktiver als die polaren, neutralen Aminosäuren und die basischen Aminosäuren reaktiver als die sauren Aminosäuren. Die beobachteten Dipeptide variierten dabei je nach Zusammensetzung der Mischung, so dass die Komposition der präbiotischen Reaktionsbedingungen die Selektivitäten in den Verknüpfungen beeinflussen kann. Mit Cystein wurde die Bildung des Disulfids Cystin beobachtet sowie die Kondensation zu Cystin-Peptiden. Damit wurden nicht nur Peptidbindungen aufgebaut, sondern mit der Disulfidbrücke auch ein Strukturelement der Proteine. Es wurden hohe Übereinstimmungen der Selektivitäten mit Peptidsequenzen, welche aufgrund ihrer Omnipräsenz in verschiedenen Lebensformen LUCA zugeordnet werden, gefunden. Dabei waren nur bei den sauren Aminosäuren deutliche Abweichungen in den Präferenzen zu beobachten. Somit wurden die Eigenschaften der kupferkatalysierte Peptidbildung in Schwefeldioxid anhand von Mischungen von Aminosäuren weiter untersucht und die mögliche Bedeutung der Reaktion als Szenario für die Frühe Erde bekräftigt.

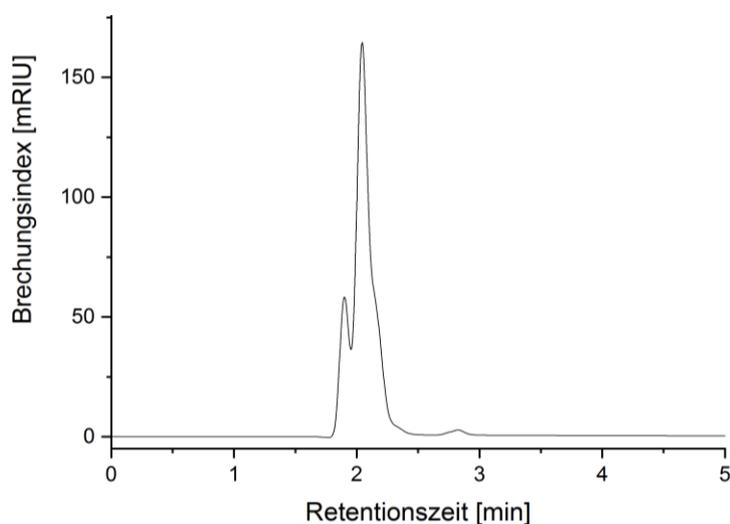
## 5 Mechanochemische Zuckersynthese

### 5.1 Analyse von Monosaccharidmischungen

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Trennung und Detektion von Monosacchariden beschrieben (siehe Kap. 2.2.2). Eine Auswahl dieser wurde auf die Eignung zur Untersuchung von komplexen Mischungen, wie sie bei der Formosereaktion entstehen, untersucht sowie geeignete Methoden für diese Anwendung optimiert.

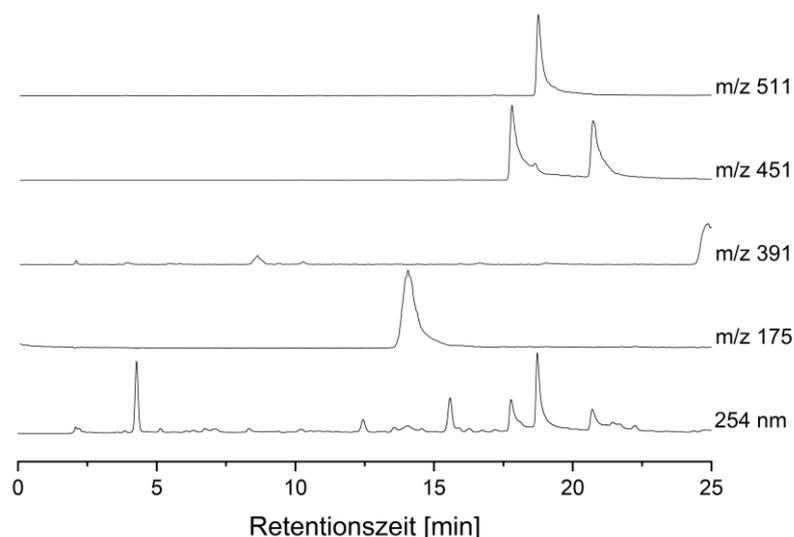
#### 5.1.1 Monosaccharid-Trennung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die Flüssigchromatographie ist eine Derivatisierung der Zucker nicht zwingend notwendig. Die direkte Analyse der Zuckergemische hat die Vorteile, dass keine aufwendige Probenvorbereitung benötigt und eine Veränderung der Probenzusammensetzung durch den Derivatisierungsschritt vermieden wird. Zur Detektion underivatisierter Zucker nach der HPLC-Trennung wurde ein Brechungsindex Detektor verwendet. Aufgrund der Polarität wurden zur Trennung eine hydrophile Interaktionschromatographiesäule sowie eine Anionenaustauschsäule getestet. Für eine Mischung aus Glycolaldehyd, Erythrose, Fructose und Mannose war für beide Methoden allerdings eine schlechte Trennung zu beobachten (Abbildung 5-1). Zusätzlich wurden die Nachteile des Detektors, fehlende Sensitivität sowie Stabilität, deutlich. Daher wurden im Folgenden verschiedene Derivatisierungsmethoden getestet.



**Abbildung 5-1:** Chromatogramm einer underivatisierten Mischung aus Glycolaldehyd, Erythrose, Mannose und Fructose auf einer QN-AX Säule (4.6 x 150mm, 5µm) mit 1 mL/min ACN/H<sub>2</sub>O (80:20) bei T = 25°C und Detektion *via* Brechungsindex.

Im Bereich der HPLC-Anwendungen werden meist Chromophore eingeführt, um eine Detektion mit den Standard-UV-Detektoren möglich zu machen. Von den literaturbekannten Methoden (Kap. 2.2.2) wurde die Verwendung von 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP) und 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) gewählt. Die PMP-Methoden von McRae *et al.*<sup>[346]</sup> sowie Sun *et al.*<sup>[294]</sup> wurden für Proben bestehend aus Glycolaldehyd, Erythrose, Threose sowie Glucose getestet. Dabei wurde mit 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon unter basischen Bedingungen bei 70°C derivatisiert und die Proben *via* RP-HPLC mit Ammoniumacetatpuffer und Acetonitril aufgetrennt. Eine Detektion erfolgte im UV ( $\lambda = 254$  nm) sowie mit ESI-MS. Dabei wurden bei beiden Methoden komplexe Chromatogramme erhalten (Abbildung 5-2), die auf einen unvollständigen Umsatz sowie auf Nebenreaktionen zurückzuführen sind. So wurden neben den Bis-PMP-Produkten auch einfach-substituierte Mono-PMP-Zucker beobachtet. Des Weiteren wurde Glycolaldehyd nur schlecht eluiert. Aufgrund dieser Nachteile wurde diese Derivatisierung nicht weiter untersucht.



**Abbildung 5-2:** Extrahierte Ionenchromatogramme sowie DAD-Chromatogramm der PMP-Derivatisierung nach Sun *et al.*<sup>[294]</sup> für eine Mischung aus Glucose, Erythrose, Threose und Glycolaldehyd. LiChroCart LiChrosphere C18 Säule (1 mL/min, A: 50 mmol/L Ammoniumacetat/ 50 mmol/L Essigsäure, B: 70:30 ACN/A. Gradient A 85% - 65%). *m/z* 511: [Glu+2PMP+H]<sup>+</sup>, *m/z* 451: [Ery+2PMP+H]<sup>+</sup>, *m/z* 391: [GA+2PMP+H]<sup>+</sup>, *m/z* 175: [PMP+H]<sup>+</sup>. Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

Als weitere Derivatisierung wurde die Hydrazonbildung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin untersucht, welche für verschiedene Carbonylverbindungen beschrieben wurde.<sup>[283, 293]</sup> Diese zeichnet sich durch eine schnelle und milde Umsetzung bei Raumtemperatur unter leicht sauren Bedingungen aus. Dadurch kann neben den Monosacchariden auch deren monomerer Ausgangsstoff Formaldehyd detektiert werden, welcher in anderen Methoden durch höhere Reaktionstemperaturen oder bei gaschromatographischen Varianten durch gegebenenfalls

notwendige Lyophilisation der wässrigen Proben entweicht. Im Gegensatz zu den erwarteten *E/Z*-Isomeren wurde unter den eingesetzten Bedingungen jeweils nur ein Signal pro Verbindung beobachtet (Abbildung 5-3). Eine Auftrennung nach Kettenlänge der Monosaccharide bzw. Aldehyde sowie eine Trennung von Aldosen und Ketosen konnte erreicht werden, jedoch konnte nicht innerhalb der Konfigurationsisomere unterschieden werden.

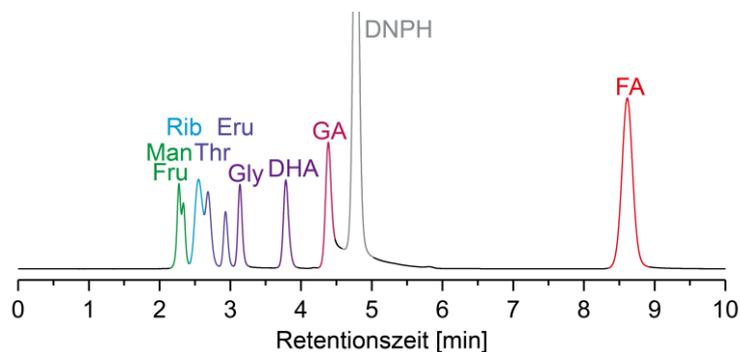
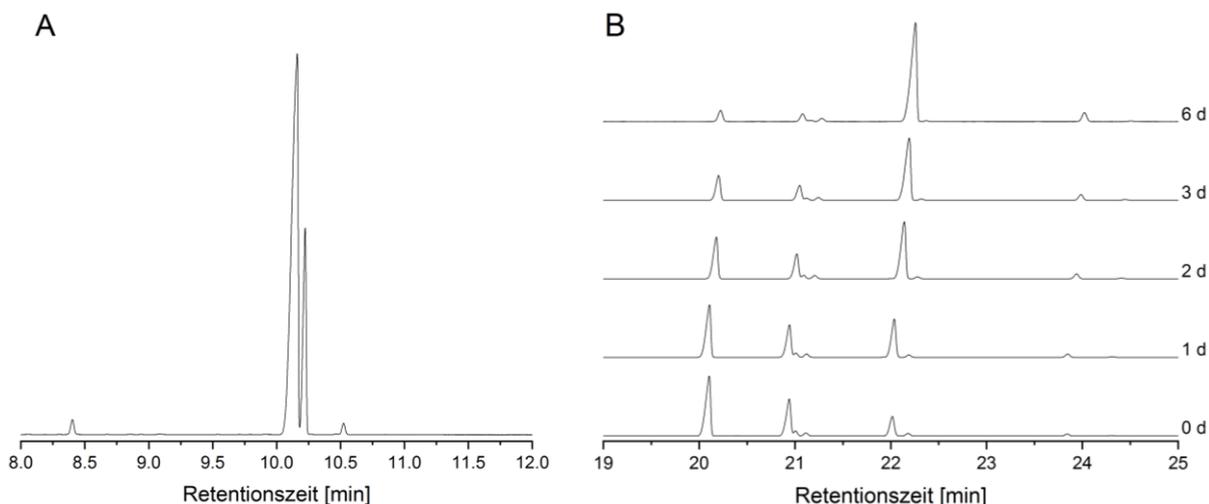


Abbildung 5-3: Trennung der DNP-Derivate *via* HPLC auf einer LichroCart LiChrosphere C18 Säule (1 mL/min,  $\lambda = 360$  nm, 50:50 H<sub>2</sub>O + 0.1% Ameisensäure und ACN + 0.1% Ameisensäure). Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

### 5.1.2 Monosaccharid-Trennung *via* Gaschromatographie

Für die gaschromatographische Analyse wurde parallel ein Flammenionisationsdetektor (FID) benutzt, dessen Signal sich für die Quantifizierung eignet, sowie ein Elektronenstoßionisations-Massenspektrometer, um anhand der Masse und Fragmentierung in Kombination mit der Retentionszeit die Signale genau zuordnen zu können. Es ist eine Schützung der Hydroxylgruppen notwendig, um die Volatilität der Zucker zu erhöhen und eine Zersetzung zu vermeiden. Zur Silylierung wurde *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) mit Hexamethyldisilazan (HMDS) verglichen. Dazu wurden Glucose und Glycolaldehyd-Dimer in Pyridin gelöst, mit dem Silylierungsmittel versetzt und bei 70°C für 30 min erhitzt. Die silylierten Proben wurden anschließend auf einer SE-52 Säule per GC-MS untersucht. Dabei wurde eine Vielzahl an Signalen erhalten. Teilweise sind diese durch die isomeren Strukturen zu erklären. Bei Glucose wird die offenkettige Form sowie die Furanose und Pyranose erwartet. Da Glycolaldehyd im Feststoff als Dimer vorliegt, sind ein Fünf- sowie ein Sechsring als Dimer und das Monomer möglich. Jedoch wurden für beide Verbindungen mehr als die erwarteten Signale erhalten und die Zusammensetzung veränderte sich im Verlauf von wenigen Tagen (Abbildung 5-4). Durch eine Erhöhung der Menge an Silylierungsmittel, um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten, konnte keine Verbesserung erzielt werden. Zusätzlich

wird bei der Derivatisierung mit HMDS eine katalytische Menge an Trifluoressigsäure zugegeben, welche weitere Verunreinigungen einbringen, sowie die Säule beschädigen kann. Um eine saubere und reproduzierbare gaschromatographische Analysemethode zu erhalten, war daher ein weiterer Derivatisierungsschritt notwendig und es wurde im Folgenden BSTFA, welches nur ein flüchtiges Zersetzungsprodukt bildet, als Silylierungsreagenz verwendet.



**Abbildung 5-4:** A: GC-Trennung des mit BSTFA silylierten Glycolaldehyd-Dimers und B: Zeitlicher Verlauf der GC-Trennung von silylierter Glucose auf einer SE-52 Säule (L = 14 m, ID = 0.25 mm, FT = 0.25  $\mu$ m FT), 50°C (2 min), 10 K/min, 140°C, 5 K/min, 240°C (2 min), He (p = 80 kPa). Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

Als zusätzlicher Derivatisierungsschritt wurde die Oximierung der Carbonylfunktion gewählt, wodurch die Zucker in die offenkettige Form gebracht werden, so dass anstelle der vielen isomeren Signale pro Zucker nur zwei Signale durch die *E/Z*-Isomere der Oxime erhalten werden. Aufgrund des Vergleichs verschiedener Derivatisierungsmittel von Becker *et al.*<sup>[316]</sup> wurde *O*-ethyl-substituiertes Hydroxylamin für den Oximierungsschritt verwendet, um die Anzahl isomerer Signale im Chromatogramm zu verringern. Es wurden die Methoden von Becker *et al.*<sup>[316]</sup> und Koek *et al.*<sup>[348]</sup> getestet und verglichen. Die Zucker wurden in Pyridin gelöst, mit *O*-Ethylhydroxylaminhydrochlorid-Lösung (EtOx·HCl) versetzt und erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Silylierungsreagenz zugegeben und erneut erhitzt. Die erste Methode verwendet jedoch zusätzlich katalytische Mengen an 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) im Oximierungsschritt sowie BSTFA als Silylierungsreagenz; letztere hingegen *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA). Die Methode von Becker *et al.* lieferte weniger Nebenprodukte und wurde daher im Folgenden weiter optimiert und für die erwarteten Produktgemische aus Glycolaldehyd bis hin zu Hexosen angepasst.

Dem Zusatz an katalytischen Mengen DMAP konnte kein positiver Effekt auf die Derivatisierung zugeschrieben werden, so dass dies im Folgenden nicht weiterverwendet wurde. Die Temperatur und Dauer der Reaktionen sowie die Menge an Derivatisierungsreagenz wurden dahingehend verbessert, dass eine zügige und vollständige Umsetzung zu beobachten war, aber möglichst geringe Überschüsse der Derivatisierungsmittel und milde Bedingungen verwendet werden konnten. Als optimale Bedingungen wurden ein jeweiliges Erhitzen von 30 min bei 70°C und die Zugabe von 40 mg/mL EtOx·HCl und 120 µL BSTFA identifiziert (Abbildung 5-5). Um später eine Quantifizierung der Produkte durchführen zu können, wurde als interner Standard (IS) Phenyl-β-D-glucofuranosid zugesetzt.

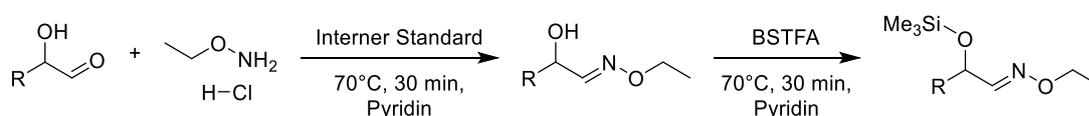


Abbildung 5-5: Optimierte Bedingungen der EtOx-TMS Derivatisierung der Monosaccharide.

Diese Methode wurde auf alle unverzweigten Monosaccharide bis zu den Hexosen angewandt und die erhaltene Mischung zur Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen verwendet. So wurden die Polarität der stationären Phase verändert und insbesondere verschiedene Dimethyl-diphenyl-polysiloxane getestet. Auch die Säulenlänge, sowie das Temperaturprogramm wurden variiert mit dem Ziel eine möglichst gute Trennung in kurzer Zeit zu erhalten. Schließlich wurde ein Copolymer mit 5% Phenylgruppen (SE-52), eine Säulenlänge von 15 m und ein Temperaturprogramm mit Start bei 50°C, einem ersten Gradienten von 5°C/min bis 140°C und einem zweiten Gradienten von 10°C/min bis 240°C und einem Druck von 80 kPa Helium als Trägergas gewählt. Für einzelne Komponenten war eine bessere Trennung bei Verwendung einer anderen stationären Phase, beispielsweise für die Hexosen Allose und Galactose auf dem Copolymer mit 12% Phenylgruppen (PS086), möglich. Allerdings zeigte übergreifend für eine Mischung aller Zucker die oben genannte Methode des SE-52 Polymers die besten Trennleistungen sowie weitere Vorteile der gewünschten Säuleneigenschaften wie geringeres Säulenbluten. So konnten mit dieser Methode Glycolaldehyd, Triosen und Tetrosen getrennt werden, innerhalb der Pentosen und Hexosen gab es allerdings Überlagerung verschiedener Zucker und keine vollständige Trennung (Abbildung 5-6). Zusätzlich wurde Galactoheptose als Vertreter der Heptosen getestet. Eine komplette Untersuchung aller Heptosen war aufgrund der fehlenden Zugänglichkeit reiner Referenzsubstanzen nicht möglich. Für die meisten Komponenten wurden wie erwartet zwei Signale entsprechend den *E/Z*-Isomeren der Oxime erhalten. Ausnahmen bilden das

symmetrische Dihydroxyaceton sowie Ribose, Arabinose, Xylulose, Fructose und Sorbose, deren zwei Isomere nicht getrennt wurden.

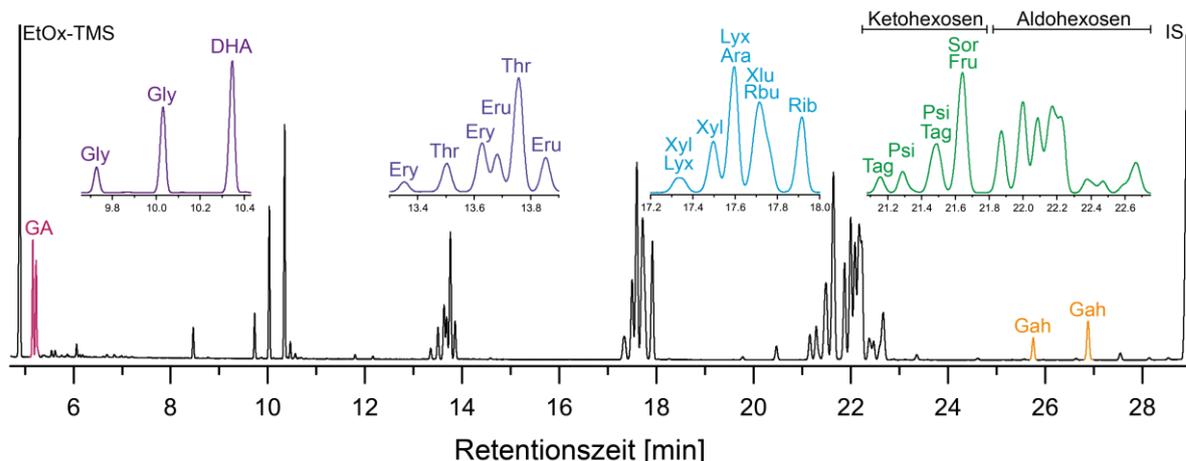


Abbildung 5-6: Gaschromatographische Trennung der EtOx-TMS derivatisierten Zuckerstandards auf einer SE-52 Säule (L = 14 m, ID = 0.25 mm, FT = 0.25  $\mu$ m), 50°C (2 min) mit 10 °C/min bis 140°C, mit 5 °C/min bis 240°C (2 min), He (p = 80 kPa). Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

In Referenz zum internen Standard wurden Eichkurven jeweils für einen Vertreter der Aldosen und Ketosen pro Kettenlänge sowie für Glycolaldehyd aufgenommen, welche eine Quantifizierung möglich machen. Diese sind über einen Konzentrationsbereich von drei Größenordnungen linear (Abbildung 5-7). Die Detektions- sowie Quantifikationslimits (LOD/LOQ) wurden ebenfalls bestimmt. Die Nachweisgrenzen liegen je nach Komponente im Bereich von 1 - 4 mg/L und die LOQs im Bereich von 3 - 13 mg/L (siehe Anhang).

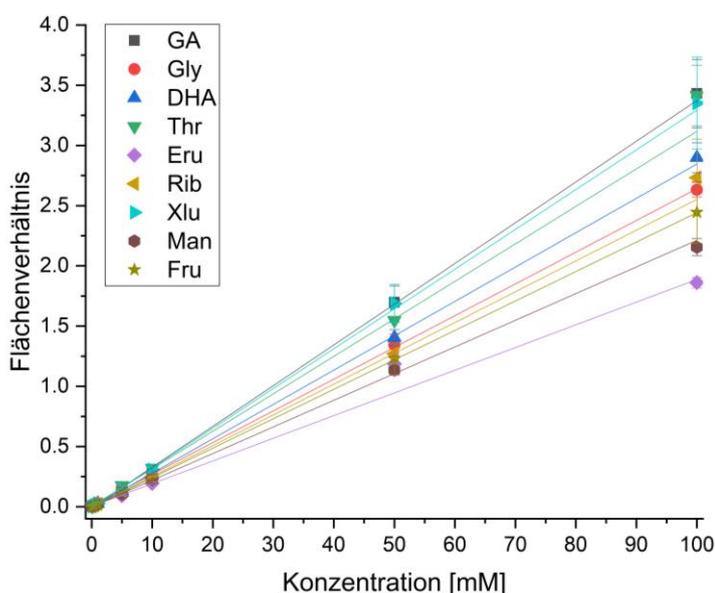


Abbildung 5-7: Eichgeraden für die ECN-korrigierten EtOx-TMS-Derivate der Monosaccharide in Referenz zum internen Standard Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Des Weiteren wurde die Stabilität bzw. Haltbarkeit der Derivatisierungslösungen sowie der derivatisierten Proben bestimmt. Die EtOx·HCl Lösung blieb bei 5°C für 7 Tage stabil, derivatisierte Proben zeigten innerhalb von 14 Tage bei Aufbewahrung bei -20°C keine Veränderung. Längere Lagerung der Proben führte zu einer Zersetzung und Veränderung der Probenzusammensetzung.

Um eventuelle Nebenprodukte identifizieren zu können, wurden Vertreter bekannter Nebenreaktionen der Formosereaktion als Referenzen vermessen. Eine Übersicht über Retentionszeiten sowie beobachtete Fragmente findet sich in Tabelle 5-1.

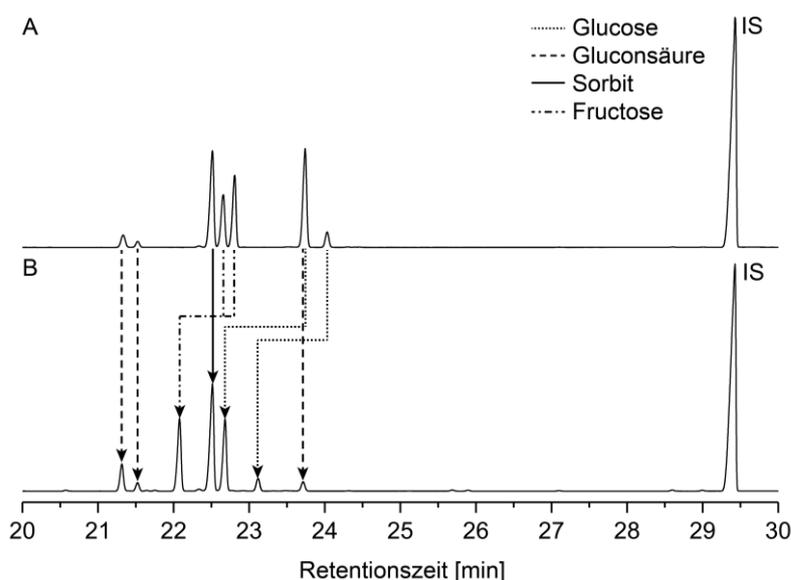
**Tabelle 5-1: Fragmentierung der EtOx-TMS-Derivate verschiedener Monosaccharide und Nebenprodukte der Formosereaktion.**

Verbindung	$t_{\text{ret}}$ [min]	Fragmente [ $m/z$ ]
Glycol	4.7	191, 149, 147, 131, 73
Glycolaldehyd	5.6	160, 130, 103, 73
Glycolsäure	6.2	205, 177, 161, 149, 147, 133, 73
Milchsäure	6.0	219, 191, 147, 133, 117, 73
Glycerin	9.4	218, 205, 190, 147, 133, 117, 73
Glycerinaldehyd	9.7/10.0	277, 262, 217, 174, 147, 73
Glycerinsäure	10.7	307, 292, 217, 205, 189, 147, 73
Dihydroxyaceton	10.3	277, 262, 174, 147, 73
Erythrit/Threit	13.0/12.8	410, 395, 320, 307, 293, 217, 147, 73
Aldotetrosen	13.3-13.7	379, 364, 276, 205, 175, 147, 73
Erythrose	13.7/13.9	379, 364, 276, 187, 147, 103, 73
Pentaerythrit	12.9	409, 319, 244, 191, 147, 73
Xylit/Ribit	16.7/17.0	512, 497, 423, 395, 332, 319, 307, 277, 217, 147, 129, 73
Aldopentosen	17.3-18.0	481, 466, 307, 217, 147, 103, 73
Ketopentosen	17.7	481, 466, 378, 277, 187, 147, 73
Sorbit/Mannit	21.2/21.0	614, 421, 345, 319, 217, 147, 129, 73
Aldohexosen	21.8-22.7	583, 568, 319, 217, 205, 157, 147, 129, 73
Ketohexosen	21.1-21.7	583, 568, 378, 307, 277, 217, 147, 103, 73
Gluconat	19.9-22.3	613, 435, 359, 333, 319, 305, 292, 217, 147, 73
Galactoheptose	25.7-26.9	670, 331, 217, 191, 147, 73

Neben dem Molekülpeak  $[M]^+$ , finden sich häufig die Fragmente  $[M-CH_3]^+$ ,  $[M-OSi(CH_3)_3]^+$ ,  $[M-CH_2OSi(CH_3)_3]^+$  sowie mit  $m/z$  73  $[Si(CH_3)_3]^+$  und mit  $m/z$  147  $[Si(CH_3)_3O-Si(CH_3)_2]^+$ . Dies gilt nicht nur für Aldosen und Ketosen, sondern auch für die

Zuckeralkohole. Das Fragmentierungsmuster der Zuckersäuren hingegen unterscheidet sich davon und weist stattdessen große Ähnlichkeiten auf zu den bereits detailliert in der Literatur beschriebenen trimethylsilylierten Hydroxycarbonsäuren.<sup>[349]</sup>

Da bei den Zuckeralkoholen und -säuren keine Oximierung erfolgt, sondern nur eine Silylierung, lassen sich außerdem die verschiedenen Substanzklassen durch einen Vergleich verschiedener Hydroxylamine voneinander unterscheiden. Verwendet man unsubstituiertes Hydroxylaminhydrochlorid (HACl) als Oximierungsreagenz, so wird dies bei der folgenden Silylierung am Oxim ebenfalls silyliert. Das *O*-Ethylhydroxylamin besitzt an dieser Position bereits die Ethylgruppe und das Oxim bleibt daher im Silylierungsschritt unverändert. So wurde am Beispiel von Glucose und der zugehörigen Ketose, Zuckersäure und dem Zuckeralkohol jeweils mit beiden Reagenzien derivatisiert und die bei gleichen Bedingungen erhaltenen Gaschromatogramme verglichen (Abbildung 5-8).



**Abbildung 5-8:** Vergleich der Gaschromatogramme der HACl-TMS (A) und der EtOx-TMS (B) Derivate von Aldose, Ketose, Zuckersäure und -alkohole. Gaschromatographische Trennung auf einer SE-52 Säule (L = 14 m, ID = 0,25 mm, FT = 0,25 µm), 50 °C (2 min) mit 10 °C/min bis 140 °C, mit 5 °C/min bis 240 °C (2 min), He (p = 80 kPa). Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

Die Retentionszeit und das Massenspektrum der Zuckersäure und des Zuckeralkohols änderten sich hierbei nicht. Bei den Aldosen und Ketosen hingegen erfolgt eine Oximierung mit den unterschiedlichen Reagenzien, wodurch sich die Retentionszeit verändert und im Massenspektrum eine Verschiebung von  $\Delta m/z$  44 durch die Differenz der Massen des Trimethylsilyl- gegenüber des Ethylsubstituenten am Oxim-Sauerstoffatom zu beobachten ist. Die höhere Anzahl an Signalen für Gluconsäure liegt an dem möglichen intramolekularen

Ringschluss, so dass neben der offenkettigen Säure ( $t_{\text{ret}} = 23.7$  min) auch Lactone mit verschiedenen Ringgrößen möglich sind ( $t_{\text{ret}} = 21.3, 21.5$  min).

Diese Methoden eignen sich allerdings nicht für Formaldehyd und dessen Cannizzaro-Produkte Methanol und Ameisensäure, da diese zu flüchtig sind. Hierfür wurde eine Methode für die underivatisierte, gaschromatographische Messung der Proben mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) entwickelt. Dazu wurden die Referenzen in Dichlormethan gelöst bzw. später die löslichen Bestandteile der Reaktionsproben mittels gründlicher Durchmischung mit einem Vortexmischer in Dichlormethan gelöst und der feste Rückstand abzentrifugiert. Mit einer 50 m langen und mit hoher Schichtdicke ausgestatteten Dimethylpolysiloxan-Säule (CP-Sil 5 CB) können besonders flüchtige Komponenten gaschromatographisch getrennt werden. Isotherm bei 50°C und mit 2 mL/min Helium als Trägergas wurden Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure getrennt (Abbildung 5-9).

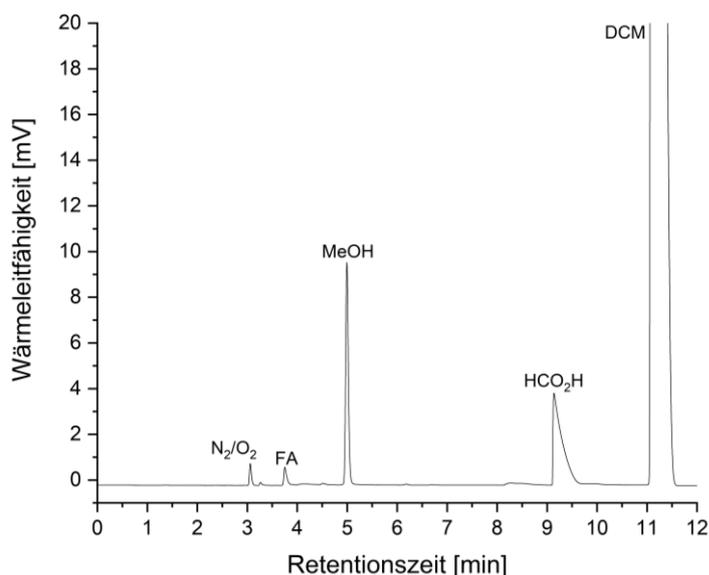


Abbildung 5-9: GC-TCD-Trennung von Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure auf einer CP-Sil 5CB Säule (L = 50 m, ID = 320  $\mu\text{m}$ , FT = 5000 nm, He 2 mL/min, T = 50°C). Abbildung angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Um auch die Pentosen und Hexosen vollständig trennen zu können, wurde eine weitere Derivatisierung getestet. Zweckmair *et al.* berichteten von einer verbesserten Trennleistung bei Verwendung von Trifluoroacetylgruppen anstelle von Trimethylsilylgruppen und einer veränderten stationären Phase. Dies zeigten sie am Beispiel von drei Hexosen und zwei Pentosen auf einer Cyanopropyl/phenyl-dimethylpolysiloxan-Säule.<sup>[317]</sup> Daher wurde dieser Ansatz gewählt und ebenfalls alle unverzweigten Triosen bis Hexosen sowie Glycolaldehyd im ersten Schritt analog zur EtOx-TMS-Derivatisierung umgesetzt und im zweiten Schritt das

Silylierungsreagenz BSTFA durch 50  $\mu\text{L}$  des Trifluoroacetylierungsreagenzes *N*-Methyl-bis(trifluoroacetamid) (MBTFA) ersetzt (Abbildung 5-10).

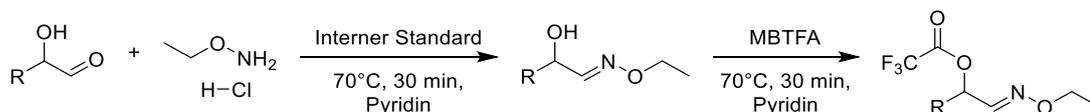


Abbildung 5-10: EtOx-TFA-Derivatisierung der Monosaccharide.

Da es bei der Derivatisierung der Ketosen hierbei zu Nebenreaktionen kommen kann, wurden zunächst nur die Aldosen untersucht. Nach Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen konnte eine nahezu vollständige Trennung aller Aldosen auf einer 30 m langen OV-225 Säule erreicht werden mit einem Temperaturprogramm beginnend bei 80°C und einem Gradienten von 2°C/min bis 160°C und anschließend 10°C/min bis 200°C mit 80 kPa Helium als Trägergas (Abbildung 5-11). Dabei überlagerten zwar manche Signale, allerdings wurde bis auf Glucose jeweils eines der beiden isomeren Signale von fünfzehn Monosacchariden getrennt. Entgegen der Erwartung lag die Retentionszeit von Glycolaldehyd bei 44.3 min und damit sogar hinter den Hexosen. Das Massenspektrum weist auf das trifluoracetylierte Dimer hin, welches durch Fragmentierung  $\text{CF}_3$ - oder TFA-Gruppen verliert. Das Glycolaldehyd-Dimer wird folglich in der EtOx-TMS-Derivatisierung zum Monomer gespalten und oximiert, in der EtOx-TFA-Derivatisierung hingegen nicht und nur im zweiten Derivatisierungsschritt umgesetzt. Das unterschiedliche Verhalten des Glycolaldehyd-Dimers unter gleichen Oximierungsbedingungen und nur unterschiedlichem zweiten Derivatisierungsschritt zur Schätzung der Hydroxygruppen konnte nicht begründet werden.

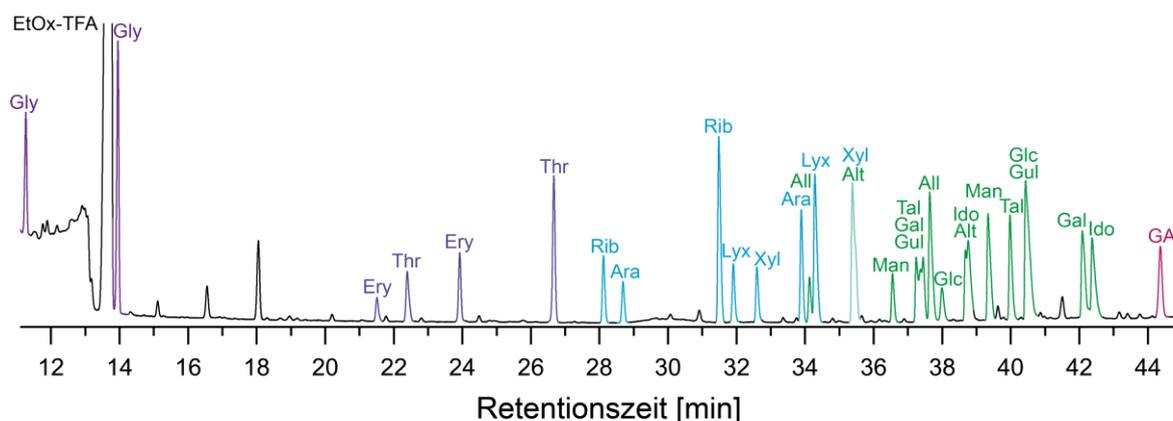


Abbildung 5-11: Gaschromatographische Trennung der EtOx-TFA-Derivate der unverzweigten Monosaccharide auf einer OV-225 Säule ( $L = 30\text{ m}$ ,  $ID = 0.25\text{ mm}$ ,  $FT = 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ), 80°C (5 min) mit 2°C/min bis 160°C und mit 10°C/min bis 200°C (12 min), He ( $p = 80\text{ kPa}$ ). Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

Die Derivatisierung der Ketosen mit dieser Methode wurde bereits in der Literatur als problematisch beschrieben. So wird vermutet, dass geringe Spuren an Trifluoressigsäure entstehen, welche Nebenreaktionen und Zersetzung der Ketosen beispielsweise zu zyklischen Oximen oder Hydroxycarbonsäuren begünstigen.<sup>[314, 317]</sup> Neutralisation mit Kaliumcarbonat wurde zur Hinderung der Zersetzungsreaktionen vorgeschlagen. Die Neutralisation lieferte allerdings keine reproduzierbaren Ergebnisse und weiterhin Nebenprodukte, so dass sich die EtOx-TFA-Derivatisierung nur für Aldosen und nicht für Ketosen eignet.

In den Massenspektren war generell mit  $m/z$  69 das  $[\text{CF}_3]^+$ -Fragment und mit  $m/z$  97 das  $[\text{COCF}_3]^+$ -Fragment der Trifluoracetylierung zu beobachten. Neben dem Molekülpeak  $[\text{M}]^+$  traten vor allem Fragmente mit ein- oder mehrfachem Verlust der TFA-Gruppen  $[\text{M}-\text{CO}_2\text{CF}_3]^+$ ,  $[\text{M}-2(\text{CO}_2\text{CF}_3)]^+$  auf. Bei der Zuckersäure war wiederum die Lactonbildung zu beobachten. Eine Auflistung der beobachteten Fragmente für die Zuckerderivate findet sich in Tabelle 5-2.

**Tabelle 5-2: Fragmentierung der EtOx-TFA-Derivate verschiedener Zucker und Nebenprodukte.**

Verbindung	$t_{\text{ret}}$ [min]	Fragmente [ $m/z$ ]
Glycolaldehyd-Dimer	44.3	214, 145, 117, 90, 69
Glycerinaldehyd	11.1-14.0	325, 212, 183, 97, 69
Glycerin	18.9	267, 253, 153, 125, 97, 69
Aldotetrosen	21.4-26.8	451, 337, 224, 199, 195, 98, 69
Aldopentosen	28.0-35.6	577, 464, 304, 236, 207, 199, 97, 69
Aldohexosen	34.0-42.6	703, 590, 476, 348, 236, 199, 97, 69
Pentaerythrit	40.0	501, 407, 292, 166, 97, 69
Sorbit	46.5	645, 505, 379, 303, 265, 253, 207, 97, 69
Gluconat	44.3	492, 464, 377, 280, 264, 238, 193, 97, 69

Zur Quantifizierung wurden ebenfalls Eichkurven im Vergleich zum internen Standard Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid aufgenommen, welche ein lineares Verhalten zeigen (Abbildung 5-12). Bei den Detektionslimits liegen die Werte für die EtOx-TFA derivatisierten Monosaccharide bei 7 - 44 mg/mL und bei den Quantifikationslimits bei 24 - 146 mg/mL und damit deutlich höher als für die EtOx-TMS Derivatisierung (siehe Anhang). Die Stabilität der derivatisierten Proben ist mit 7 d bei  $-20^\circ\text{C}$  geringer im Vergleich zu den trimethylsilylierten Proben.

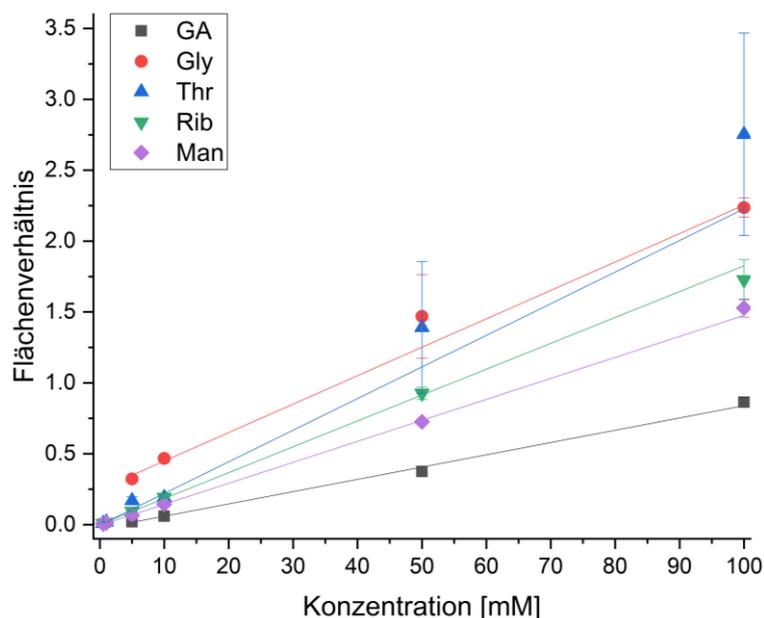


Abbildung 5-12: Eichgeraden für die C-Anzahl-korrigierten EtOx-TFA-Derivate der Monosaccharide in Referenz zum internen Standard Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Insgesamt ist die gaschromatographische Analyse der oximierten und trimethylsilylierten Monosaccharide die umfassendste für Probenmischungen wie sie bei der Formosereaktion entstehen. Diese kann gezielt durch die stärkere Auftrennung der Pentosen und Hexosen als EtOx-TFA-Derivate sowie für Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure durch eine underivatisierte Methode mit Wärmeleitfähigkeitsdetektion ergänzt werden. Aufgenommene Standards bieten durch Retentionszeiten und charakteristische Fragmente in den Massenspektren die Möglichkeit zur detaillierten Identifikation der Monosaccharide und Nebenprodukte in den Probenmischungen. In Referenz zum internen Standard, mit linearen Eichkurven sowie den Detektions- und Quantifikationslimits können des Weiteren nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen zu den Probenzusammensetzungen gemacht werden.

## 5.2 Mechanochemische Reaktionen

Die mechanochemische Zuckersynthese ausgehend von Glycolaldehyd und Calciumhydroxid wurde von S. Lamour untersucht.<sup>[232]</sup> Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine Anwendung im präbiotischen Kontext untersucht.

### 5.2.1 Mineralienkatalysierte Aldolreaktion

Neben Calciumhydroxid als dem klassischen Katalysator sind in der wässrigen Formosereaktion viele weitere Katalysatoren bekannt. So zeigen auch eine Reihe an Mineralien katalytische Eigenschaften. Die Aktivität begründet sich hauptsächlich in der Basizität sowie einer Komplexierung durch das Metallion. Es wurde eine Vielzahl an natürlichen Mineralien verschiedener Klassen auf ihre Aktivität hin untersucht. Dabei wurde die Auswahl der getesteten Mineralien in Anlehnung an das Mineralieninventar, welches nach heutigem Kenntnisstand wahrscheinlich bereits im Hadaikum auf der Erde vorhanden war oder durch Meteoriten eingetragen wurde, durchgeführt.<sup>[46]</sup> Glycolaldehyd-Dimer wurde mit den Mineralien (20 mol% bezogen auf das Monomer) in einer Schwingmühle bei 30 Hz für 90 min gemahlen und somit zur Reaktion gebracht (Abbildung 5-13).

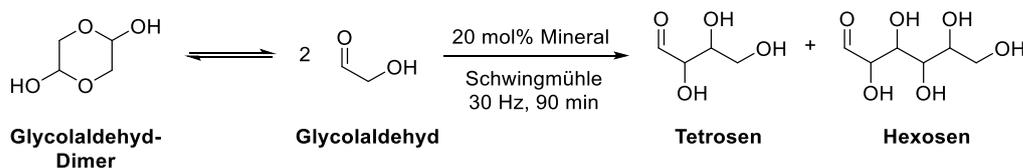
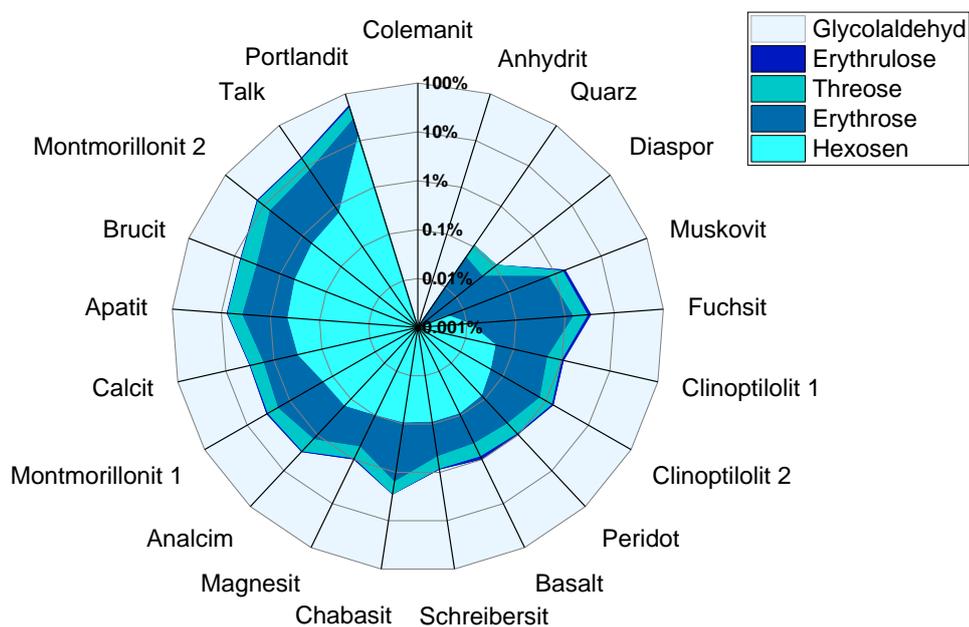


Abbildung 5-13: Mineralienkatalysierte, mechanochemische Aldolreaktion zum Aufbau von Tetrosen und Hexosen.

Der höchste Umsatz wurde wie erwartet bei Portlandit beobachtet. Das aus Calciumhydroxid bestehende Mineral zeigte zwar eine leicht geringere Aktivität als synthetisches, hochreines Calciumhydroxid, diese Unterschiede sind jedoch in der geringeren Reinheit zu begründen. Die nächsthöchsten Aktivitäten wurden für die Silikate Talk und Montmorillonit sowie das Hydroxid Brucit und das Phosphat Apatit gefunden. Des Weiteren sind Vertreter der Carbonate, Zeolithe, Glimmer, Schichtsilikate, Phosphide, Olivine und auch vulkanisches Basaltglas katalytisch aktiv (Abbildung 5-14). Von den getesteten Mineralien wurde nur beim Borat Colemanit sowie beim Sulfat Anhydrit kein Umsatz beobachtet. Im Vergleich einiger Mineralien zeigte sich auch der hohe Einfluss der Metallionen. So verdoppelte sich der Umsatz innerhalb der Glimmer von Muskovit zum sehr ähnlichen Fuchsit, welches sich nur durch den Einbau von Chromionen unterscheidet. Eine hohe Abweichung war bei den Tonmineralien, dem Montmorillonit zu beobachten. Zwei verschiedene Proben dieses Minerals aus

verschiedenen Quellen, welche sich im Calcium-, Magnesium und Natrium-Gehalt unterscheiden, sorgten für einen Umsatzunterschied von 20%.



**Abbildung 5-14: Produktverteilung in Abhängigkeit der Mineralien von der mechanochemischen Aldolreaktion ausgehend von Glycolaldehyd. Abbildung angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.**

Neben dem Umsatz sind auch die Selektivitäten innerhalb der Produktverteilung zu beachten. So waren innerhalb der Tetrosen zwar generell die Aldosen das Hauptprodukt, das Verhältnis der Aldotetrosen zur Ketotetrose Erythrulose war aber sehr breit gestreut von 5 (Basaltglas) bis hin zu 53 (Chabasit). Nicht nur das Gleichgewicht der Isomerisierung zwischen Aldose und Ketose, sondern auch das vorwiegend gebildete Diastereomer der Aldotetrosen konnte durch den Katalysator beeinflusst werden. So war das Verhältnis der zwei Aldotetrosen untereinander Erythrose/Threose nicht einheitlich. Es lag im Bereich von 0.71 (Brucit) bis 1.23 (Montmorillonit 1) und so unterschied sich je nach Mineral, welches der diastereomeren Tetrosen das bevorzugte Hauptprodukt war.

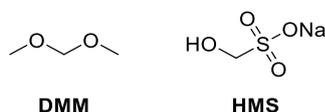
Nicht bei allen katalytisch-aktiven Mineralien wurden zusätzlich auch Hexosen gebildet. So konnten bei Quarz und Diaspor zwar Tetrosen, aber keine Hexosen detektiert werden. Ein insgesamt höherer Umsatz korrelierte auch nicht durchgängig mit einem höheren Anteil an Hexosen gegenüber den Tetrosen. Bei den Glimmern Muskovit und Fuchsit waren trotz eines höheren Umsatzes zu Tetrosen nur Spuren an Hexosen zu beobachten, wohingegen bei Magnesit zwar ein niedrigerer Umsatz im Vergleich zu den Glimmern beobachtet wurde, aber etwa zehnmal so viele Hexosen. Damit lag bei den Carbonaten das Produktverhältnis von

Tetrosen/Hexosen bei etwa 9. Noch stärker in Richtung der Hexosen verschoben war dies bei Portlandit mit 3.5, allerdings auch insgesamt mit hohem Umsatz.

Insgesamt eignet sich eine Vielzahl an Mineralien verschiedener Klassen und Strukturen als Katalysator für den Zuckeraufbau. Nur das Borat Colemanit und das Sulfat Anhydrit waren unter den getesteten Bedingungen nicht katalytisch aktiv. Die Umsätze, Produktverteilungen und die Selektivitäten innerhalb der Produkte können durch die Wahl des Minerals beeinflusst werden, ein Umsatz zu Tetrosen (und Hexosen) und die Unterdrückung der Nebenreaktionen erfolgte jedoch durchgängig. Im Vergleich zu den Zeitspannen im Kontext des Ursprungs des Lebens wurde dabei innerhalb kurzer Reaktionszeiten für die Feststoffreaktion bereits eine Anreicherung der Zucker beobachtet.

### 5.2.2 Mechanochemische Formosereaktion

Der Einsatz von Formaldehyd für mechanochemische Reaktionen ist aufgrund des gasförmigen Aggregatzustands bei Raumtemperatur erschwert. Gase finden in der Mechanochemie Anwendung, erfordern jedoch einen speziellen apparativen Aufwand. Die wässrige Lösung Formalin kann aufgrund der hohen Flüssigkeitsmengen nicht eingesetzt werden. Die polymeren Formen Trioxan sowie Paraformaldehyd werden bei den niedrigen Temperaturen in der Kugelmühle nicht depolymerisiert.<sup>[232]</sup>



**Abbildung 5-15: Getestete Derivate von Formaldehyd: Dimethoxymethan (DMM) und Hydroxymethylsulfonat (HMS).**

Daher wurden Derivate von Formaldehyd in den mechanochemischen Reaktionen getestet (Abbildung 5-15). Dimethoxymethan (DMM), das Dimethylacetal des Formaldehyds, ist zwar flüssig, da es aber unverdünnt und nicht in Lösung eingesetzt werden kann, sind die benötigten Flüssigkeitsmengen für eine Durchführung in der Kugelmühle akzeptabel. DMM wurde zusammen mit Calciumhydroxid als Katalysator unter gleichen Bedingungen wie die Mineralienversuche zuvor vermahlen, dabei konnte keine Reaktion beobachtet werden. Da dies auch an der mangelnden Reaktivität in der Umpolung liegen kann, wurde in einem weiteren Versuch Glycolaldehyd zugegeben, um das Aldolnetzwerk zugänglich zu machen. Hierbei wurde nur die Reaktion des Glycolaldehyds zu Tetrosen und Hexosen beobachtet, jedoch kein Einbau des DMM. Ein weiteres Derivat von Formaldehyd ist Hydroxymethylsulfonat (HMS) (Abbildung 5-16). Dies steht in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit Formaldehyd und wurde bereits als präbiotisches Reservoir für Formaldehyd diskutiert.<sup>[147, 350]</sup> So ist eine Bildung

von HMS durch vulkanisches Schwefeldioxid aus Formaldehyd denkbar. In der mechanochemischen Reaktion mit Calciumhydroxid konnte auch hier kein Umsatz beobachtet werden. Wurde Glycolaldehyd zugegeben, entstanden jedoch neben den Tetrosen auch Spuren an Triosen, so dass ein Einbau des HMS möglich ist. Der Umsatz von HMS war jedoch sehr gering und nicht quantifizierbar.

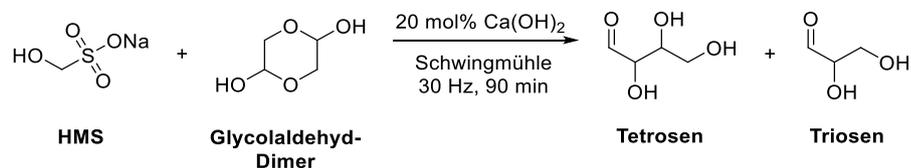


Abbildung 5-16: Einbau von Hydroxymethylsulfonat (HMS) im mechanochemischen Aldolnetzwerk.

Eine zusätzliche Möglichkeit Formaldehyd für die mechanochemischen Reaktionen zugänglich zu machen, besteht darin, es auf einem Trägermaterial zu adsorbieren. Aufgrund der hohen Kapazität wurde als Trägermaterial zunächst synthetisches Molsieb (4 Å) verwendet. Trockenes Paraformaldehyd wurde zur Depolymerisation unter Stickstoffstrom auf 150°C erhitzt und das thermisch depolymerisierte Monomer durch das ausgeheizte Molsieb geleitet und dort adsorbiert. Anhand der Gewichtsänderung des Trägermaterials konnte die Menge an adsorbiertem Formaldehyd bestimmt werden. Im Anschluss wurde der adsorbierte Formaldehyd mit Calciumhydroxid und Glycolaldehyd in der Planetenmühle vermahlen (Abbildung 5-17). Dabei wurde mithilfe von Begasungsdeckeln unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet, um eine explosive Mischung aus Formaldehyd/Luft zu verhindern.

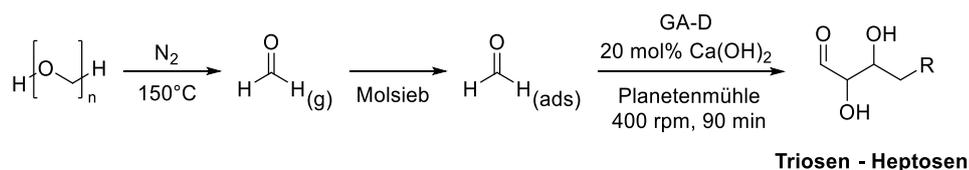
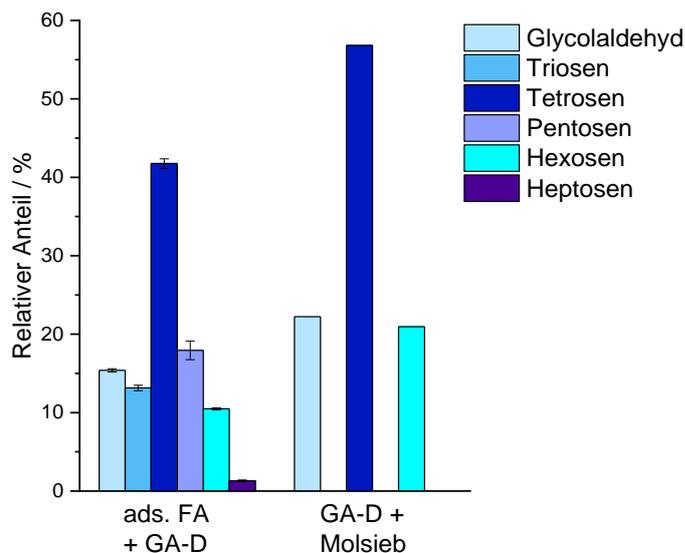


Abbildung 5-17: Einsatz von adsorbiertem Formaldehyd in der mechanochemischen Synthese von Triosen bis Heptosen.

Entstanden bei der mechanochemischen Reaktion ausgehend von Glycolaldehyd, welches zwei Kohlenstoffatome beinhaltet, nur die Tetrosen und Hexosen, also die Monosaccharide mit geradzahligem Kohlenstoffanzahl, so wurden bei zusätzlichem Einsatz von adsorbiertem Formaldehyd auch Triosen, Pentosen und Heptosen gebildet, was für einen Einbau des C1-Bausteins spricht (Abbildung 5-18). Wurde wiederum nur Formaldehyd ohne Glycolaldehyd eingesetzt, war kein Umsatz zu beobachten. Die Umpolung findet unter diesen mechanochemischen Bedingungen folglich nicht statt.



**Abbildung 5-18: Produktverteilung der mechanochemischen Reaktion katalysiert durch Calciumhydroxid mit und ohne adsorbierten Formaldehyd.** Abbildung angelehnt an S. Lamour, S. Pallmann, M. Haas, O. Trapp, *Prebiotic Sugar Formation Under Nonaqueous Conditions and Mechanochemical Acceleration*. *Life* 2019, 9, 52, <https://doi.org/10.3390/life9020052>.<sup>[351]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 License CC BY 4.0.

Die Verwendung von adsorbiertem Formaldehyd für mechanochemische Reaktionen ist auch im präbiotischen Kontext plausibel. Vielfältige Quellen für Formaldehyd sind auf der frühen Erde bekannt und auch die Adsorption auf Mineralien wurde als präbiotisches Reservoir für Formaldehyd diskutiert.<sup>[352]</sup> Um ein realistischeres Szenario für die frühe Erde zu erreichen, wurde daher Formaldehyd auf verschiedenen Mineralien anstelle von synthetischem Molsieb adsorbiert. So wurden Schichtsilikate und Zeolithe aufgrund ihrer Adsorptionsfähigkeit zwischen den Schichten bzw. in den Poren und Kanälen der Mineralienstruktur ausgewählt. Analog zur Methode für synthetisches Molsieb konnte so Formaldehyd auf Fuchsit (1.1 Gew.-%), Montmorillonit (3.1 Gew.-%), Analcim (2.5 Gew.-%), Clinoptilolit (8.6 Gew.-% & 9.7 Gew.-%) und Chabasit (10.8 Gew.-%) adsorbiert werden.

Beim Einsatz des adsorbierten Formaldehyds in der mechanochemischen Zuckersynthese mit Zusatz von Glycolaldehyd konnten für alle Mineralien Triosen bis Heptosen aufgebaut werden (Abbildung 5-19). Der höchste Umsatz trat bei Analcim und Fuchsit auf. So wurde einerseits der adsorbierte Formaldehyd in die Produkte eingebaut, andererseits konnte das mineralische Trägermaterial die Reaktion selbst katalysieren und es war kein Zusatz eines weiteren Katalysators notwendig. Die Zugabe von Calciumhydroxid führte zwar zur Steigerung des Umsatzes, es wurden jedoch auch mehr Nebenprodukte wie Methanol, Glycolsäure, Glycerin, Milchsäure und Apiose detektiert (Vgl. Abbildung 2-9). Insgesamt wurden jedoch geringe Mengen an Nebenprodukten beobachtet.

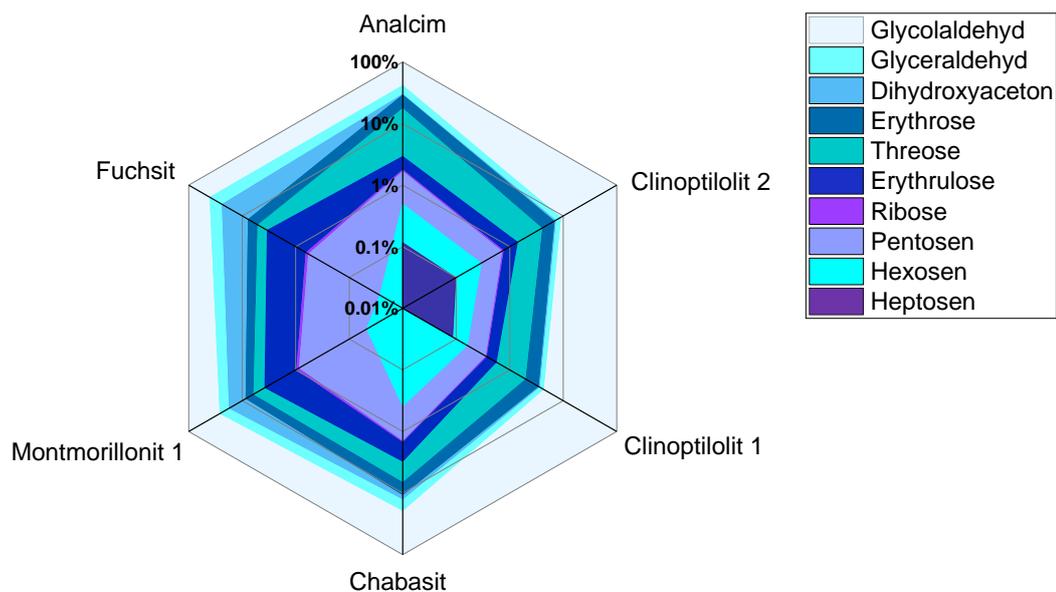


Abbildung 5-19: Produktverteilung der mechanochemischen Reaktion von Glycolaldehyd und auf Mineralien adsorbiertem Formaldehyd. Abbildung angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Der Einbau von Formaldehyd in Zucker in der mineralienkatalysierten, mechanochemischen Reaktion ist somit im präbiotischen Kontext auch plausibel. Formaldehyd aus der Gasphase kann auf Mineralien adsorbieren oder durch Schwefeldioxid als HMS gespeichert werden und im Anschluss bei Vorhandensein von Glycolaldehyd zu Monosacchariden reagieren.

### 5.2.3 Umpolung von Formaldehyd

Bisher konnte zwar ein Einbau von Formaldehyd durch Reaktion mit Glycolaldehyd erreicht werden, der erste Schritt im Formose-Netzwerk, die Umpolung und Dimerisierung von Formaldehyd wurde jedoch nicht erreicht. Um die Dimerisierung zu ermöglichen, sind verschiedene Alternativen in der Literatur bekannt (siehe Kapitel 2.1.6). Eine enolisierbare Carbonylverbindung ebenso wie verschiedene Thiazoliumsalze wurden als Umpolungskatalysator getestet (Abbildung 5-20). Auf Molsieb adsorbierter Formaldehyd wurde zusammen mit dem Katalysator unter Zusatz von Calciumhydroxid als Base in der Planetenmühle vermahlen.

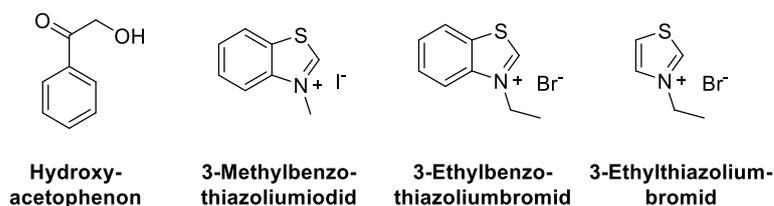
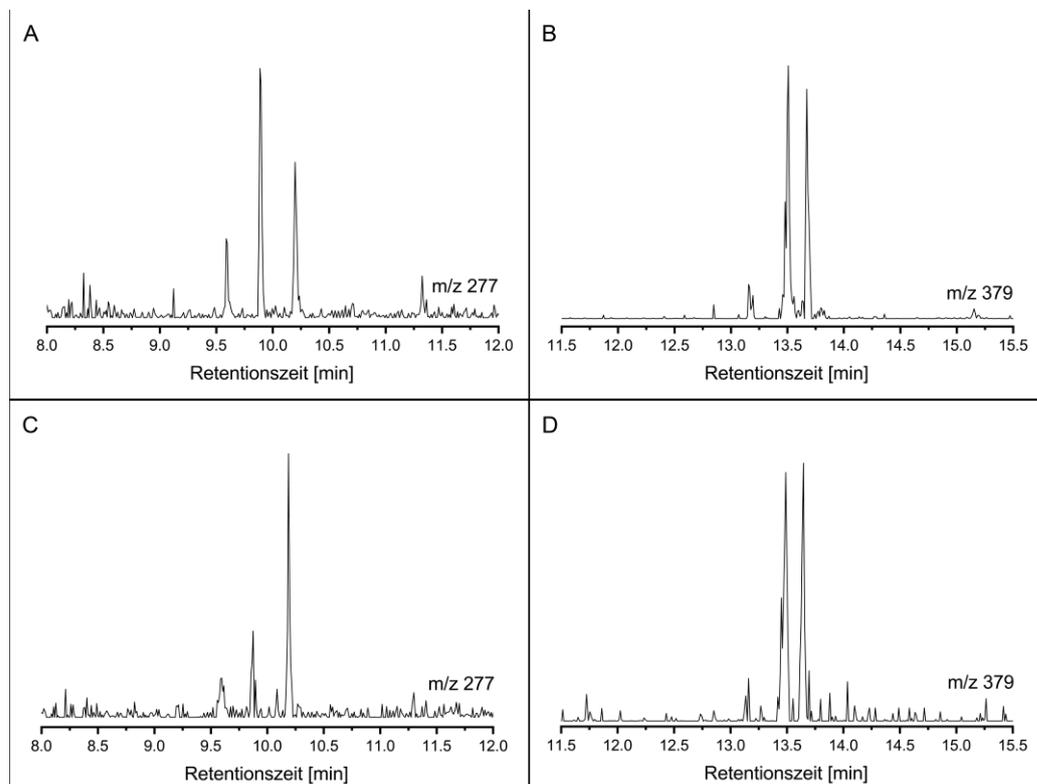


Abbildung 5-20: Getestete Umpolungskatalysatoren für die Formosereaktion.

Für Hydroxyacetophenon, 3-Ethylbenzothiazoliumbromid und 3-Ethylthiazoliumbromid konnten dabei Spuren von Triosen und Tetrosen detektiert werden (Abbildung 5-21). Die Mengen an Monosacchariden waren dabei sehr gering, so dass die extrahierten Ionenchromatogramme zur Identifizierung herangezogen wurden. Eine Umpolung ist demzufolge auch mechanochemisch möglich.



**Abbildung 5-21:** Extrahierte Ionenchromatogramme der EtOx-TMS-derivatisierten Produktmischungen der mechanochemischen Umpolungsreaktion A/B: mit Hydroxyacetophenon, C/D: mit 3-Ethylthiazoliumbromid. A/C: Triosen, B/D: Tetrosen. Abbildung angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Der Mechanismus bei Verwendung des Hydroxyacetophenons beruht auf Aldolreaktionen, bei denen zunächst hauptsächlich das Aldolprodukt des Katalysators mit Formaldehyd gebildet wird. Nach einer weiteren Aldolreaktion mit Formaldehyd und anschließender Retroaldolreaktion kann Glycolaldehyd abgespalten werden. Retroaldolreaktionen finden mechanochemisch jedoch nur geringfügig statt, wodurch die Ausbeute an Zuckern hier sehr niedrig ist. Zusätzlich wurden viele unidentifizierte Nebenprodukte beobachtet. Die Thiazoliumsalze hingegen werden von der Base deprotoniert und greifen dann nukleophil Formaldehyd an. Nach weiterer Formaldehyd-Addition und Verlängerung der Kohlenstoffkette kann dann der Zucker wieder abgespalten werden.<sup>[217]</sup> Matsumoto *et al.* beobachteten für die Reaktion in Wasser nur eine geringe Abhängigkeit der Reaktivität von dem Gegenion der

Thiazoliumsalze, für den Methyl-substituierten Katalysator allerdings einen geringeren Umsatz.<sup>[217]</sup> 3-Methylbenzothiazoliumiodid zeigte im Gegensatz zu den Ethyl-substituierten Salzen in den mechanochemischen Reaktionen keine Aktivität für die Umpolung. Eine Ursache dafür könnte die unterschiedliche Nucleophilie des Katalysators in Abhängigkeit des Substituenten am Stickstoff sein.

Um die photochemische Aktivierung von Formaldehyd in Kombination mit der mechanochemischen Reaktion zu testen, wurde eine Vibrationskugelmühle mit Stahlbecher und Plexiglasdeckel verwendet. Auf Molsieb adsorbierter Formaldehyd wurde eingesetzt und parallel zur Mahlung mit einer Quecksilberdampflampe durch den Deckel belichtet. Dabei wurde die Reaktionszeit aufgrund von der Erwärmung der Apparatur auf 60 min begrenzt. Ohne Zugabe von Calciumhydroxid wurde nur eine Zersetzung zu Kohlenstoffdioxid beobachtet. Bei der Reaktion mit Calciumhydroxid wurde nach EtOx-TMS-Derivatisierung und GC-MS-Analyse ein Produkt detektiert, welches mit keiner der gemessenen Referenzsubstanzen übereinstimmt. Die Retentionszeit von  $t_{\text{ret}} = 7.9$  min lag zwischen derjenigen von Glycolaldehyd/Glycolsäure und denen der Triosen. Dies spricht für ein kleines Molekül mit geringer Kohlenstoffanzahl. Das Massenspektrum zeigte mit  $m/z = 73$  und 147 die charakteristischen Signale silylierter Spezies (Abbildung 5-22), was für das Vorhandensein einer Hydroxyl- oder Carbonsäuregruppe spricht. Das entstandene Produkt konnte jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Außerdem wurden durch underivatisierte GC-TCD-Analyse sowohl die Zersetzung zu Kohlenstoffdioxid als auch die Bildung der Cannizzaro-Produkte Methanol und Ameisensäure beobachtet.

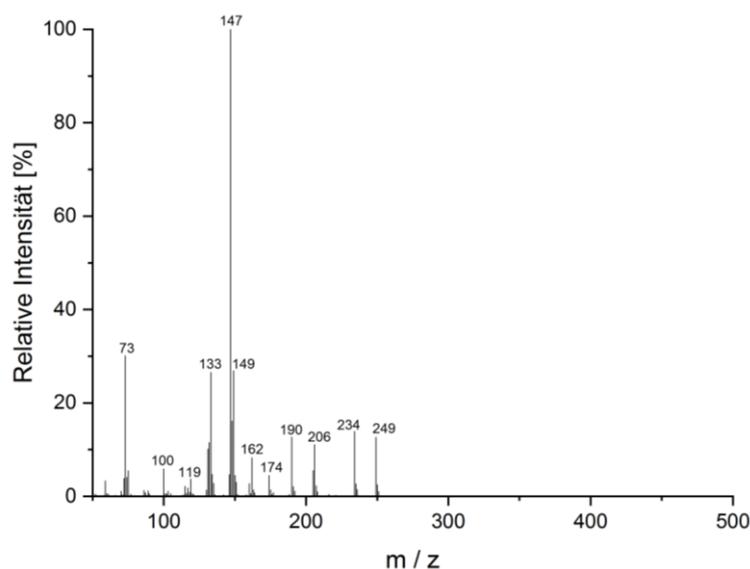


Abbildung 5-22: Massenspektrum des EtOx-TMS-derivatisierten Produkts ( $t_{\text{ret}} = 7.9$  min) der photo-mechanochemischen Reaktion von Formaldehyd und Calciumhydroxid.

Die photochemische Aktivierung bildet folglich keine Option für die mechanochemische Formosereaktion. Anstelle von Zuckern wurden nur Zersetzungs- bzw. ungewünschte Nebenprodukte erhalten. Eine Umpolung kann mechanochemisch jedoch in geringem Maße erfolgen mit geeigneten Katalysatoren wie den Thiazoliumsalzen, möglichen Vorläufern des Vitamins B<sub>1</sub> Thiamin, welches in modernem Metabolismus von Zuckerderivaten eine Rolle spielt.

#### 5.2.4 Stabilität der Zucker unter mechanochemischen Bedingungen

Einer der Hauptkritikpunkte der Formosereaktion ist neben der fehlenden Selektivität die geringe Stabilität der Produkte unter den wässrigen, basischen Bedingungen. Die Zersetzung der Zucker führt bei längeren Reaktionszeiten zur Bildung eines dunklen, unlöslichen Gemisches, welches polymere Strukturen enthält (siehe Kapitel 2.1.6).

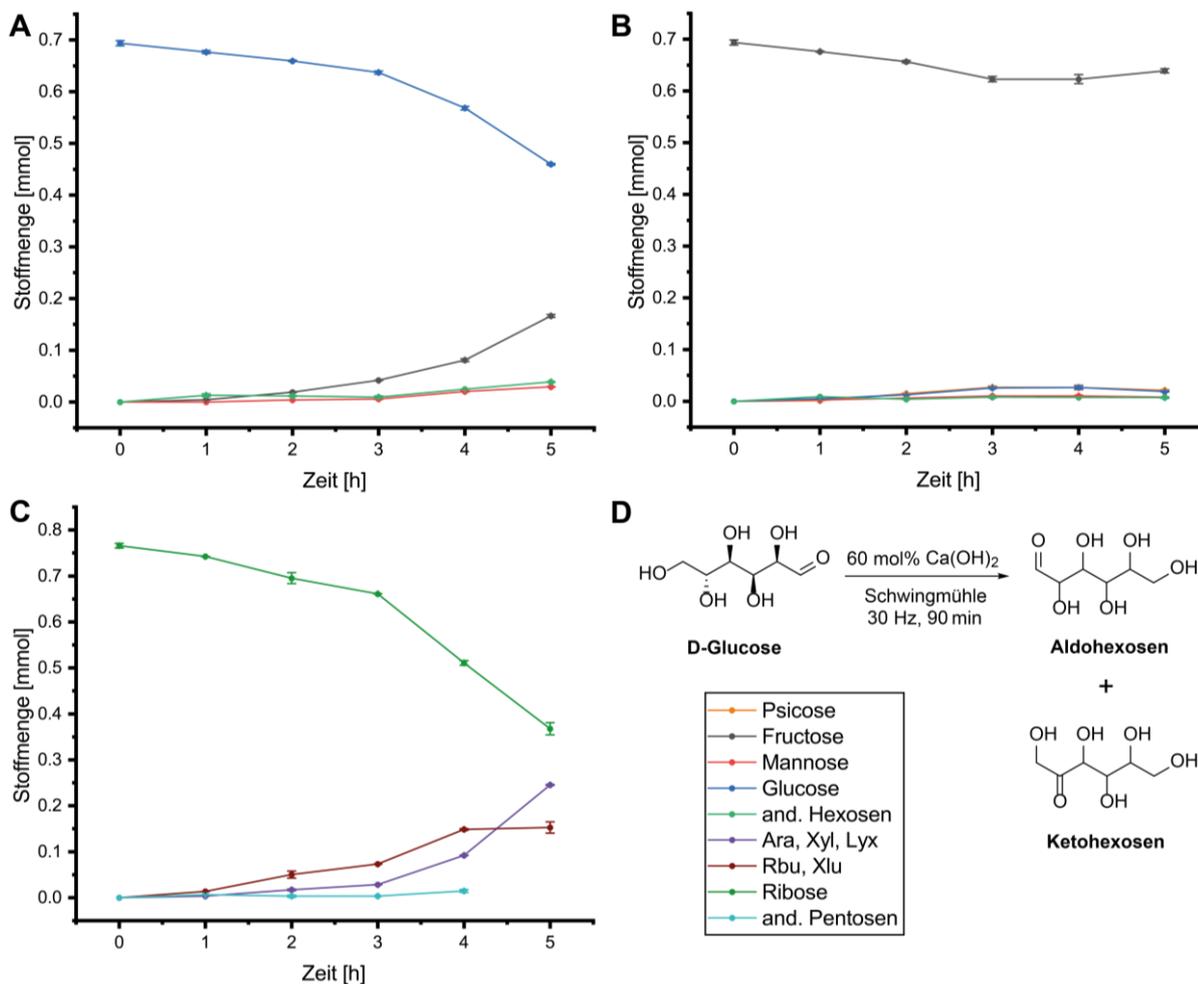


Abbildung 5-23: Untersuchung der Stabilität der Monosaccharide unter Mahlbedingungen (D). Kinetische Verläufe der Isomerisierungen zu anderen Hexosen bzw. Pentosen von A: Glucose, B: Fructose und C: Ribose.

Zur Untersuchung der Stabilität der Produkte unter den Mahlbedingungen wurden jeweils Glucose, Fructose und Ribose mit 60 mol% Calciumhydroxid (20 mol% bezogen auf GA)

gemahlen und der zeitliche Verlauf der Produkte beobachtet (Abbildung 5-23). Dabei wurde nur eine Isomerisierung zu anderen Hexosen bzw. Pentosen beobachtet, jedoch keine Zersetzung. Fructose zeigte am wenigsten Isomerisierung, Glucose isomerisierte vor allem zu Fructose. Ribose wurde erst zu den Ketopentosen und im Anschluss auch zu den anderen Aldopentosen umgewandelt. Jedoch stehen die verschiedenen Isomere miteinander im Gleichgewicht und es wurden innerhalb der untersuchten Reaktionszeit von 5 h keine deutlichen Retroaldolreaktionen oder andere Zersetzungsreaktionen beobachtet, wohingegen in der wässrigen Formosereaktion bereits nach einigen Minuten Zersetzung eintritt.

### 5.2.5 Einfluss der Umgebung

Da die Zusammensetzung und der Oxidationszustand der Atmosphäre der Frühen Erde noch diskutiert werden und es keinen Konsens darüber gibt, wurde die Robustheit des mechanochemischen Systems gegenüber verschiedenen Gasphasen getestet.

Die Reaktion von Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid wurde in der Planetenmühle mit Begasungsdeckeln ausgestatteten Mahlbechern unter Stickstoff, Luft, Kohlenstoffdioxid sowie Methan untersucht. Dabei wurde innerhalb der Fehlergrenzen keine Abweichung der Produktzusammensetzung für Stickstoff, Luft und Methan gefunden (Abbildung 5-24).

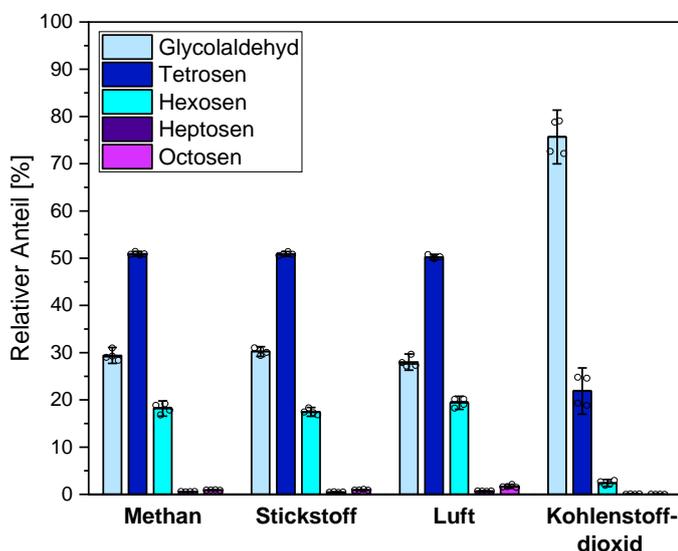


Abbildung 5-24: Produktverteilung in Abhängigkeit der Atmosphäre von der mechanochemischen Aldolreaktion ausgehend von Glycolaldehyd und Calciumhydroxid. Abbildung angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Dies steht im Gegensatz zur wässrigen Formosereaktion, für die eine geringere Produktbildung und ein erhöhter Anteil an (Cannizzaro)-Nebenprodukten bei Vorhandensein von Sauerstoff beschrieben wurde.<sup>[353]</sup> Unter diesen Bedingungen entstehen mechanochemisch neben den

Tetrosen und Hexosen auch Octosen sowie durch geringe Mengen an Retroaldolreaktionen Spuren an Triosen, welche zu Heptosen weiterreagieren. Für die Kohlenstoffdioxid-Gasphase war der Umsatz jedoch niedriger als für die anderen Gase. Dies ist mit der verminderten Basizität und der Bildung von Calciumcarbonat zu begründen. Die Reaktion lieferte zwar geringere Mengen der Zucker, jedoch weiterhin selektiv die Monosaccharide und keine neuen Nebenprodukte. Es können also unabhängig von der Atmosphärenzusammensetzung Monosaccharide mechanochemisch aufgebaut werden. Der negative Einfluss von Sauerstoff bei der wässrigen Formosereaktion wurde nicht für die mechanochemische Variante beobachtet. Bei hohen Anteilen von Kohlenstoffdioxid ist die Synthese jedoch verlangsamt.

Um die Temperaturbelastbarkeit zu testen, wurde die Reaktion ausgehend von Glycolaldehyd und Calciumhydroxid zusätzlich unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff durchgeführt. Dazu wurde nach einer Vorkühlzeit von 15 min die Mahlung jeweils nach 15 min bei 30 Hz durch 5 min intensive Kühlpausen unterbrochen, um die niedrige Temperatur zu gewährleisten. Trotz der geringen Reaktionstemperatur wurden Tetrosen und sogar Spuren von Hexosen gebildet. Somit ist der mechanochemische Zuckeraufbau auch bei sehr niedrigen Temperaturen durchführbar und neben Szenarien für die frühe Erde auch eine Bildung unter extremeren Bedingungen, wie z.B. Meteoriten denkbar.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden wasserfreie, präbiotische Synthesen von Zuckern und Peptiden in komplexen Reaktionsnetzwerken untersucht. Dabei wurde das Ziel verfolgt, Reaktionspfade zu ermöglichen, welche unter wässrigen Bedingungen problematisch sind, sowie alternative Szenarien zum Ursprung des Lebens zu diskutieren.

Im ersten Themengebiet wurde die kupferkatalysierte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid betrachtet. Anhand von Mischungen der proteinogenen Aminosäuren und einzelner Di- und Tripeptide wurden in einem ersten Schritt Analysemethoden für CE-MS und HPLC-MS untersucht. Durch die Verwendung von beschichteten Kapillaren für elektrophoretische Messungen konnten Peptid-Kapillar-Wechselwirkungen unterbunden und damit die Verbreiterung der Signale und Verfälschung der Analyseergebnisse durch Adsorption verhindert werden. Die Beschichtung aus linearem Polyacrylamid lieferte die gewünschte Trennung und Stabilität. Eine erfolgreiche Kopplung mit Orbitrap-MS mit gezielten MS<sup>2</sup>-Experimenten zur Strukturaufklärung wurde realisiert. Zusätzlich wurden verschiedene Trennmodi und stationäre Phasen für die HPLC getestet und mit HILIC-Methoden die besten Trennungen für die Aminosäuren und Dipeptide erhalten. Eine Kopplung mit TOF-MS und die Untersuchung der Fragmentierung konnte ebenfalls zur Strukturaufklärung hinzugezogen werden. Der Vorteil der höheren Stabilität der Kopplung im Vergleich zur CE-MS wurde jedoch durch die extrem variierende Sensitivität gegenüber den verschiedenen Aminosäuren negiert, so dass im Folgenden für die Reaktionsuntersuchung vor allem CE-MS mit der LPA-beschichteten Kapillare verwendet wurde.

Schwefeldioxid aus vulkanischen Emissionen kann schon unter milden Bedingungen verflüssigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich durch die hygroskopischen Eigenschaften eignet, um konzentrierte Salzlösungen der salzinduzierten Peptidbildung zu ersetzen und dass mit Kupfer(II)salzen in Schwefeldioxid aus Aminosäuren kurze Peptide gebildet werden können. Aus Alanin und Glycin konnten so mit Kupfer(II)chlorid in 1 - 21 d Di- bis Tetrapeptide gebildet werden. Die Kondensation konnte dabei mit Harnstoff unterstützt werden. Im Vergleich zur wässrigen, salzinduzierten Reaktion lief die Peptidbildung in Schwefeldioxid bei geringeren Temperaturen und mit niedrigeren Konzentrationen ab. Des Weiteren konnten aus Alanin im Gegensatz zur wässrigen Reaktion auch ohne Zusatz katalytischer Aminosäuren Peptide aufgebaut werden. Die Anwendung der Reaktion auf Mischungen der kanonischen Aminosäuren lieferte Dipeptide aller Aminosäuren. Mithilfe von

MS<sup>2</sup>-Messungen und Fragmentierungsmustern konnten die Strukturen bestätigt sowie die Sequenzen aufgeklärt werden. In Mischungen wurden manche Aminosäuren präferiert in die Peptide eingebaut sowie Sequenzen bevorzugt beobachtet. Dies konnte teilweise durch die Zusammensetzung der Reaktionsmischung beeinflusst werden. Insgesamt wurden mit den unpolaren Aminosäuren mehr Peptide gebildet als mit den polaren, neutralen Aminosäuren und mit den basischen Aminosäuren mehr Peptide als mit den sauren Aminosäuren. Die Ursachen für die Selektivitäten können sowohl in der Löslichkeit in Schwefeldioxid als auch in der Elektrophilie/Nucleophilie der Verbindungen liegen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ein tieferes, mechanistisches Verständnis zu erlangen. Mit Cystein wurde eine Oxidation zu Cystin und die Bildung von Cystin-Peptiden festgestellt, welche durch ihre Disulfidbrücken zum Strukturaufbau beitragen können. Nebenprodukte wie die zyklischen Diketopiperazine wurden nicht beobachtet. Im Vergleich zu vermutlich konservierten, alten Peptidmotiven wurden hohe Übereinstimmungen der Sequenzen erhalten. Dabei wurden nur die sauren Aminosäuren signifikant weniger eingebaut. Mit der Metallsalz-katalysierten Variante in Schwefeldioxid konnte so eine alternative Route zur Peptidkondensation für ein vulkannahes Szenario der Frühen Erde erhalten werden. Durch die milderen Bedingungen und möglichen geringen Konzentrationen hebt sich dieses von den wässrigen SIPF-Reaktionen ab.

Im zweiten Teil wurde die mechanochemische Zuckerbildung untersucht. Um die zu erwartenden Produktgemische der Monosaccharide detailliert analysieren zu können, wurden zunächst gas- und flüssigchromatografische Methoden entwickelt. Flüchtige Reaktionsprodukte wie Methanol und Ameisensäure konnten nativ gaschromatografisch getrennt und mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor analysiert werden. Für die Zucker selbst waren jedoch Derivatisierungsschritte notwendig. Für die HPLC konnte mit der Hyrazonbildung die zuverlässigste Umsetzung erreicht werden und neben den Zuckern auch Formaldehyd detektiert werden. Eine Trennung auch innerhalb derselben Kohlenstoffkettenlänge konnte hingegen mit gaschromatografischen Methoden erhalten werden. Ein zweistufiges Vorgehen war notwendig, um die intramolekulare Ringbildung zu verhindern und damit die Anzahl an Signalen pro Zucker zu reduzieren. Mit der Oximierung und Trimethylsilylierung konnte eine umfangreiche Trennung von Glycolaldehyd bis hin zu Heptosen erzielt werden. Durch den Vergleich verschieden substituierter Oxime konnte außerdem zur Aufklärung von Nebenprodukten beigetragen werden. Eine noch vollständigere Trennung der Aldosen wurde mit der Oximierung und Trifluoracetylierung erhalten. Für beide Methoden wurde durch Referenzsubstanzen die Grundlage zur eindeutigen Identifikation

möglicher Formose-Produkte sowie Nebenprodukte gelegt und durch die Verwendung eines internen Standards und linearer Eichgeraden die Quantifizierung ermöglicht.

Mechanische Energiequellen waren schon auf der Frühen Erde vorhanden, wie beispielsweise Meteoriteneinschläge oder geologische Prozesse darunter Tektonik, Erosion und Diagenese. Durch diese wurde die Aktivierungsenergie für Festphasenreaktionen bereitgestellt. Mit katalytischen Mineralien konnte mechanochemisch eine Zuckerbildung ausgehend von Glycolaldehyd und Formaldehyd entsprechend des Formose-Netzwerks gezeigt werden. Eine Vielzahl an Mineralien verschiedener Klassen, der Hydroxide, Phosphate, Phosphide, Carbonate, Silicate, Glimmer und Zeolithe zeigte katalytische Eigenschaften. Die Reaktivität und Selektivität bezüglich Aldosen/Ketosen oder auch einzelner Diastereomere konnte durch das Mineral und besonders durch die Zusammensetzung der Kationen gesteuert werden. Die Adsorption von Formaldehyd auf Mineralien ist denkbar als ein präbiotisch relevanter Anreicherungsmechanismus und führte bei Vorhandensein von Glycolaldehyd unter mechanischem Einfluss zum Aufbau von Zuckern. Die mechanochemische Dimerisierung von Formaldehyd konnte durch den Einsatz von Thiazoliumsalzen als Umpolungskatalysatoren, welche Vorläufern des Vitamins B<sub>1</sub> Thiamin entsprechen könnten, in Spuren erreicht werden. Die beobachtete niedrige Geschwindigkeit der Retroaldolreaktionen liefert dabei einen möglichen Grund für die geringe Bildungsmenge. Eine photo-mechanochemische Aktivierung von Formaldehyd ergab hingegen keine Monosaccharide. Im Vergleich zur wässrigen Reaktion wurde eine höhere Stabilität der Produkte und stärkere Selektivität zur Bildung der unverzweigten Aldosen und Ketosen beobachtet. Die Reaktion konnte unabhängig der Atmosphärenzusammensetzung und auch bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden. Nur mit einer Kohlenstoffdioxidatmosphäre, vermutlich aufgrund der geringeren Basizität und Bildung von Carbonaten, nahm die Reaktivität leicht ab. Nebenprodukte wurden nur in geringen Mengen beobachtet. Unter den Mahlbedingungen wurden Pentosen und Hexosen isomerisiert, aber nicht abgebaut. Der mechanochemische Aufbau von Monosacchariden stellt durch die Vielzahl an katalytischen Mineralien ein plausibles präbiotisches Szenario dar. Durch die Robustheit und die geringen Neben- und Abbaureaktionen werden die Kritikpunkte des wässrigen Formose-Netzwerks überwunden.

Insgesamt konnten in dieser Dissertation zwei präbiotische Szenarien beschrieben werden, welche Alternativen zu den wässrigen Reaktionsbedingungen bieten und die Probleme der Kondensationsreaktionen und Produktinstabilitäten in wässriger Lösung überwinden. Dazu konnten zunächst analytische Verfahren zur Untersuchung komplexer Reaktionsmischungen

weiterentwickelt werden. Des Weiteren konnten Peptide gebildet sowie Monosaccharide aufgebaut werden und so mögliche abiotische Synthesewege gefunden werden. Mit Schwefeldioxid als Lösungsmittel und der Mechanochemie als lösungsmittelfreie Variante wurden somit neue, plausible Möglichkeiten für präbiotische Reaktionen evaluiert.

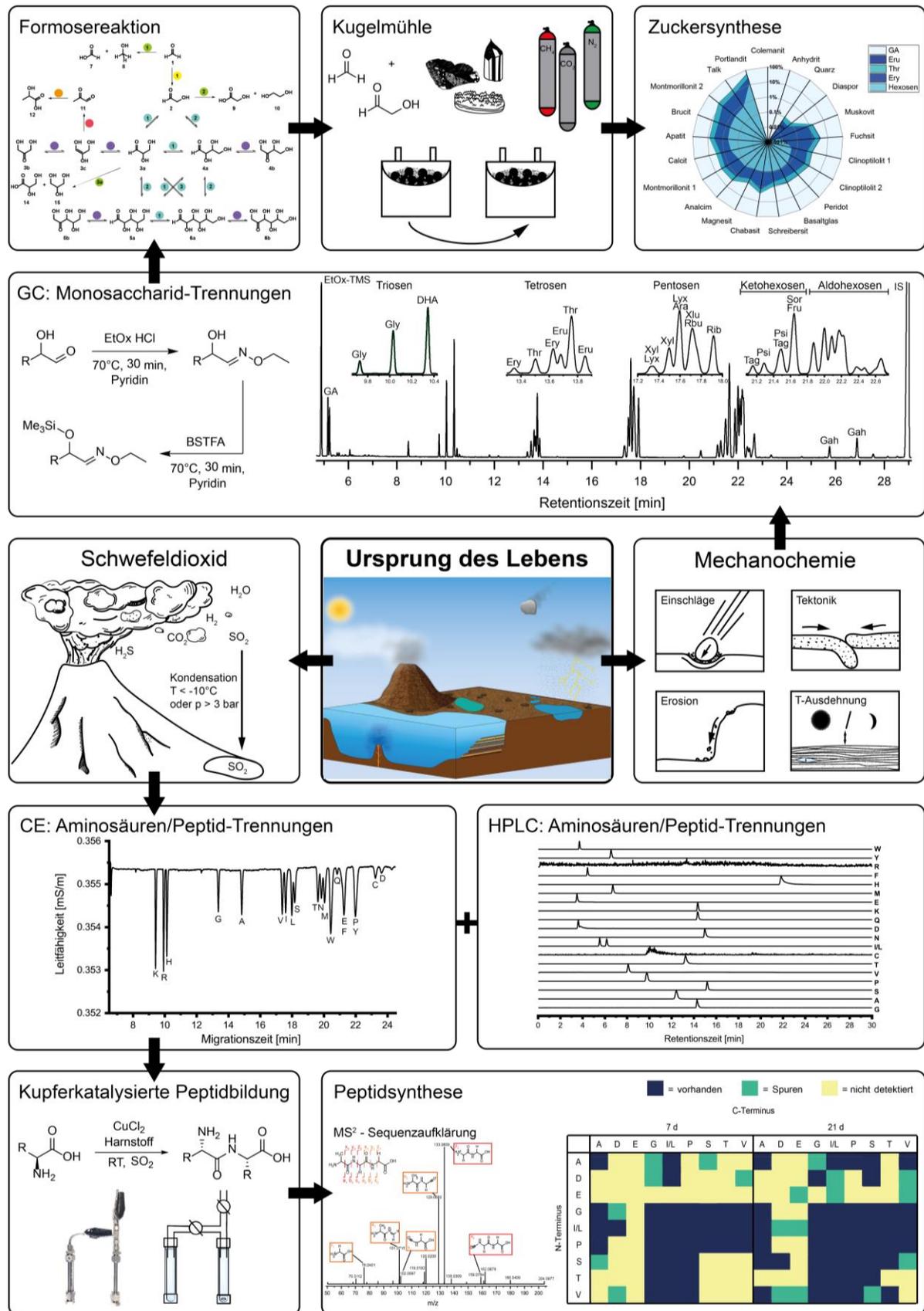


Abbildung 6-1: Graphische Zusammenfassung zur Untersuchung nichtwässriger Reaktionsbedingungen im Kontext des Ursprungs des Lebens: Entwicklung von Trennmethode zur Analyse komplexer Monosaccharid- sowie Aminosäuren- & Peptidmischungen; Mineralienkatalysierte, mechanochemische Formosereaktion; Kupferkatalysierte Peptidkupplung in flüssigem Schwefeldioxid. Individuelle Darstellungen angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>,<sup>[212]</sup> Copyright durch die

Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY und nach M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>,<sup>[347]</sup> Copyright durch Elsevier B. V.

## 7 Experimentalteil

### 7.1 Allgemeines

Im Rahmen der Forschungsprojekte wurden Teile dieser Arbeit in Zusammenarbeit durchgeführt. Die Derivatisierung und Analytik von Monosacchariden wurde gemeinsam mit Dr. Saskia Lamour erarbeitet.<sup>[232, 347]</sup> Unter meiner Anleitung untersuchten Jacob Lucian Gorenflos López und Leonie von Brunn im Rahmen von Forschungspraktika die Oxim-Derivatisierung von Monosacchariden, sowie Sarah Babette Christ im Rahmen einer Bachelorarbeit die mechanochemische Zuckersynthese.

Das CE-MS-Interface wurde von Prof. Dr. Oliver Trapp, Fabian Sauer und Constanze Sydow entwickelt und getestet.<sup>[354]</sup> Die Trennung der Peptide *via* CE-MS wurde in Zusammenarbeit mit Fabian Sauer entwickelt. Filip Jukic untersuchte ebenfalls unter Anleitung im Rahmen eines Forschungspraktikums die Trennung der Peptide mittels CE- sowie HPLC-MS.

#### 7.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Falls nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von kommerziellen Anbietern (Sigma Aldrich, ABCR, Acros Organics, TCI Chemicals, Alfa Aesar, Carbosynth) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Mineralien wurden von Seltene Mineralien Gunnar Färber (Samswegen), Mineralien - und Fossilienhandel Dipl. Geologe Alexander Spinn (Erlangen) oder Lukas Belohlavek (AK Scheu, Department für Geo- und Umweltwissenschaften, Sektion Mineralogie, Petrologie und Geochemie, LMU München) erhalten. Die Zusammensetzung der Mineralien wurde mittels Elementaranalyse oder REM-EDX-Messungen bestätigt. Eine Übersicht über Bezugsquellen und Fund- bzw. Abbauort der verwendeten Mineralien findet sich im Anhang (Tabelle 8-4).

Lösungsmittel für chromatographische Zwecke wurden in HPLC grade oder HPLC-MS grade verwendet. Wasser wurde mit einem VWR Puranity PU 15 Gerät deionisiert.

Reaktionen in Schwefeldioxid wurden unter Ausschluss von Luft und Feuchtigkeit unter Stickstoff und unter Verwendung von Standard Schlenk-Techniken durchgeführt. Es wurde Schwefeldioxid N38 (99.98%) von Air Liquide Deutschland verwendet.

### 7.1.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

HPLC-Messungen wurden an Agilent Technologies 1290/1260 Infinity Geräten mit DAD oder RID aufgenommen. Gekoppelte Massenspektren wurden mit einem Agilent Technologies 6120 Quadrupole LC/MS Gerät mit ESI-Quelle gemessen. Hochauflösende Messungen wurden an einem Agilent 1260 Infinity II SFC-uHPLC-Hybrid-System gekoppelt mit einem 6550 iFunnel-Q-TOF Massenspektrometer mit ESI-Quelle durchgeführt. Dabei wurde als interne Referenz eine Mischung aus Purin, Ammoniumtrifluoroacetat und Hexakis(1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropropoxy)phosphazine in Acetonitril/Wasser (95:5) verwendet. Alle Geräte wurden mit einem Autosampler betrieben. HPLC-Säulen wurden von Daicel Chiral Technologies, Macherey-Nagel, ThermoFisher Scientific oder Merck Millipore erworben.

### 7.1.3 Gaschromatographie

Gaschromatographische Messungen wurden mit Thermo Trace GC Ultra mit FID und einem Thermo Polaris Q oder Thermo ISQ Massenspektrometer mit EI-Quelle aufgenommen. Zusätzlich wurde eine Thermo GC Trace 1310 mit FID und Wärmeleitfähigkeitsdetektor verwendet. Alle Geräte wurden mit einem Autosampler betrieben. GC-Säulen wurden entweder kommerziell erworben (Optima 5-MS Macherey-Nagel, HP-1 / HP-5MS, CP-Sil 5 CB Agilent Technologies; TraceGOLD TG-225MS ThermoFisher Scientific) oder durch Belegung von Quarzglas kapillaren (*bare fused silica*, MicroQuartz München) mit Polymeren anhand der statischen Methode nach K. Grob erhalten.<sup>[355]</sup>

Hochauflösende Spektren wurden durch die massenspektrometrische Abteilung der Fakultät Chemie der LMU München an einer Thermo Trace 1300 GC gekoppelt mit einem Thermo Q Exactive Orbitrap Massenspektrometer auf einer Optima 5-MS Säule (Macherey-Nagel, Düren) (30 m x 0.25 mm ID x 0.25  $\mu$ m FT) gemessen.

### 7.1.4 Kapillarelektrophorese

Ein Agilent Technologies 3D CE 1600 oder ein Agilent Technologies 7100 wurde für Kapillarelektrophorese verwendet. Trennungen wurden mit Quarzglas kapillaren (ID 50  $\mu$ m, OD 360  $\mu$ m, MicroQuartz München) oder beschichteten Kapillaren (Polyvinylalkohol Agilent Technologies; lineares Polyamid s.u.) verwendet. Detektion erfolgte mittels eines Leitfähigkeitsdetektors (Detektorposition ca. 14.5 cm vor dem Kapillarauslass) oder einer Kopplung zu einem ThermoScientific® Q-Exactive plus Massenspektrometer durch eine spezialangefertigte ESI-Quelle. Eine externe Spannung von 3.2 kV wurde an der Sprayspitze der ESI-Quelle angelegt. Eine *sheath* Flüssigkeit bestehend aus 0.5  $\mu$ L min<sup>-1</sup> *iso*-Propanol/

Wasser/Ameisensäure (50:50 + 0.05%) wurde durch eine Agilent 1260 Iso Pumpe mit 1:100 Splitter zugeführt.

### 7.1.5 Kugelmühlen

Für mechanochemische Reaktionen standen folgende Kugelmühlen zur Verfügung: Soweit nicht anders angegeben wurde eine Schwingmühle mit optionaler Kühlung mit flüssigem Stickstoff, die CryoMill (Retsch GmbH, Haan), welche mit einem Adapter für bis zu vier 5 mL Edelstahl-Mahlbecher mit jeweils einer 7 mm Edelstahl-Kugel betrieben wurde, verwendet. Für Reaktionen unter Schutzatmosphäre wurde die Planetenkugelmühle Pulverisette 7 premium line (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) mit zwei 20 mL Edelstahl-Mahlbechern ausgestattet mit Swagelok Begasungsdeckeln und mit zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln verwendet. Für die Photomechanochemie wurde eine Vibrationskugelmühle Pulverisette 0 (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) mit einem Mahlbecher aus gehärtetem Stahl und einer 50 mm Stahlkugel und einem Plexiglasdeckel verwendet.

### 7.1.6 Elementaranalyse

Zur Elementaranalyse wurden durch den Zentralen Analytikservice des Departments Chemie der LMU München, Frau Jaroslava Obel, ICP-OES Messungen an einem Varian Vista RL Gerät durchgeführt. Die mineralischen Proben wurden dazu mittels  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3/\text{HF}$  oder  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aufgeschlossen.

REM-EDX Messungen wurden von Christian Minke (AK Schnick, LMU München) auf einem Messing-Träger an einem FEI Helios G3 UC Gerät durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit Graphit (10 nm) beschichtet.

### 7.1.7 Kleingeräte

Die Temperaturkontrolle der mechanochemischen Reaktionen wurde mit Hilfe des Infrarot-Thermometers VOLTcraft IR 260-8S (Conrad Electronic, Hirschau) durchgeführt.

Für die Derivatisierung wurde als Vortexer der VWR lab dancer verwendet. Die Proben wurden in einem Heizblock AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International Inc., Cary, USA) und mit der Schüttelplatte StandardAnalog Shaker (VWR International, Radnor, USA) erhitzt und durchmischt.

Die Zentrifuge EBA 20 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) wurde für die Zentrifugation der Proben mit Einsätzen für Eppendorf-Gefäße verwendet.

## 7.2 Kupferkatalysierte Peptidbildung in SO<sub>2</sub>

### 7.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

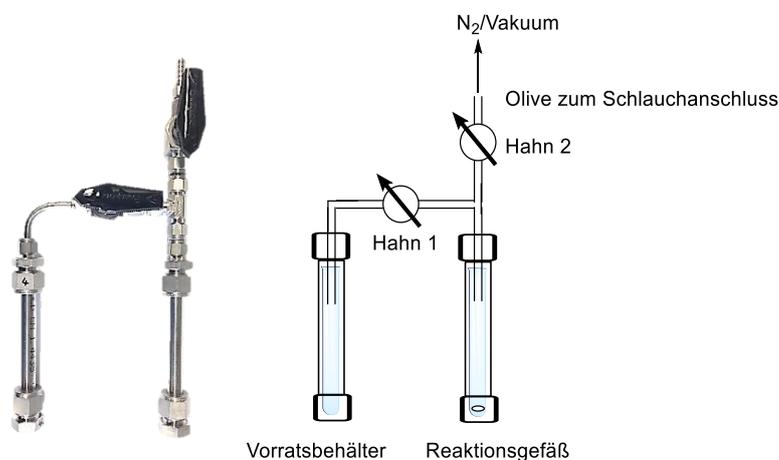
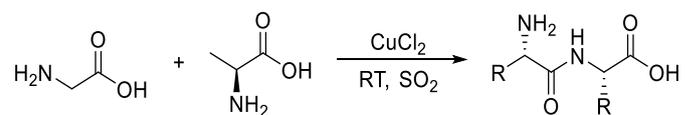


Abbildung 7-1: Aufbau und Schema der Swagelok-Druckapparaturen zur Synthese in flüssigem Schwefeldioxid.

Für die Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid wurden spezialangefertigte Swagelok-Druckapparaturen verwendet. Diese Edelstahl-Vorrichtungen enthielten einen abgetrennten Vorratsbehälter, sowie ein Reaktionsgefäß welche beide mit Reagenzgläsern ausgestattet waren. Über einen Hahn war eine Verbindung zu Vakuum/Stickstoff möglich. Die Menge an Schwefeldioxid wurde aus der Differenz des Leergewichts und des Gewichts mit gefülltem Vorratsbehälter bestimmt und betrug 1 - 3.5 mL. Die Reaktanden wurden in einem Reagenzglas vorgelegt, in die Druckapparaturen eingebaut und das Reaktionsgefäß wurde dreifach evakuiert und mit Stickstoff gespült. Das Reaktionsgefäß wurde mit Trockeneis gekühlt und das Schwefeldioxid aus dem Vorratsbehälter durch Öffnen des Hahns einkondensiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Schwefeldioxid wieder in den Vorratsbehälter kondensiert und das Reaktionsgefäß dreifach evakuiert. Das Schwefeldioxid wurde für bis zu fünf Reaktionen wiederverwendet. Das Reagenzglas wurde entnommen und die Proben bis zur Analyse bei -18°C gelagert. Die Analyse der Produkte erfolgte mittels CE-MS und HPLC-MS nach Kupferentfernung. Dazu wurden die Proben in bidest. Wasser mit einer Konzentration von 1 mmol/L je Aminosäure gelöst.

### 7.2.2 Peptidbildung aus Glycin und Alanin



Glycin (90.1 mg, 1.20 mmol, 1.0 Äq.), Alanin (106.9 mg, 1.20 mmol, 1.0 Äq.) und Kupfer(II)chlorid (161.3 mg, 1.20 mmol, 1.0 Äq.) wurden im Reagenzglas vorgelegt. Je nach

Ansatz wurde zusätzlich Harnstoff (72.1 mg, 1.20 mmol, 1.0 Äq.) oder Natriumchlorid (701 mg, 12.0 mmol, 10 Äq.) zugegeben. Nach dreifachem Evakuieren wurden 3 mL Schwefeldioxid einkondensiert und bei Raumtemperatur für 1-21 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

### 7.2.3 Herstellung der Aminosäuremischungen

Die Aminosäuren wurden in äquimolaren Mengen zusammengegeben und durch eine Mahlung in der Planetenkugelmühle in 20 mL Edelstahl-Mahlbechern mit zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln bei 400 rpm für 10 min homogenisiert.

**Gesamt Mischung:** L-Alanin (115.8 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Arginin (226.5 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Asparagin (171.8 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Asparaginsäure (173.0 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Cystein (157.5 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Glutamin (190.0 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Glutaminsäure (191.3 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), Glycin (97.6 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Histidin (201.7 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Isoleucin (170.5 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Leucin (170.5 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Lysin (190.0 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Methionin (194.0 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Phenylalanin (214.7 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Prolin (149.7 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Serin (136.6 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Threonin (154.9 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Tryptophan (266.8 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.), L-Tyrosin (235.5 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.) und L-Valin (152.3 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.).

**Unpolare Mischung:** L-Alanin (267.3 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), Glycin (225.2 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Isoleucin (393.5 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Leucin (393.5 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Methionin (447.6 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Phenylalanin (495.6 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Prolin (345.4 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Tryptophan (615.7 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.) und L-Valin (351.4 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.).

**Polare, neutrale Mischung:** L-Asparagin (528.5 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Cystein (484.6 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Glutamin (584.6 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.), Glycin (300.3 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Serin (420.4 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Threonin (476.5 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.) und L-Tyrosin (724.8 mg, 4.0 mmol, 1.0 Äq.).

**Basische Mischung:** L-Arginin (1306.5 mg, 7.5 mmol, 1.0 Äq.), L-Histidin (1163.7 mg, 7.5 mmol, 1.0 Äq.) und L-Lysin (1096.4 mg, 7.5 mmol, 1.0 Äq.).

**Saure Mischung:** L-Asparaginsäure (1663.8 mg, 12.5 mmol, 1.0 Äq.) und L-Glutaminsäure (1839.1 mg, 12.5 mmol, 1.0 Äq.).

**Präbiotische Mischung:** L-Alanin (267.3 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Asparaginsäure (399.3 mg, 3 mmol, 1.0 Äq.) und L-Glutaminsäure (441.4 mg, 3 mmol, 1.0 Äq.) Glycin (225.2 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Isoleucin (393.5 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Leucin (393.5mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Prolin (345.4 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Serin (315.3 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.), L-Threonin (357.4 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.) und L-Valin (351.4 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.).

#### 7.2.4 Peptidbildung komplexer Mischungen



Die jeweilige Aminosäurenmischung (1.2 mmol, 1.0 Äq.), Harnstoff (60.1 mg, 1.2 mmol, 1.0 Äq.) und Kupfer(II)chlorid (1/n Äq.) wurden im Reagenzglas vorgelegt. Nach dreifachem Evakuieren wurden 3 mL Schwefeldioxid einkondensiert und bei Raumtemperatur für 7 d oder 21 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

## 7.3 Analyse der Peptidmischungen

### 7.3.1 Belegen der CE-Kapillaren

**PVA:** Die Polyvinylalkohol-Beschichtung der Kapillaren erfolgte in Anlehnung an die Methode von Belder *et al.*<sup>[264]</sup> Es wurde eine Lösung aus 200  $\mu\text{L}$  Glutaraldehyd (50 Gew.% in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 300  $\mu\text{L}$  verdünnter Salzsäure (1:10 konz. Salzsäure/bidest. Wasser) hergestellt und durch einen Spritzenfilter (Celluloseacetat) filtriert. Des Weiteren wurde 50 mg Polyvinylalkohol (MW 31000-50000, 98-99% hydrolysiert oder MW 89000-98000, 99+% hydrolysiert) unter Erwärmen in 950  $\mu\text{L}$  bidest. Wasser gelöst. 450  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden mit 50  $\mu\text{L}$  verdünnter Salzsäure (1:1 konz. Salzsäure/bidest. Wasser) angesäuert und ebenfalls durch einen Spritzenfilter (Celluloseacetat) filtriert. Anschließend wurde eine unbeschichtete *bare fused silica* Kapillare (ID = 0.05 mm, MicroQuartz, München) unter Anlegen von 1 bzw. 5 bar Stickstoffstrom zuerst mit der Glutaraldehyd-Lösung gespült, im Anschluss eine geringe Menge der Polyvinylalkohol-Lösung eingespült und dann im Stickstoffstrom die Lösung durch die Kapillare gespült und die Kapillare für 10 min getrocknet. Die Kapillare wurde im Ofen eines Thermo Focus GC bei 40°C (1 min) mit 6°C/min bis 160°C (5 h) unter 25 kPa Stickstoff ausgeheizt.

**LPA (automatisiert):** Die Polyacrylamid-Beschichtung der Kapillaren erfolgte in Anlehnung an die Methode von Beneito-Cambra *et al.*<sup>[267]</sup> Eine unbeschichtete *bare fused silica* Kapillare (ID = 0.05 mm, MicroQuartz, München) wurde in der Agilent 7100 CE Apparatur unter Anlegen von 1 bar Stickstoffstrom mehrfach gespült (1. 10 min, Aceton; 2. 30 min, 1 mol/L  $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ ; 3. 10 min, 0.1 mol/L  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ ; 4. 10 min, bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ ). Anschließend wurde zur Vorbehandlung die Kapillare mit einer Lösung aus 0.6 Vol.%  $\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan ( $\gamma$ -MAPS) und 0.5 Vol.% Essigsäure in Dichlormethan 4 min gespült und bei 25°C 50 min stehen gelassen. Anschließend wurde erneut gespült (1. 10 min, MeOH; 2. 10 min, bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ ). Die Polymerisationslösung bestand aus 15 mg/mL Acrylamid, 1 mg/mL Ammoniumpersulfat (APS) und 0.1 Vol.% *N, N, N', N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) in Dichlormethan. Diese wurde 4 min in die Kapillare gespült, anschließend bei 25°C 1 h stehen gelassen und mit bidest. Wasser für 10 min gespült. Die Kapillare wurde im Ofen eines Thermo Focus GC bei 100°C unter 20 kPa Stickstoff ausgeheizt.

**LPA (manuell):** Die Polyacrylamid-Beschichtung der Kapillaren erfolgte in Anlehnung an die Methode von Zhang *et al.*<sup>[268]</sup> Eine unbeschichtete *bare fused silica* Kapillare (ID = 0.05 mm, MicroQuartz, München) wurde zunächst in einem Ofen eines Thermo Focus GC bei 200°C unter 30 kPa Stickstoff für 10 h ausgeheizt und anschließend unter Anlegen von 5 bar Stickstoff

mehrfach gespült (1. 2 h, 0.1 mol/L NaOH<sub>(aq)</sub>; 2. 15 min, bidest. H<sub>2</sub>O; 3. 24 h, 0.1 mol/L HCl<sub>(aq)</sub>; 4. 1 h, bidest. H<sub>2</sub>O; 5. 6 h, N<sub>2</sub> Trocknen). Anschließend wurde zur Vorbehandlung eine Lösung aus 200 µL  $\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan ( $\gamma$ -MAPS) in 200 µL Methanol in die Kapillare gefüllt, die Enden der Kapillare mit Silikon verschlossen und bei 45°C 16 h stehen gelassen. Anschließend wurde erneut gespült (1. 1 h, MeOH; 2. 1 h, bidest. H<sub>2</sub>O; 3. 1 h, N<sub>2</sub> Trocknen). Zur Polymerisation wurden 120 mg Acrylamid in 3 mL bidest. Wasser gelöst und 12 µL einer Lösung von 5 mg Ammoniumpersulfat (APS) in 100 µL bidest. Wasser zugegeben. Die Lösung wurde mit einem Vortexmischer vermischt und im Stickstoffstrom 10 min entgast. Die Kapillare wurde mit der Polymerisationslösung gefüllt, die Enden mit Silikon verschlossen und 30 min bei 50°C erwärmt. Anschließend wurde 1 h mit bidest. Wasser gespült, und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Kapillare wurde im Ofen eines Thermo Focus GC bei 100°C unter 30 kPa Stickstoff ausgeheizt.

### 7.3.2 Herstellung der Analytik-Testmischung

Es wurden Stammlösungen der einzelnen Aminosäuren und Peptide in bidest. Wasser angesetzt und bei 5°C aufbewahrt. Aus diesen wurde entsprechend Tabelle 7-1 eine Testmischung in bidest. Wasser zur Evaluation der Trenn- und Analysemethoden hergestellt und ebenfalls bei 5°C aufbewahrt und für bis zu vier Wochen verwendet.

Tabelle 7-1: Zusammensetzung der Testmischung einiger Aminosäuren und Peptide zur Evaluation der Trenn- und Analysemethoden.

Komponente	cStammlösung [mM]	cTestmischung [ $\mu$ M]	Volumen [ $\mu$ L]
<b>R</b>	20	50	50
<b>H</b>	20	250	250
<b>GA</b>	20	50	50
<b>AA</b>	10	0.5	1
<b>GGG</b>	10	1	2
<b>AGG</b>	20	50	50
<b>W</b>	20	250	250
<b>bidest. Wasser</b>	-	-	19347

### 7.3.3 CE-Trennung der Aminosäuren und Peptide

Die CE-Trennung der Mischungen aus Aminosäuren und Peptide erfolgte durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE). Die Detektion erfolgte mittels Leitfähigkeit. Es wurden verschiedene Kapillaren und Trennmethoden getestet. Diese wurden im Vorhinein mithilfe der Peakmaster 5.3 Complex Software berechnet und optimiert.<sup>[356]</sup>

**BFS:** Eine *bare fused silica* Kapillare ( $L = 80$  cm,  $ID = 50$   $\mu\text{m}$ ) wurde zur Trennung bei  $25^\circ\text{C}$  verwendet. Als Hintergrundelektrolyt (BGE) wurde  $2$  mol/L Essigsäure verwendet. Injektion erfolgte mit  $30$  mbar für  $10$  s. Zur Trennung wurden  $30$  kV Spannung angelegt. Die Kapillare wurde vor Beginn konditioniert mit bidest. Wasser ( $5$  min),  $0.1$  mol/L  $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$  ( $5$  min), Wasser ( $5$  min) und BGE ( $5$  min). Zwischen den Messungen wurde mit BGE ( $2$  min) gespült.

**PVA:** Eine mit Polyvinylalkohol beschichtete Kapillare (Agilent,  $L = 77$  cm,  $ID = 50$   $\mu\text{m}$ ) wurde zur Trennung bei  $25^\circ\text{C}$  verwendet. Als Hintergrundelektrolyt (BGE) wurde  $1$  mol/L Essigsäure oder  $150$  mmol/L Ameisensäure verwendet. Injektion erfolgte mit  $30$  mbar für  $10$  s. Zur Trennung wurden  $30$  kV Spannung und  $10$ - $30$  mbar Druck angelegt. Die Kapillare wurde vor Beginn konditioniert mit bidest. Wasser ( $5$  min),  $10$  mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{aq})}$  ( $5$  min), Wasser ( $5$  min) und BGE ( $5$  min). Zwischen den Messungen wurde mit BGE ( $2$  min) gespült.

**LPA:** Eine mit linearem Polyacrylamid beschichtete Kapillare ( $L = 80$  cm,  $ID = 50$   $\mu\text{m}$ ) wurde zur Trennung bei  $25^\circ\text{C}$  verwendet. Als Hintergrundelektrolyt (BGE) wurde  $2$  mol/L Essigsäure verwendet. Injektion erfolgte mit  $30$  mbar für  $10$  s. Zur Trennung wurden  $30$  kV Spannung angelegt und ein Druck von  $30$  mbar. Die Kapillare wurde vor Beginn konditioniert mit bidest. Wasser ( $5$  min),  $10$  mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{aq})}$  ( $5$  min), Wasser ( $5$  min) und BGE ( $5$  min). Zwischen den Messungen wurde mit BGE ( $3$  min) gespült.

### 7.3.4 CE-MS Analyse der Aminosäuren und Peptide

Für die Kopplung zum Massenspektrometer wurde eine spezialangefertigte ESI-Quelle mit Edelstahl-Sprayspitze ( $L = 3.5$  cm,  $OD = 1/16$  in,  $ID = 0.5$  mm) verwendet. Eine externe Spannung von  $3.2$  kV wurde an der Sprayspitze der ESI-Quelle angelegt. Eine *sheath* Flüssigkeit bestehend aus  $0.5$   $\mu\text{L min}^{-1}$  *iso*-Propanol/Wasser/Ameisensäure ( $50:50 + 0.05\%$ ) wurde zugeführt. Massenspektren wurde im positiven Modus bei einer Kapillarentemperatur von  $140^\circ\text{C}$ , Stickstoff Sweep Gas 1 und einer Auflösung von  $70\,000$  im Massenbereich  $m/z$   $74 - 750$  oder  $129 - 750$  gemessen. Für  $\text{MS}^2$ -Messungen wurden Inklusionslisten der Peptide verwendet, mit einer Auflösung von  $17\,500$  gemessen und mit einer normalisierten Kollisionsenergie von  $\text{NCE} = 30\%$  fragmentiert. Je nach Kapillare, wurde die entsprechende der oben beschriebenen Methoden zur Elektrophorese verwendet. Um keine Kupferionen in das Massenspektrometer einzubringen, wurde entweder die Kopplung erst nach der Retentionszeit dieser hinzugeschaltet oder die Probe zuvor mit dem Ionentauscher Amberlite IRC 748 behandelt (7.3.6).

### 7.3.5 Auswertung der CE-MS-Daten

Mit der Thermo Xcalibur Software 4.1 wurden manuell die exakten Massen der Peptide mit einer maximalen Abweichung von 5 ppm extrahiert. Mit einer eindeutigen Signalform, einer Intensität von mind.  $1 \times 10^5$  (Spuren) bzw.  $1 \times 10^6$  und den aufgenommenen MS<sup>2</sup>-Spektren und der Fragmentierung wurden die Peptide identifiziert.

### 7.3.6 Entfernung von Kupfer

Der Ionentauscher Amberlite IRC-748 (Partikelgröße 0.5-0.65 mm, Na<sup>+</sup> Form) mit bidest. Wasser gewaschen, mit 2 mol/L Salzsäure in die H<sup>+</sup> Form überführt und anschließend wieder mit bidest. Wasser gewaschen bis ein neutraler pH erreicht wurde. Entweder 17 mg Aminosäurengesamt Mischung und 2.2 mg Kupfer(II)chlorid-Dihydrat in 10 mL bidest. Wasser oder für die Reaktionsmischungen 10 mL wässrige Probenlösung, die etwa 2 mg CuCl<sub>2</sub> enthielt, wurde mit 30 mg des Ionentauschers über Nacht gerührt. Der Ionentauscher wurde durch 30 mg neuen Ionentauscher ersetzt und erneut über Nacht gerührt. Die Probe wurde filtriert und ggf. zur Analyse mit bidest. Wasser verdünnt.

### 7.3.7 HPLC-MS-Analyse der Aminosäuren und Peptide

Die HPLC-MS-Analyse der Mischungen aus Aminosäuren und Peptiden erfolgte an einem Agilent 1260 Infinity II SFC-uHPLC-Hybrid-System gekoppelt mit einem 6550 iFunnel-Q-TOF Massenspektrometer mit ESI-Quelle und interner Referenz. Massenspektren wurden im positiven Modus aufgenommen im Bereich von  $m/z$  70 - 1700 und bei einer Fragmentorspannung von 120 V. Es wurden verschiedene stationäre Phasen und Trennbedingungen getestet und jeweils 1  $\mu$ L Probenvolumen injiziert.

**HILIC:** Eine Marcherey-Nagel EC 50/2 Nucleodur HILIC (2x50 mm, 1.8  $\mu$ m) Säule wurde bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und einem Fluss von 0.8 mL/min zur Trennung verwendet. Als Laufmittel wurden A: Bidest. Wasser / 200 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>2(aq)</sub> (90:10) und B: ACN / 200 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>2(aq)</sub> mit dem Gradienten 100-80% B (0-15 min) verwendet.

**C18:** Eine Thermo Acclaim RSLC 120 C18 (2.1x100 mm, 2.2  $\mu$ m) Säule wurde bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und einem Fluss von 0.5 mL/min zur Trennung verwendet. Als Laufmittel wurden A: Bidest. Wasser / 0.1% Ameisensäure und B: ACN / 0.1% Ameisensäure mit dem Gradienten 0-40% B (0-20 min) verwendet. Alternativ wurde A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub> und B: ACN / 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub> (90:10) mit dem Gradienten 0-20% B (0-20 min) verwendet.

**ZWIX:** Eine Daicel Chiralpak ZWIX (+) (3x150 mm, 3  $\mu$ m) Säule wurde bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und einem Fluss von 0.5 mL/min zur Trennung verwendet. Als Laufmittel wurde entweder MeOH /

bidest. Wasser (98:2) mit 25 mmol/L Ameisensäure + 25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  oder MeOH / ACN / bidest. Wasser (49:49:2) mit 25 mmol/L Ameisensäure + 25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  verwendet.

**PTZ:** Eine Daicel DCpak PTZ (4.6x150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) Säule wurde bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und einem Fluss von 0.9 mL/min zur Trennung verwendet. Als Laufmittel wurden A: 20 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}_{(\text{aq})}$  und B: ACN mit einem Gradienten von 70% B (0-10 min), 70-0% B (10-25 min), 0% B (25-35 min) verwendet. Die Injektionsmenge der Referenzen betrug 1  $\mu\text{L}$  und der Proben 10  $\mu\text{L}$ . Für  $\text{MS}^2$  Spektren wurde eine Inklusionsliste der Peptide verwendet, der Messbereich auf  $m/z$  50 - 1500 erweitert und für die kollisionsinduzierte Dissoziation eine Energie von 15 eV gewählt.

Die Auswertung der HPLC-MS Daten erfolgte mit der Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 Software. Ionenchromatogramme wurden mit einer maximalen, symmetrischen Abweichung von 20 ppm extrahiert. Die Zuordnung der Alanin- und Glycin-enthaltenden Peptide erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen sowie der beobachteten Fragmentierung in den  $\text{MS}^2$ -Spektren (Chromatogramme und Spektren siehe Anhang 8.1).

## 7.4 Mechanochemische Zuckersynthese

### 7.4.1 Herstellung von adsorbiertem, monomerem Formaldehyd

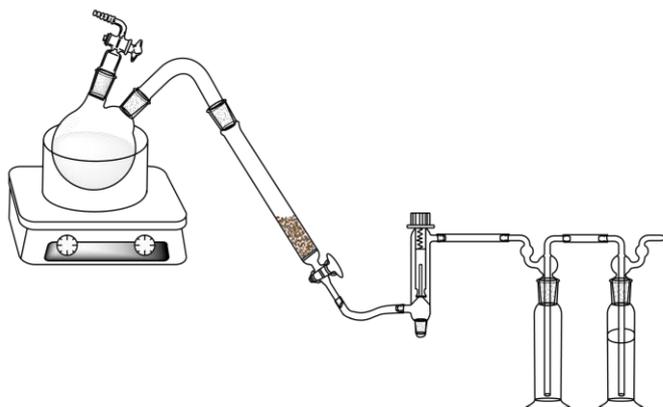
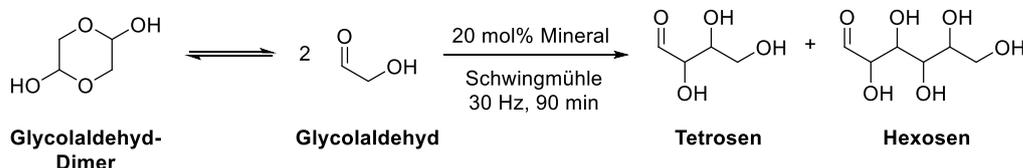


Abbildung 7-2: Apparatur zur Depolymerisation von Paraformaldehyd und Adsorption des Monomers auf Mineralien.

Paraformaldehyd wurde im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet und in einen Schlenkkolben überführt. Molsieb (4 Å)/Trägermaterialien wurde im Trockenschrank bei 130°C vorgetrocknet und nach Überführung in eine Vakuumfritte im Hochvakuum unter Erhitzen getrocknet. Unter leichtem Stickstoffstrom wurde das Paraformaldehyd durch Erhitzen auf 150°C depolymerisiert und der entstehende monomere Formaldehyd über das Molsieb/Mineral zur Adsorption und danach über ein Überdruckventil durch eine Waschlösung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 mol/L Salzsäure/Acetonitril geleitet. Die Reaktion wurde beendet, sobald in der Waschlösung größere Mengen Formaldehyd auftraten, was zu einem gelblichen Niederschlag führte. Die adsorbierte Menge an Formaldehyd wurde aus der Differenz des mit adsorbiertem Formaldehyd angereicherten Trägermaterials gegenüber des getrockneten Trägermaterials bestimmt.

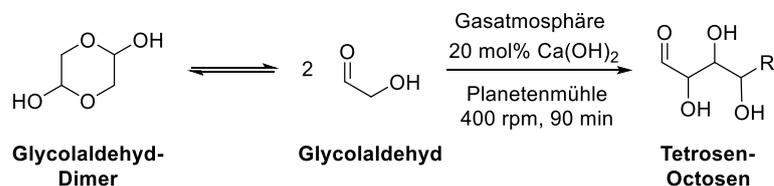
### 7.4.2 Mechanochemische, mineralienkatalysierte Aldolreaktion



In der Schwingkugelmühle wurden als Standardbedingungen 150 mg Feststoff in einem 5 mL Edelstahl-Mahlbecher mit einer 7 mm Edelstahl-Kugel bei 30 Hz für 90 min gemahlen. Glycolaldehyd-Dimer (0.5 Äq. entsprechend 1 Äq. Monomer) und die Mineralien (20 mol%) wurden eingesetzt. War die Summenformel des Katalysators nicht bekannt (z.B. Basaltglas), so wurde Glycolaldehyd-Dimer und das Mineral im Massenverhältnis 1:1 eingesetzt. Nach

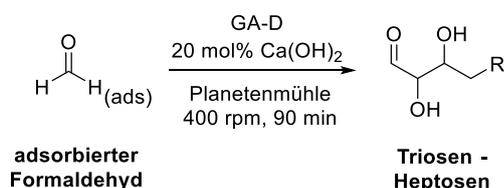
Beendigung der Mahlung wurde die Temperatur im Mahlbecher kontrolliert (<30°C) und die Proben wurden bei -78°C bis zur Analyse aufbewahrt.

### 7.4.3 Mechanochemische Aldolreaktion unter variabler Atmosphäre



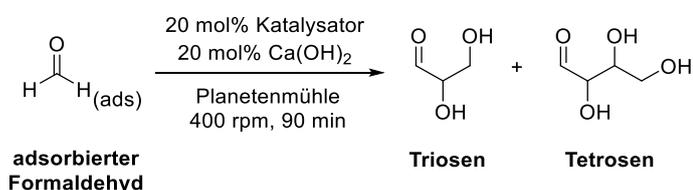
In der Planetenmühle wurden in 20 mL Edelstahl-Mahlbechern zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln vorgelegt. Glycolaldehyd-Dimer (850 mg, 7.08 mmol, 0.5 Äq.) und Calciumhydroxid (210 mg, 209.8 mmol, 20 mol%) wurden hinzugegeben und der Mahlbecher mit den Begasungsdeckeln verschlossen. Die Mahlbecher wurden dreimal im Hochvakuum evakuiert und anschließend mit dem Gas bis zu Atmosphärendruck gefüllt. Bei 400 rpm wurde für 90 min gemahlen. Nach Beendigung der Mahlung wurde die Temperatur im Mahlbecher kontrolliert (<35°C) und die Proben wurden bei -78°C bis zur Analyse aufbewahrt.

### 7.4.4 Mechanochemische Formosereaktion



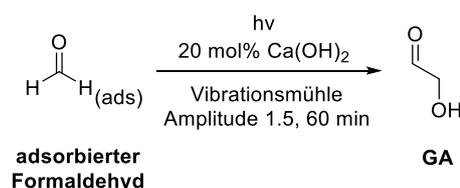
Die Standardbedingungen lagen bei 1.5 g Feststoffbeladung, einer Umdrehungszahl von 400 rpm und 90 min Mahldauer. Je nach adsorbierter Menge an Formaldehyd wurde die Ansatzgröße gewählt. Adsorbierter Formaldehyd (0.5 Äq.), Glycolaldehyd-Dimer (0.25 Äq.) wurden entweder ohne oder mit Calciumhydroxid (20 mol%) in 20 mL Edelstahl-Mahlbecher ausgestattet mit zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln gegeben und mit den Begasungsdeckeln verschlossen. Die Mahlbecher wurden mit Stickstoff gespült und verschlossen. Nach Beendigung der Mahlung wurde die Temperatur im Mahlbecher kontrolliert (<35°C) und die Proben wurden bei -78°C bis zur Analyse aufbewahrt.

### 7.4.5 Umpolungsreaktion



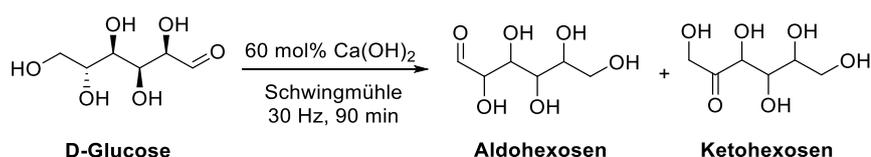
In der Planetenmühle wurden in 20 mL Edelstahl-Mahlbechern zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln vorgelegt. Auf Molsieb (4 Å) adsorbierter Formaldehyd (125 mg, 4.16 mmol, 1 Äq.), Umpolungskatalysator (0.83 mmol, 20 mol%) und Calciumhydroxid (61.7 mg, 0.83 mmol, 20 mol%) wurden hinzugegeben und der Mahlbecher mit den Begasungsdeckeln verschlossen. Die Mahlbecher wurden mit Stickstoff gespült und verschlossen. Bei 400 rpm wurde für 90 min gemahlen. Nach Beendigung der Mahlung wurde die Temperatur im Mahlbecher kontrolliert (<35°C) und die Proben wurden bei -78°C bis zur Analyse aufbewahrt.

#### 7.4.6 Photomechanochemie



In der Vibrationskugelmühle wurden in einem Mahlbechern aus gehärtetem Stahl eine 50 mm Kugel vorgelegt. Auf Molsieb (4 Å) adsorbierter Formaldehyd (351 mg, 11.7 mmol, 1 Äq.) und Calciumhydroxid (173.2 mg, 2.34 mmol, 20 mol%) wurden hinzugegeben und der Mahlbecher mit Stickstoff gespült und mit dem Plexiglas-Deckel verschlossen. Bei einer Amplitude von 1.5 wurde für 60 min gemahlen. Dabei wurde von oben durch den Deckel mit einer Quecksilberdampf Lampe beleuchtet. Nach Beendigung der Mahlung wurde die Temperatur im Mahlbecher kontrolliert (<35°C) und die Proben wurden bei -78°C bis zur Analyse aufbewahrt.

#### 7.4.7 Stabilität unter mechanochemischen Bedingungen



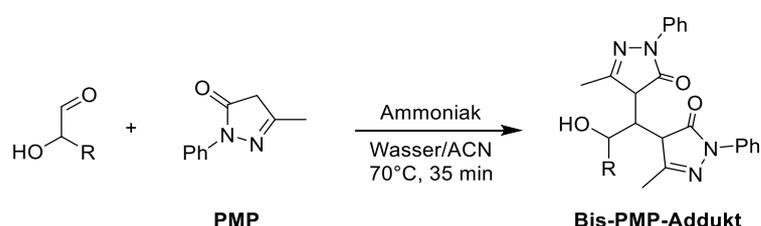
In der Schwingkugelmühle wurden als Standardbedingungen 150 mg Feststoff in einem 5 mL Edelstahl-Mahlbecher mit einer 7 mm Edelstahl-Kugel bei 30 Hz für 90 min gemahlen. D-Glucose, D-Fructose (125 mg, 694  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) oder D-Ribose (115 mg, 776  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) und die Calciumhydroxid (31.0 mg bzw. 34.1 mg, 20 mol%) wurden eingesetzt. Nach Beendigung der Mahlung wurde die Temperatur im Mahlbecher kontrolliert (<30°C) und die Proben wurden bei -78°C bis zur Analyse aufbewahrt.

## 7.5 Derivatisierung und Analyse der Monosaccharide

### 7.5.1 HPLC-RID-Messungen

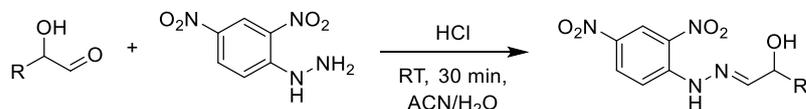
Glycolaldehyd-Dimer, D-Erythrose, D-Fructose und D-Mannose wurden in 1.1 mL Acetonitril/Wasser (80:30) gelöst. HPLC-Messungen wurden mit Acetonitril / Wasser (80:20) bei einem Fluss von 1 mL/min und  $T = 25^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Es wurden folgende Säulen getestet: Marcherey-Nagel EC 250/4 Nucleodur 100-5  $\text{NH}_2$  RP (4 x 250mm,  $5\mu\text{m}$ ), Marcherey-Nagel EC 250/4 Nucleodur HILIC (4 x 250mm,  $5\mu\text{m}$ ), Daicel Chiralpak QN-AX (4.6 x 150mm,  $5\mu\text{m}$ ).

### 7.5.2 PMP-Derivatisierung



1-2 mg Zucker wurde in 20  $\mu\text{L}$  bidest. Wasser gelöst und 200  $\mu\text{L}$  einer 0.05 mol/L Lösung von PMP in Acetonitril und 20  $\mu\text{L}$  wässrige Ammoniaklösung (17%) wurden zugegeben. Es wurde für 35 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt, im Stickstoffstrom getrocknet und in 500  $\mu\text{L}$  Acetonitril / Wasser (1:4) gelöst und filtriert. HPLC-Trennungen erfolgten auf einer Merck LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18e (4 x 250 mm,  $5\mu\text{m}$ ) Säule mit einem Fluss von 1 mL/min bei  $30^{\circ}\text{C}$  und folgendem Gradienten: A: 50 mmol/L Ammoniumacetat in Wasser, B: 70:30 Acetonitril / A, Gradient 0-25 min, 85% A - 65% A). Detektion erfolgte bei  $\lambda = 245\text{ nm}$  sowie massenspektrometrisch im Positivmodus (ESI).

### 7.5.3 DNPH-Derivatisierung



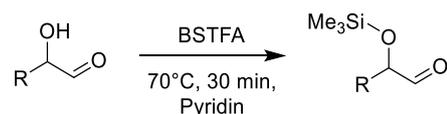
Eine Probenmenge entsprechend etwa 2 mg Zucker wurde in 200  $\mu\text{L}$  deionisiertem Wasser gelöst. 600  $\mu\text{L}$  einer gesättigten Lösung von 2-4-Dinitrophenylhydrazin in Acetonitril, 195  $\mu\text{L}$  Acetonitril und 5  $\mu\text{L}$  2 mol/L Salzsäure wurden hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. 1  $\mu\text{L}$  der Lösung wurden in die HPLC injiziert. Zur Trennung wurde eine Merck LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18e (4 x 250 mm,  $5\mu\text{m}$ ) Säule verwendet. Als Laufmittel wurde 50:50 v/v A / B (A: Wasser + 0.1% Ameisensäure, B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure) mit einem Fluss von 1 mL/min gewählt. Eine Kopplung mit einem

Diodenarraydetektor (DAD) eingestellt auf eine Wellenlänge von 360 nm und einem Massenspektrometer im Negativmodus (ESI) wurde zur Detektion verwendet.

#### 7.5.4 Belegen der GC-Säulen

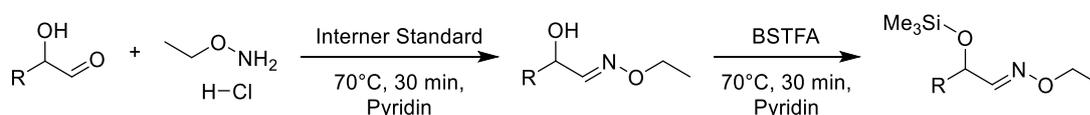
Die Beschichtung der GC-Säulen erfolgte mit einer spezialangefertigten Belegapparatur nach der statischen Methode nach K. Grob.<sup>[355]</sup> Eine unbeschichtete *bare fused silica* Kapillare (ID = 0.25 mm, MicroQuartz, München) wurde für eine Schichtdicke von 250 nm mit einer Polymerlösung von 4 mg/mL in Diethylether oder Dichlormethan gefüllt. Ein Ende wurde mit Silikon verschlossen, die Kapillare bei Raumtemperatur in ein Wasserbad gegeben und langsam vom anderen Ende im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wurde die Kapillare unter 10 kPa Stickstofffluss im GC-Ofen (Thermo Focus GC) ausgeheizt. Dazu wurde die Temperatur von 50°C für 5 min gehalten, mit 2°C/min auf 200°C gesteigert, dies für 600 min gehalten und anschließend mit 4°C/min wieder auf 50°C gesenkt.

#### 7.5.5 Silylierung



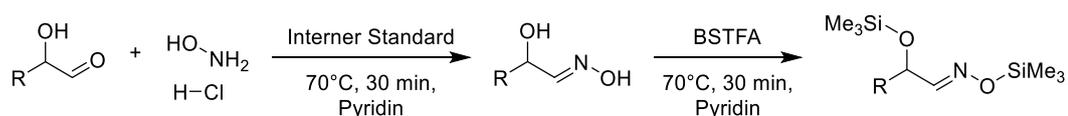
Eine Probenmenge entsprechend etwa 1-3 mg Zucker wurden in 200  $\mu\text{L}$  Pyridin gelöst. 120  $\mu\text{L}$  *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) wurde zugegeben, die Probe mit einem Vortexer vermischt und 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. 0.1  $\mu\text{L}$  der Lösung wurden in die GC injiziert. Eine *fused silica* Kapillare (MicroQuartz, München) beschichtet mit dem SE-52 Polymer (L = 14 m, ID = 0.25 mm, FT = 0.25  $\mu\text{m}$ ) wurde verwendet. Die Inlettemperatur betrug 250°C, es wurde im Split-Modus mit einem Fluss von 30 mL/min gearbeitet. Die Ofentemperatur von 50°C wurde für 2 min gehalten, mit einem Gradienten von 10°C/min auf 140°C erhöht und anschließend mit 5°C/min auf 240°C und dies ebenfalls für 2 min gehalten. Als Trägergas wurde Helium mit konstantem Druck von 80 kPa verwendet. Die GC wurde simultan mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Massenspektrometer Thermo PolarisQ mit Elektronenstoßionisation (EI) gekoppelt. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 200°C. Massenspektren wurden im Scan Modus von  $m/z$  50 bis 750 aufgenommen.

#### 7.5.6 EtOx-TMS-Derivatisierung



Eine Probenmenge entsprechend etwa 1-3 mg Zucker wurden in 200  $\mu\text{L}$  Pyridin gelöst. 200  $\mu\text{L}$  einer Derivatisierungslösung mit 40 mg/mL *O*-Ethylhydroxylaminhydrochlorid und 50 mmol/L Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid in Pyridin wurden zugegeben. Die Probe wurde mit einem Vortexer vermischt und 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 120  $\mu\text{L}$  *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) zugegeben und erneut 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. Feste Mineralienrückstände wurden abzentrifugiert und 0.1  $\mu\text{L}$  des klaren Überstands in die GC injiziert. Eine *fused silica* Kapillare (MicroQuartz, München) beschichtet mit dem SE-52 Polymer (L = 14 m, ID = 0.25 mm, FT = 0.25  $\mu\text{m}$ ) wurde verwendet. Die Inlettemperatur betrug 250°C, es wurde im Split-Modus mit einem Fluss von 30 mL/min gearbeitet. Die Ofentemperatur von 50°C wurde für 2 min gehalten, mit einem Gradienten von 10°C/min auf 140°C erhöht und anschließend mit 5°C/min auf 240°C und dies ebenfalls für 2 min gehalten. Als Trägergas wurde Helium mit konstantem Druck von 80 kPa verwendet. Die GC wurde simultan mit einem FID und einem Massenspektrometer Thermo PolarisQ mit Elektronenstoßionisation gekoppelt. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 200°C. Massenspektren wurden im Scan Modus von 50 bis 750  $m/z$  aufgenommen. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzsubstanzen (Chromatogramme und Spektren siehe Anhang 8.2). Die FID Chromatogramme wurden mithilfe von OriginPro 2018 Basislinien-korrigiert und die Signale integriert. Anschließend wurden die Signale um die *effective carbon number* korrigiert (Tabelle 8-2), um das unterschiedliche Ansprechverhalten des Detektors zu berücksichtigen.

### 7.5.7 HAcI-TMS-Derivatisierung

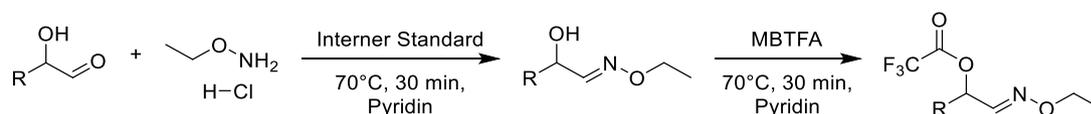


Eine Probenmenge entsprechend etwa 1-3 mg Zucker wurden in 200  $\mu\text{L}$  Pyridin gelöst. 200  $\mu\text{L}$  einer Derivatisierungslösung mit 40 mg/mL Hydroxylaminhydrochlorid und 50 mmol/L Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid in Pyridin wurden zugegeben. Die Probe wurde mit einem Vortexer vermischt und 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 120  $\mu\text{L}$  *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) zugegeben und erneut 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. Feste Mineralienrückstände wurden abzentrifugiert und 0.1  $\mu\text{L}$  des klaren Überstands in die GC injiziert. Die gaschromatographischen Bedingungen wurden identisch zur EtOx-TMS-Derivatisierung gehalten. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzsubstanzen (Chromatogramme und Spektren siehe Anhang 8.2).

### 7.5.8 GC-TCD-Messungen

Für die Referenzen wurden 10  $\mu\text{L}$  Substanz in 1 mL Dichlormethan gelöst. Für die Reaktionsproben wurden 20 mg Probe in 100  $\mu\text{L}$  Dichlormethan oder für die Proben auf Trägermaterial 100 mg Probe in 200  $\mu\text{L}$  Dichlormethan suspendiert, 1 min mit dem Vortexer durchmischt und der Rückstand abzentrifugiert. 0.5  $\mu\text{L}$  des klaren Überstands wurden in die GC injiziert. Für Gase wurden 500  $\mu\text{L}$  manuell injiziert. Die Trennung erfolgte auf einer CP-Sil 5CP Säule (L = 50 m, ID = 0.32 mm, FT = 5  $\mu\text{m}$ ) Die Inlettemperatur betrug 250°C und der Splitfluss 20 mL/min. Der Ofen wurde isotherm bei 50°C betrieben mit einem Heliumfluss von 2 mL/min. Zur Detektion wurde ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) verwendet, welcher bei 200°C betrieben wurde. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen.

### 7.5.9 EtOx-TFA-Derivatisierung



Eine Probenmenge entsprechend etwa 1-3 mg Zucker wurden in 200  $\mu\text{L}$  Pyridin gelöst. 200  $\mu\text{L}$  einer Derivatisierungslösung mit 40 mg/mL *O*-Ethylhydroxylaminhydrochlorid und 50 mmol/L Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid in Pyridin wurden zugegeben. Die Probe wurde mit einem Vortexer vermischt und 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 50  $\mu\text{L}$  *N*-Methyl-bis(trifluoroacetamid) (MBTFA) zugegeben und erneut 30 min bei 70°C unter Schütteln erhitzt. Feste Mineralienrückstände wurden abzentrifugiert und 0.1  $\mu\text{L}$  des klaren Überstands in die GC injiziert. Eine *fused silica* Kapillare (MicroQuartz, München) beschichtet mit dem OV-225 Polymer (L = 30 m, ID = 0.25 mm, FT = 0.25  $\mu\text{m}$ ) wurde verwendet. Die Inlettemperatur betrug 250°C, es wurde im Split-Modus mit einem Fluss von 15 mL/min gearbeitet. Die Ofentemperatur von 80°C wurde für 5 min gehalten, mit einem Gradienten von 2°C/min auf 160°C erhöht und anschließend mit 10°C/min auf 200°C und dies ebenfalls für 12 min gehalten. Als Trägergas wurde Helium mit konstantem Druck von 80 kPa verwendet. Die GC wurde simultan mit einem FID und einem Massenspektrometer Thermo ISQ mit Elektronenstoßionisation gekoppelt. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 200°C. Massenspektren wurden im Scan Modus von 65 bis 750  $m/z$  aufgenommen. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzsubstanzen (Chromatogramme und Spektren siehe Anhang 8.2).

## 8 Anhang

### 8.1 Daten zu den Peptidtrennungen und der Peptidbildung in SO<sub>2</sub>

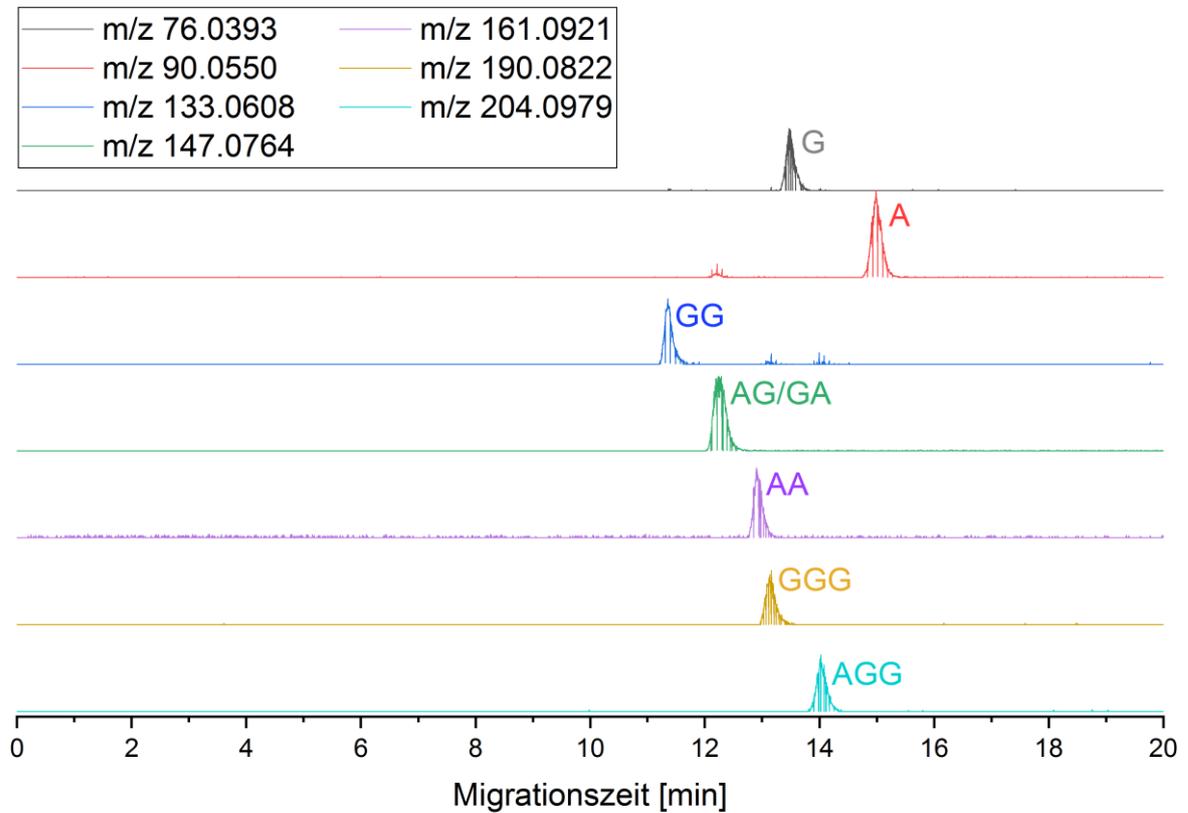


Abbildung 8-1: Extrahierte Ionenchromatogramme der Referenzpeptide nach CE-MS-Messung mit datenabhängigem MS<sup>2</sup>-Experiment (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C, CID mit NCE 30%).

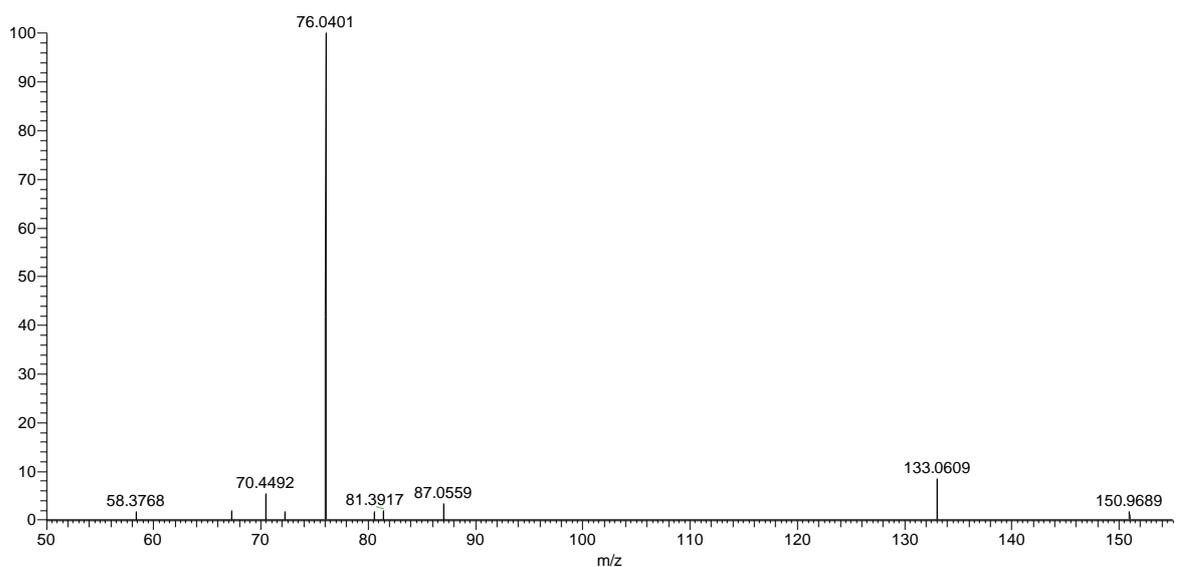
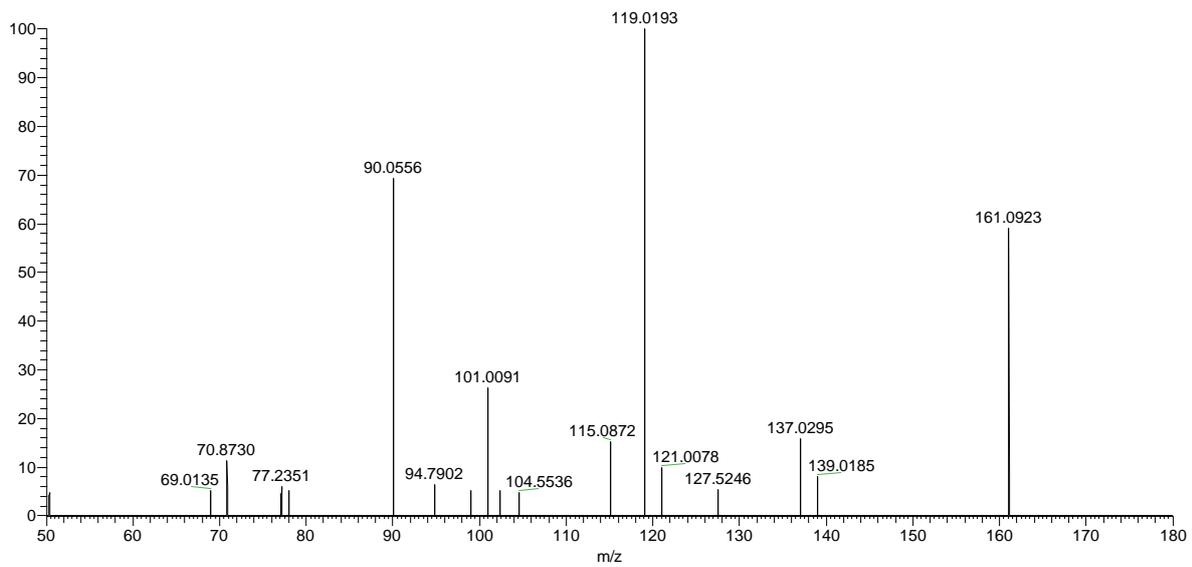
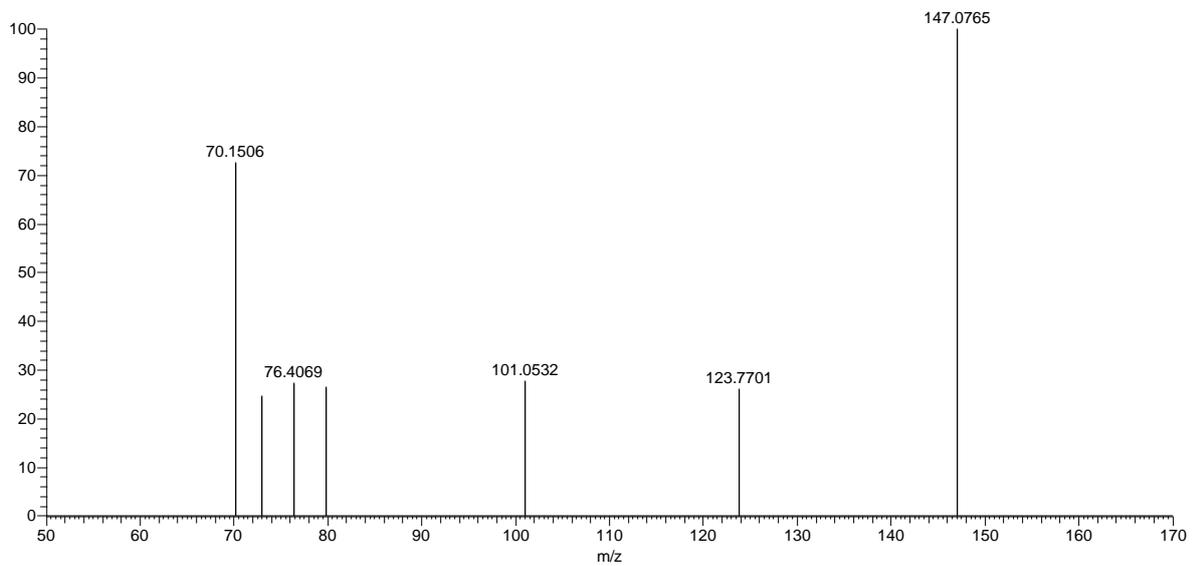


Abbildung 8-2: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Glycyl-Glycin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals  $m/z = 133.0608$  bei  $t_{\text{mig}} = 11.4$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).



**Abbildung 8-3:** ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Alanin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals  $m/z = 161.0921$  bei  $t_{\text{mig}} = 12.9$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).



**Abbildung 8-4:** ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Glycin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals  $m/z = 147.0764$  bei  $t_{\text{mig}} = 12.2$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

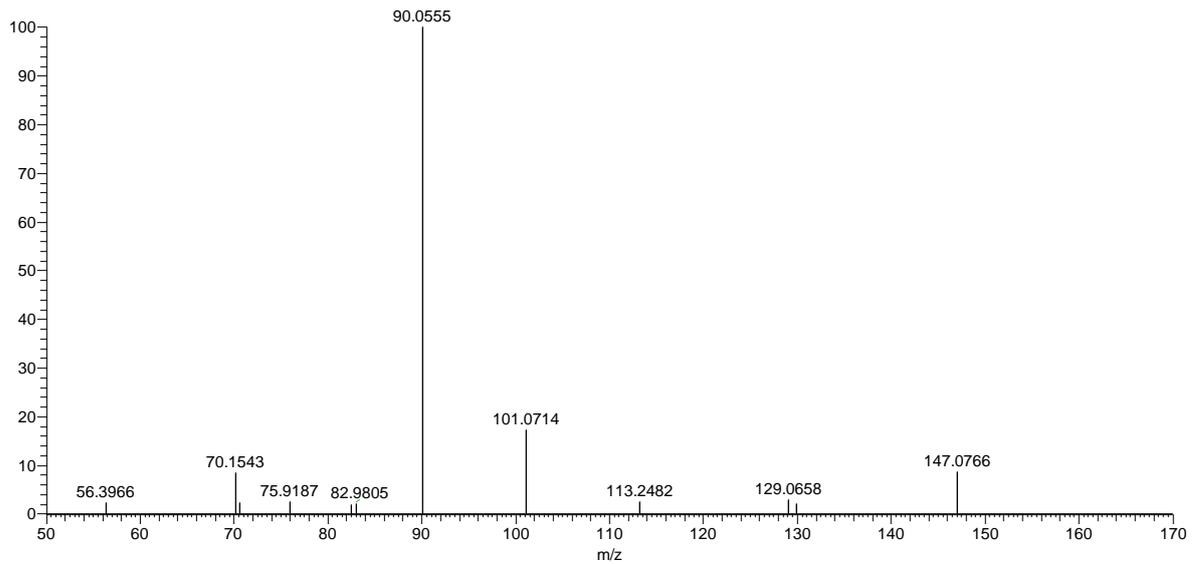


Abbildung 8-5: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Glycyl-Alanine nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals  $m/z = 147.0764$  bei  $t_{\text{mig}} = 12.3$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

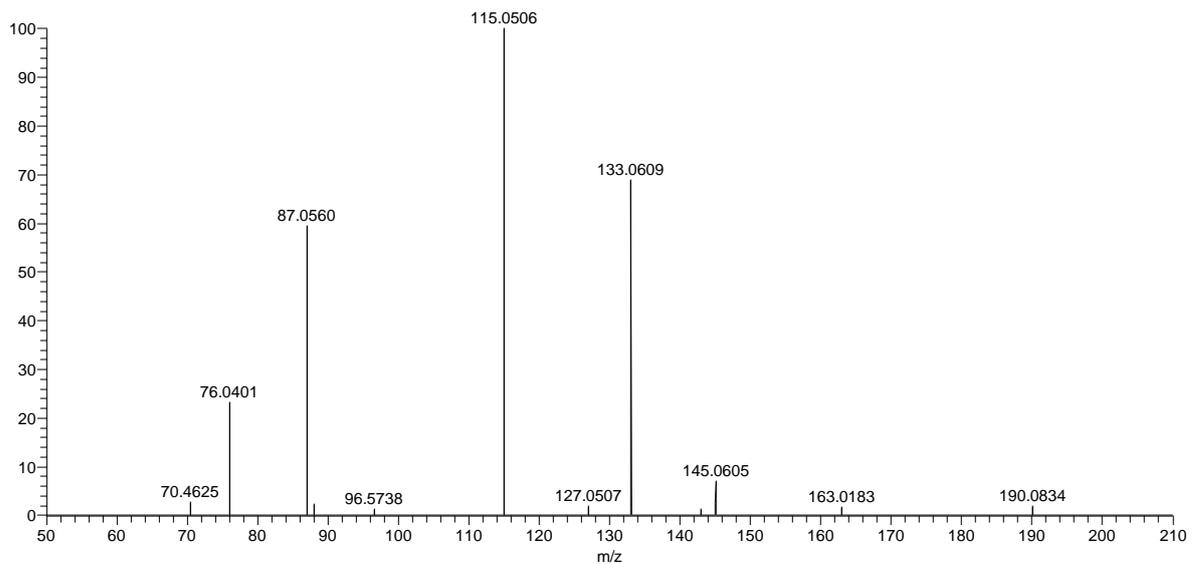


Abbildung 8-6: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Glycyl-Glycyl-Glycin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals  $m/z = 190.0821$  bei  $t_{\text{mig}} = 13.2$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

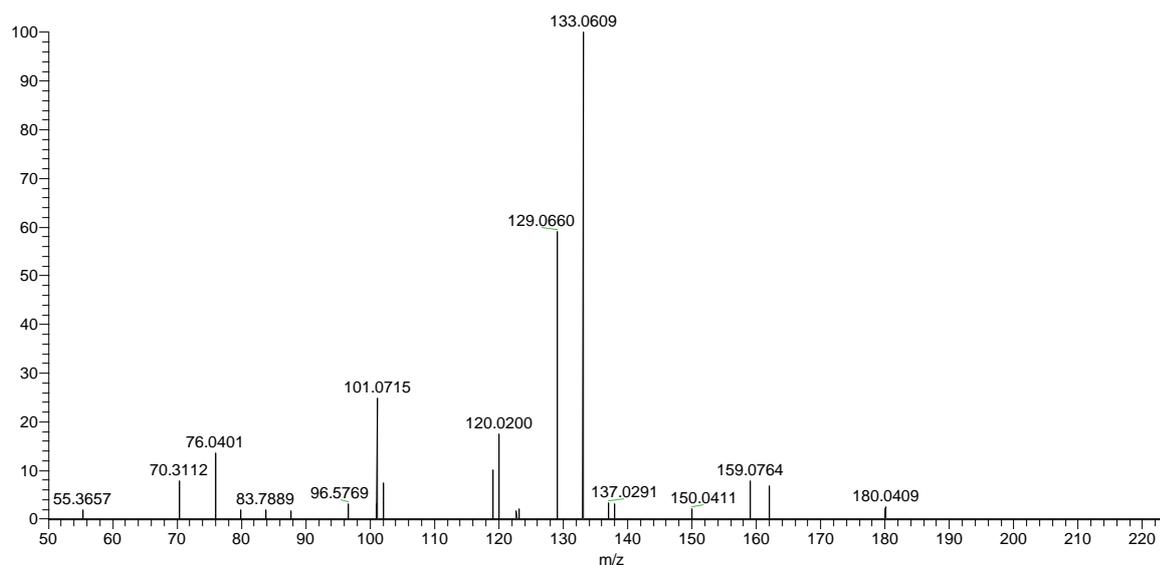


Abbildung 8-7: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Glycyl-Glycin nach kollisionsinduzierter Dissoziation (NCE 30%) des Signals  $m/z = 204.0978$  bei  $t_{\text{mig}} = 14.0$  min nach kapillarelektrophoretischer Trennung (LPA-Kapillare, 70 cm, 2 mol/L AcOH, 30 kV, 30 mbar, 25°C).

Tabelle 8-1: Masse-zu-Ladungsverhältnis der Fragmentionen der Dipeptide der 20 Aminosäuren nach Bindungsbruch des Peptidrückgrats.

Fragmention	a	b	c	x	y	z	sonstige
A	44.0495	72.0444	89.0709	116.0342	90.0550	73.0284	
C	76.0216	104.0165	121.0430	148.0063	122.0270	105.0005	
D	88.0393	116.0342	133.0608	160.0240	134.0448	117.0182	
E	102.0550	130.0499	147.0764	174.0397	148.0604	131.0339	
F	120.0808	248.0757	165.1022	192.0655	166.0863	149.0597	
G	30.0338	58.0287	75.0553	102.0186	76.0393	59.0128	
H	110.0713	138.0662	155.0927	182.0560	156.0768	139.0502	
I	86.0964	144.0913	131.1179	158.0812	132.1019	115.0754	
K	101.1073	129.1022	146.1288	173.0921	147.1128	130.0863	84.0808
L	86.0964	144.0913	131.1179	158.0812	132.1019	115.0754	
M	104.0529	132.0478	149.0743	176.0376	150.0583	133.0318	
N	87.0553	115.0502	312.0768	133.0608	159.0400	116.0342	
P	70.0651	98.0600	115.0866	142.0499	116.0706	116.0706	
Q	101.0709	129.0659	146.0924	173.0557	147.0764	130.0499	
R	129.1135	157.1084	174.1349	201.0982	175.1190	158.0924	
S	60.0444	88.0393	105.0659	132.0291	106.0499	89.0233	
T	74.0600	102.0550	119.0815	146.0448	120.0655	103.0390	
V	72.0808	100.0757	117.1022	144.0655	118.0863	101.0597	
W	159.0917	187.0866	204.1131	231.0764	205.0972	188.0706	
Y	136.0757	164.0706	181.0972	208.0604	182.0812	165.0546	

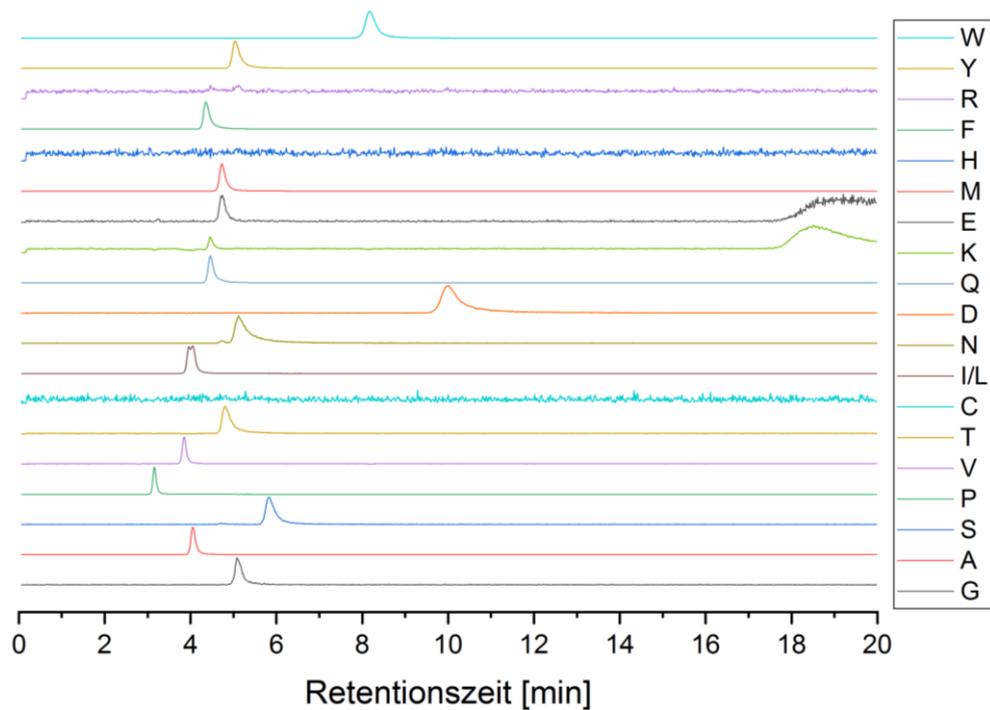


Abbildung 8-8: Extrahierte Ionenchromatogramme der 20 proteinogenen Aminosäuren der HPLC-Trennung auf einer Daicel Chiralpak ZWIX (+) Säule (3x150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), Fluss 0.5 mL/min, T = 30°C, MeOH / ACN / H<sub>2</sub>O (49:49:2) mit 25 mmol/L HCO<sub>2</sub>H + 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>.

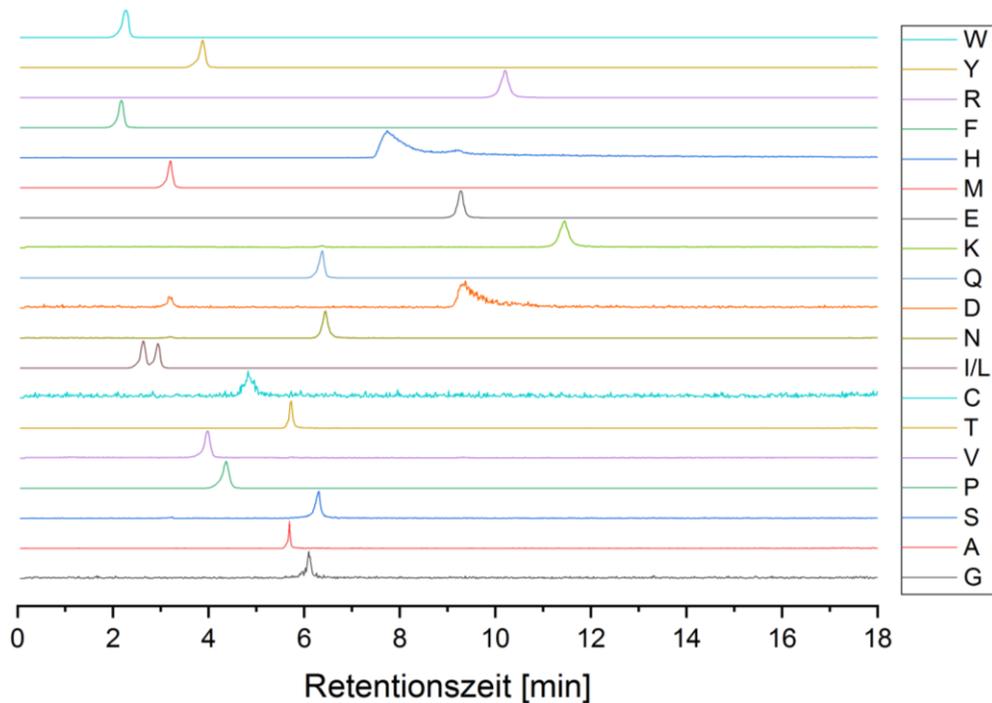
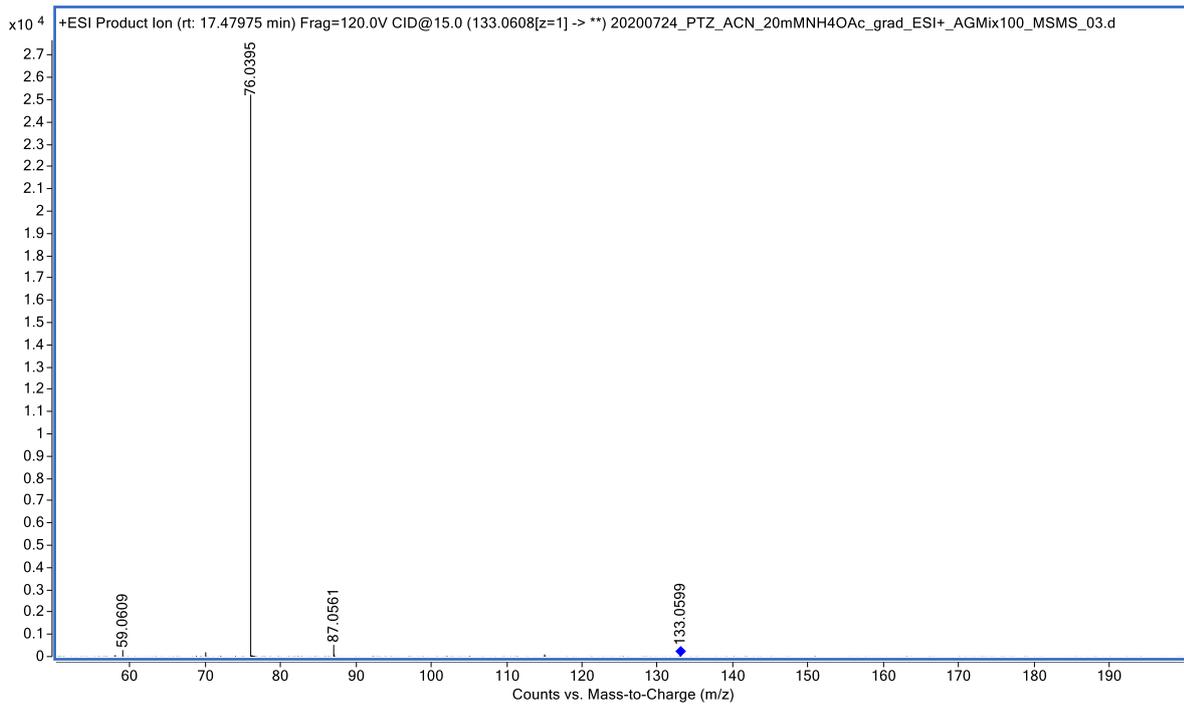
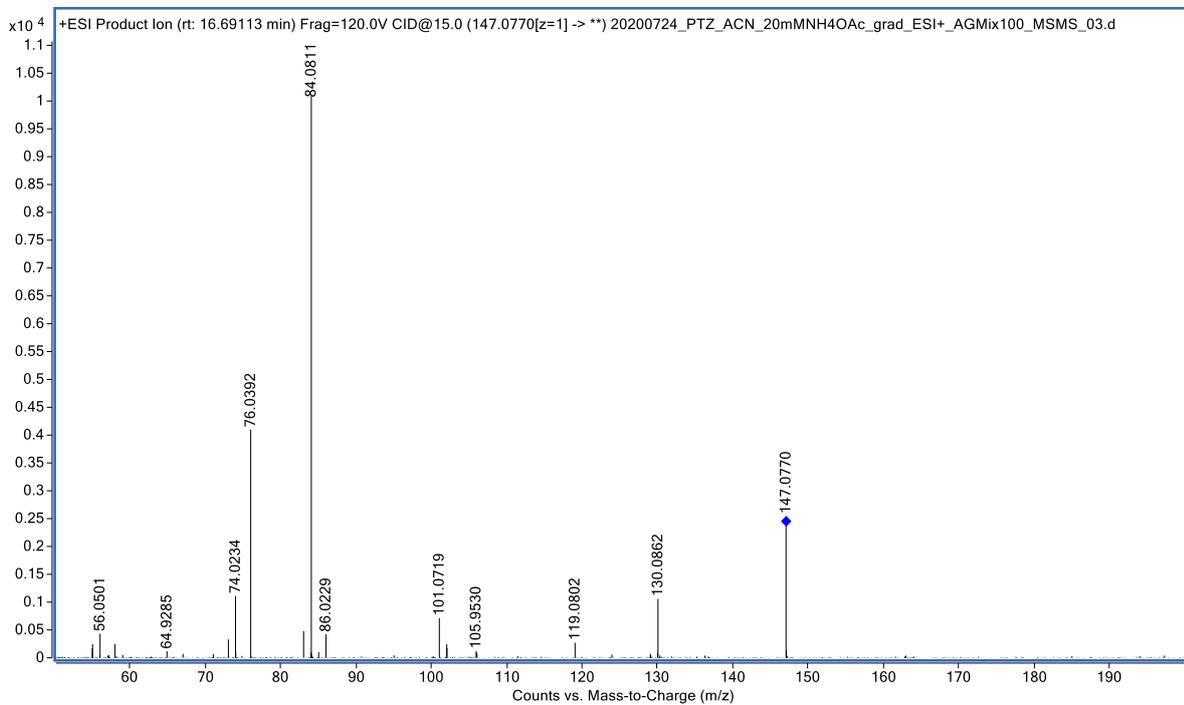


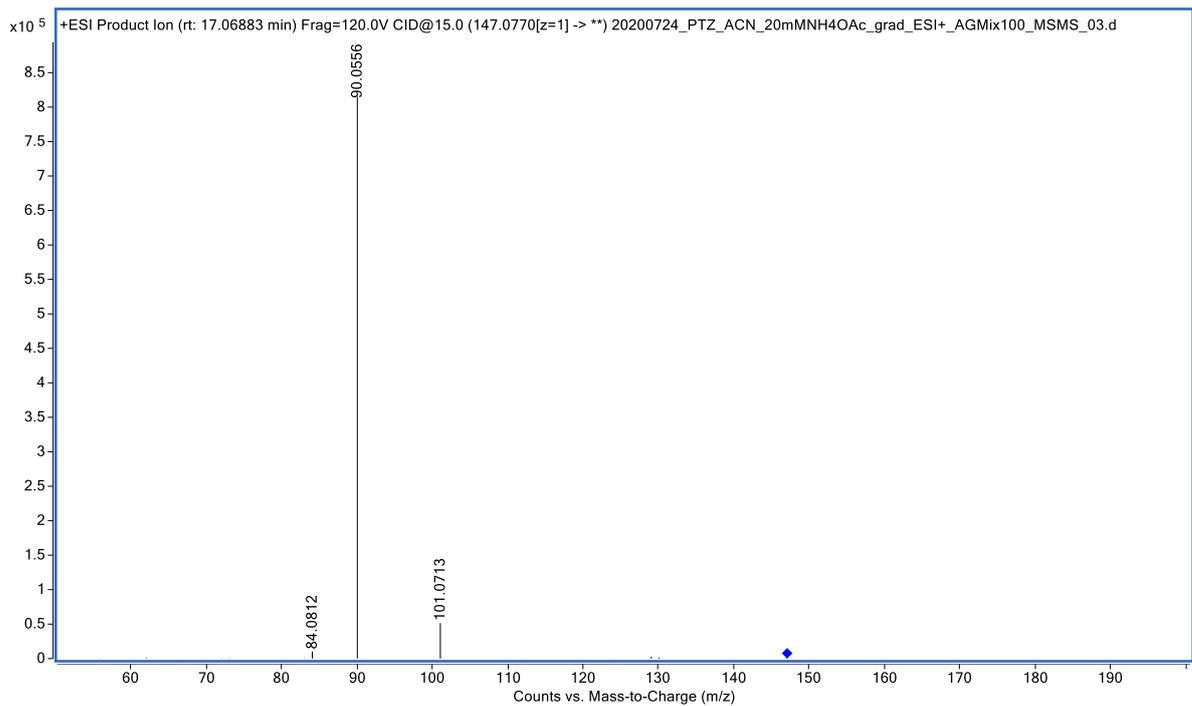
Abbildung 8-9: Normalisierte extrahierte Ionenchromatogramme der 20 proteinogenen Aminosäuren der HPLC-Trennung auf einer Macherey Nagel EC 50/2 Nucleodur HILIC Säule (2x50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ), Fluss 0.8 mL/min, T = 30°C, A: H<sub>2</sub>O / 200 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>2(aq)</sub> 90/10, B: ACN / 200 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>2(aq)</sub> 90/10, Gradient: 0-15 min 100-80% B.



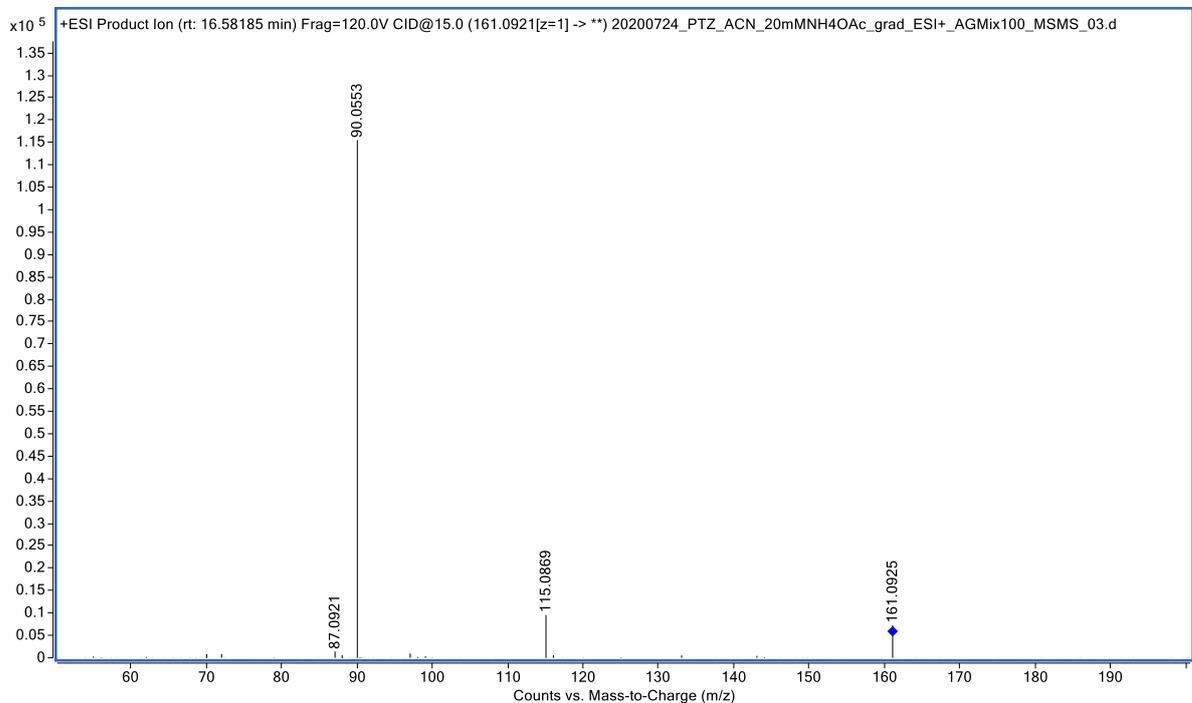
**Figure 8-1:** ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Glycyl-Glycin nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.



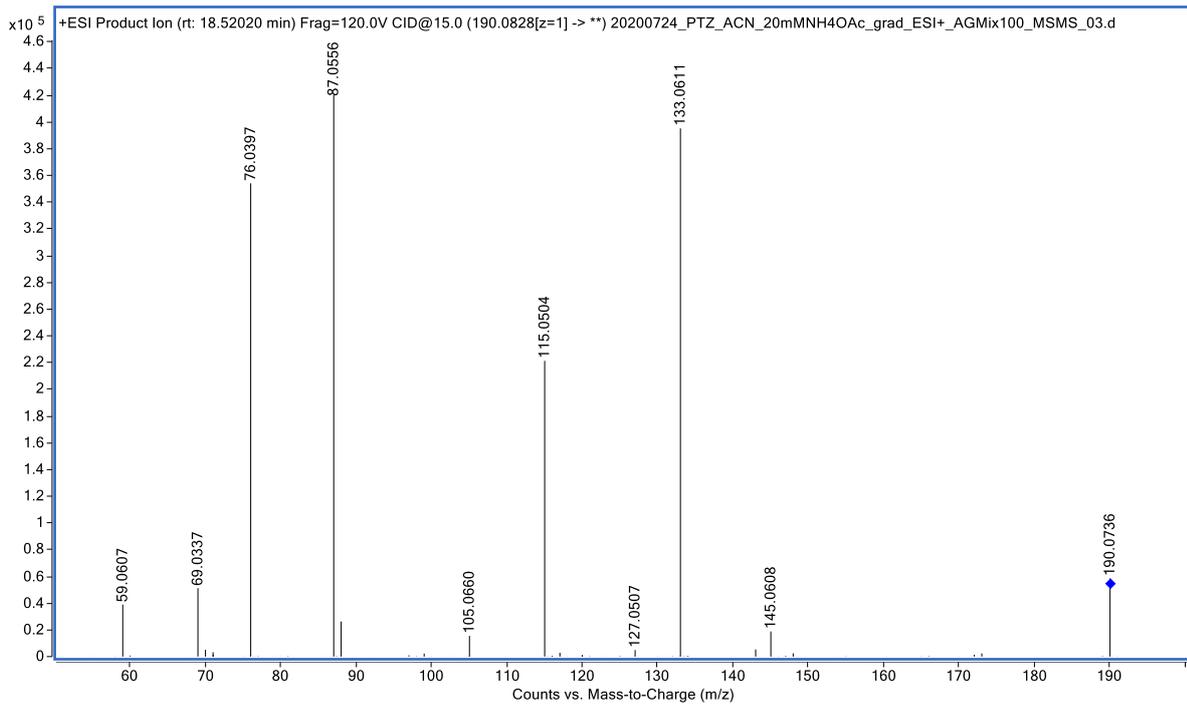
**Figure 8-2:** ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Glycin nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.



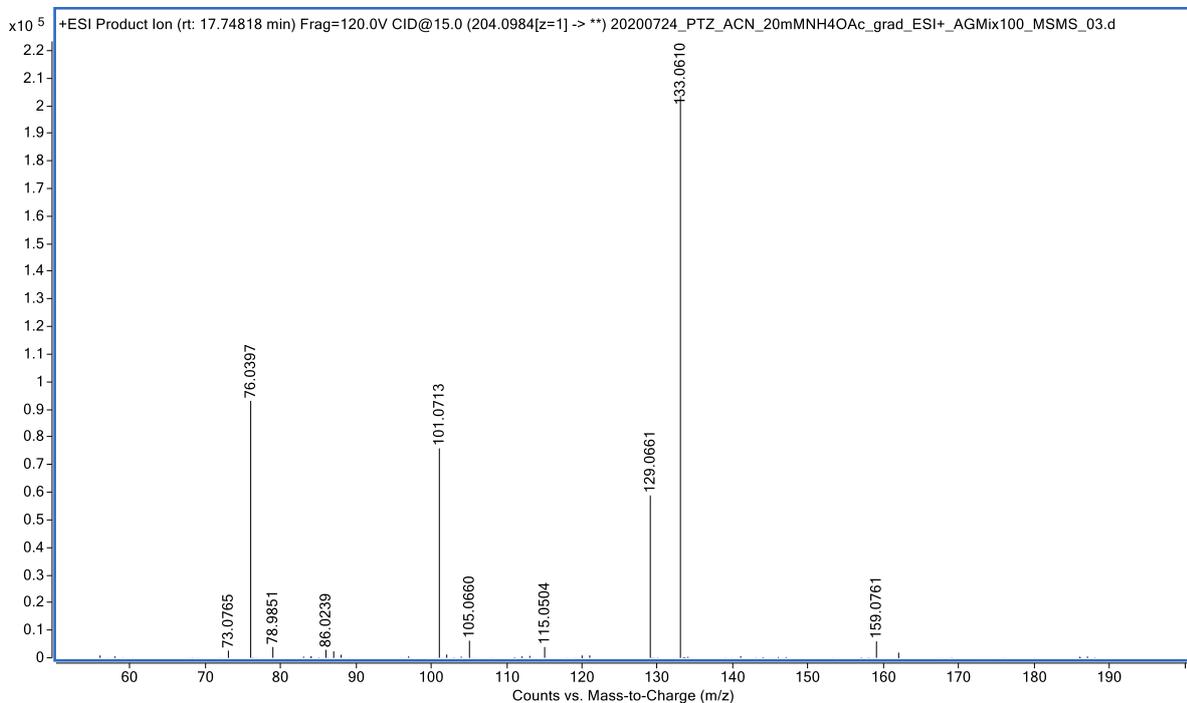
**Figure 8-3:** ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Glycyl-Alanin nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.



**Figure 8-4:** ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Alanin nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.



**Figure 8-5: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Glycyl-Glycyl-Glycin nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.**



**Figure 8-6: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Alanyl-Glycyl-Glycin nach HPLC-Trennung auf einer Daicel DCpak PTZ Säule (4.6x150 mm, 3 µm), Fluss 0.9 mL/min, T = 30°C, A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc<sub>(aq)</sub>, B: ACN, Gradient: 0-10 min 70% B, 10-25 min 70-0% B, 25-35 min 0% B.**

		C-Terminus																		
		A	F	I/L	M	P	V	W	C	G	N	Q	S	T	Y	H	K	R	D	E
N-Terminus	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	I/L	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	M	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	P	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	W	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Y	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	H	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	K	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	R	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 8-10: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid nach 7 d ausgehend von der gesamten Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus																		
		A	F	I/L	M	P	V	W	C	G	N	Q	S	T	Y	H	K	R	D	E
N-Terminus	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	I/L	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	M	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	P	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	W	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Y	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	H	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	K	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	R	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 8-11: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid nach 21 d ausgehend von der gesamten Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus																		
		A	F	I/L	M	P	V	W	C	G	N	Q	S	T	Y	H	K	R	D	E
N-Terminus	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	I/L	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	M	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	P	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	W	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Y	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
H	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
K	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
R	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

Abbildung 8-12: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid nach 21 d ausgehend von der 50 mmol/L gesamten Aminosäurenmischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		7 d							21 d						
		C	G	N	Q	S	T	Y	C	G	N	Q	S	T	Y
N-Terminus	C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Y	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 8-13: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der polaren Aminosäurenmischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

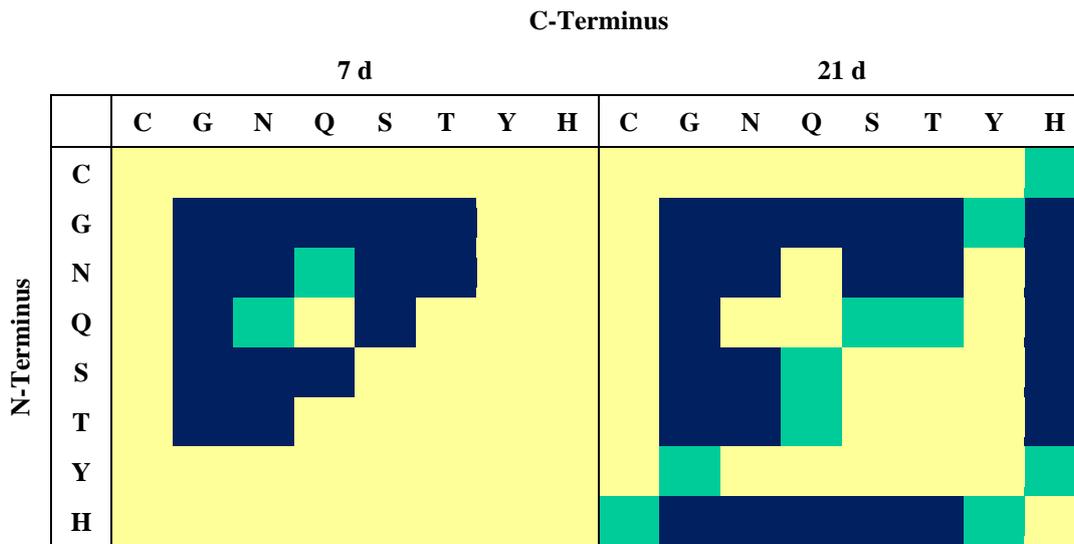


Abbildung 8-14: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der polaren Aminosäuremischung und Histidin (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

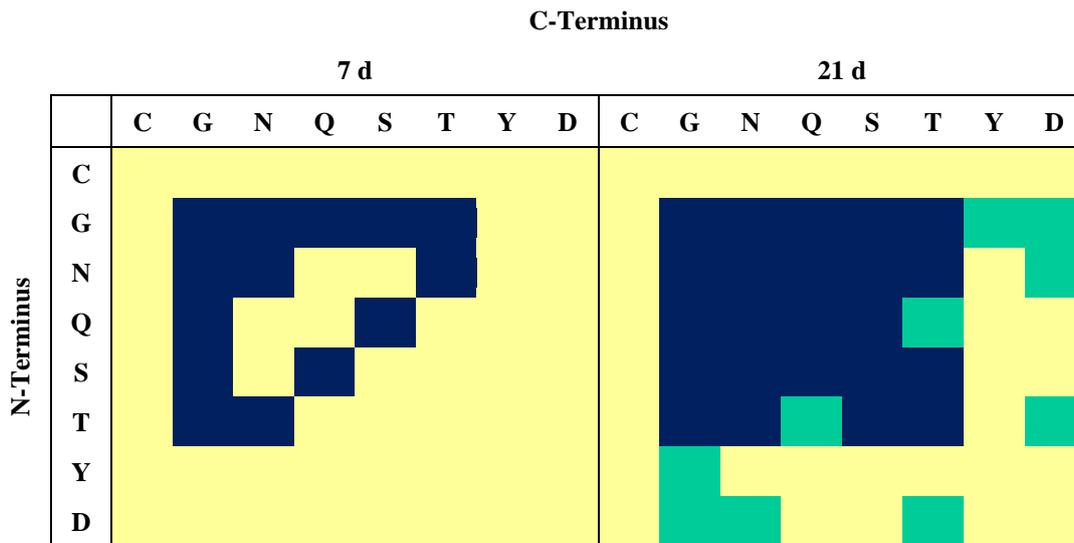


Abbildung 8-15: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der polaren Aminosäuremischung und Asparaginsäure (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus							
		7 d				21 d			
		A	F	I/L	M	P	V	W	
N-Terminus	A	■							
	F	■							
	I/L	■							
	M	■							
	P	■							
	V	■	■				■	■	
	W	■							

Abbildung 8-16: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus							
		50 mM				400 mM			
		A	F	I/L	M	P	V	W	
N-Terminus	A	■							
	F	■							
	I/L	■							
	M	■							
	P	■							
	V	■	■				■	■	
	W	■							

Abbildung 8-17: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung nach 21 d (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

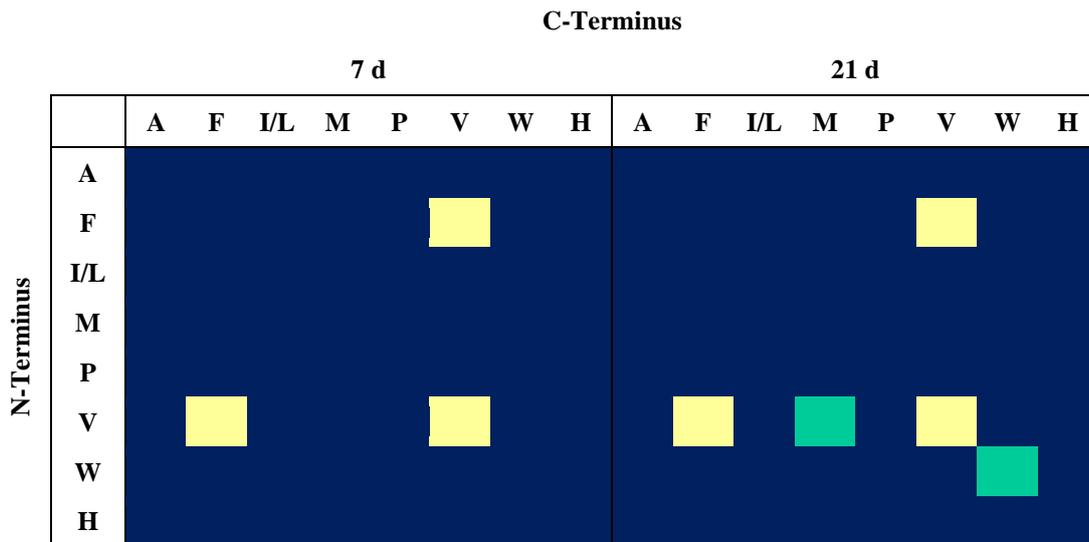


Abbildung 8-18: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung und Histidin (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

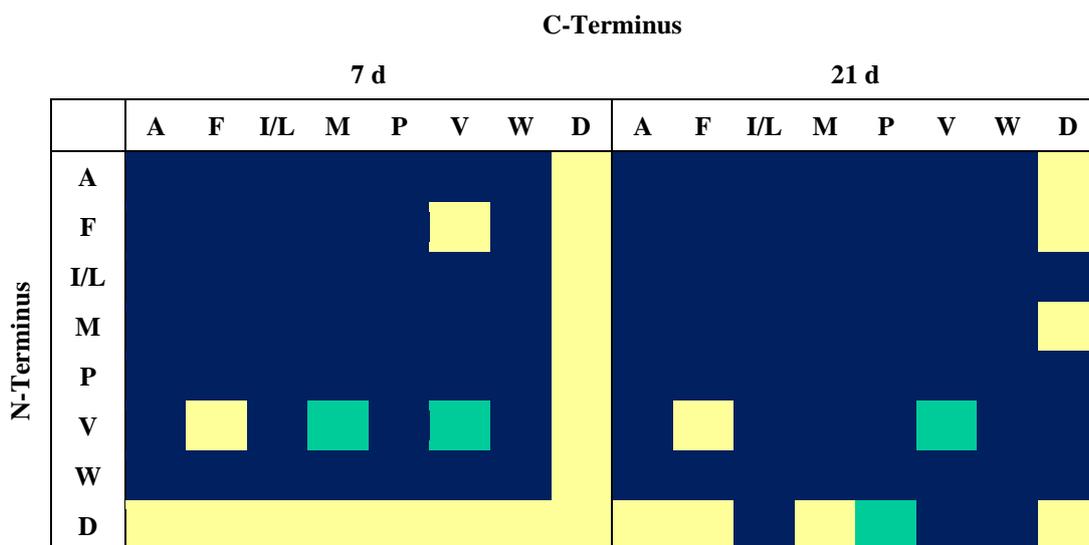


Abbildung 8-19: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung und Asparaginsäure (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus																		
		7 d								21 d										
		A	D	E	G	I/L	P	S	T	V	A	D	E	G	I/L	P	S	T	V	
N-Terminus	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	I/L	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	P	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 8-20: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der präbiotischen Aminosäurenmischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus					
		7 d			21 d		
		H	K	R	H	K	R
N-Terminus	H	■	■	■	■	■	■
	K	■	■	■	■	■	■
	R	■	■	■	■	■	■

Abbildung 8-21: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der basischen Aminosäurenmischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

		C-Terminus			
		7 d		21 d	
		D	E	D	E
N-Terminus	D	■	■	■	■
	E	■	■	■	■

Abbildung 8-22: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in Schwefeldioxid ausgehend von der sauren Aminosäurenmischung (■ = vorhanden, ■ = Spuren, ■ = nicht detektiert).

## 8.2 Daten zur Monosaccharid-Analytik und Synthese

Tabelle 8-2: Verwendete ECN-Werte für die EtOx-TMS-derivatisierten Produkte.

Verbindung	Effective Carbon Number (EtOx-TMS-Derivate)
Glycolaldehyd	5.29
Triosen	8.98
Tetrosen	12.67
Pentosen	16.36
Hexosen	20.05
Heptosen	23.74
Octosen	27.43
Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	20.76

Tabelle 8-3: Detektions- sowie Quantifikationslimits der silylierten sowie trifluoracetylierten Monosaccharid-Oximderivate.

Verbindung	EtOx-TMS		EtOx-TFA	
	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
Glycolaldehyd	2.8	9.3	43.8	145.8
Glycerinaldehyd	1.2	4.1	7.4	24.6
Dihydroxyaceton	1.0	3.4	-	-
Threose	2.0	6.8	8.6	28.8
Erythrose	3.8	12.7	-	-
Ribose	1.8	6.0	11.6	38.6
Xylulose	1.7	5.5	-	-
Mannose	2.5	8.5	10.7	35.7
Fructose	2.0	6.8	-	-

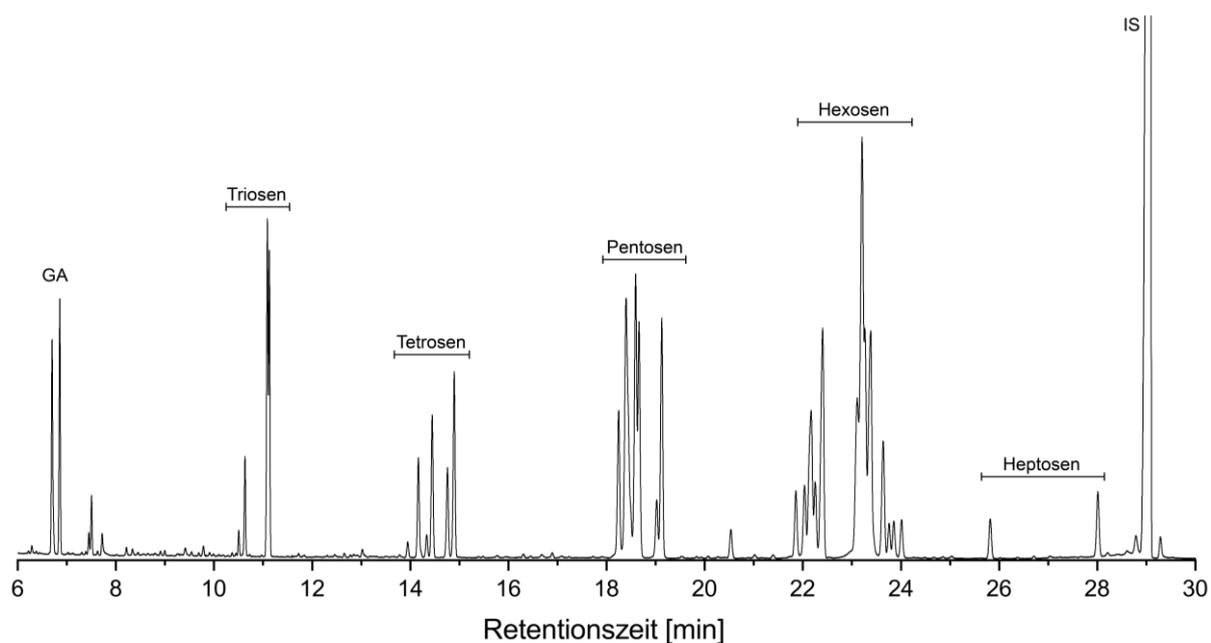


Abbildung 8-23: Gaschromatographische Trennung der HCl-TMS-derivatisierten Zuckerstandards auf einer SE-52 Säule (L = 14 m, ID = 0.25 mm, FT = 0.25  $\mu$ m), 50°C (2 min) mit 10 °C/min bis 140°C, mit 5 °C/min bis 240°C (2 min), He (p = 80 kPa). Übersetzt nach und mit Erlaubnis wiedergeben von M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of

an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 160-167, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.<sup>[347]</sup>  
Copyright durch Elsevier B. V.

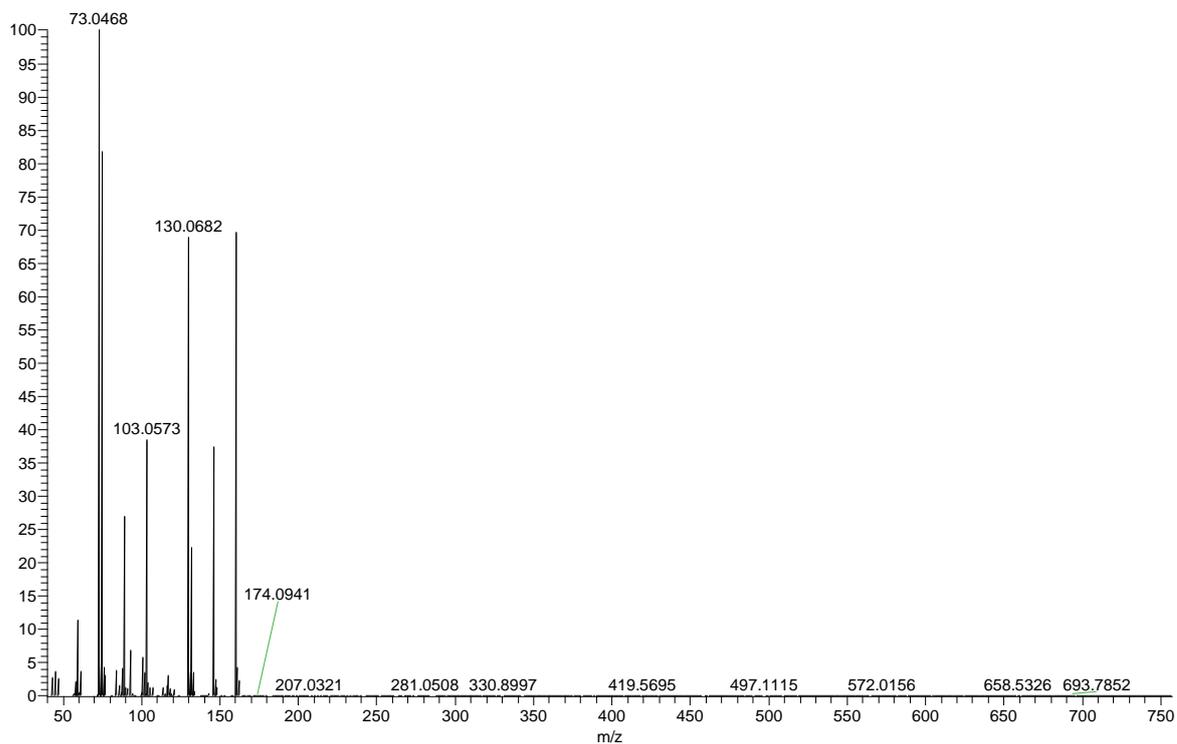


Abbildung 8-24: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycolaldehyd nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

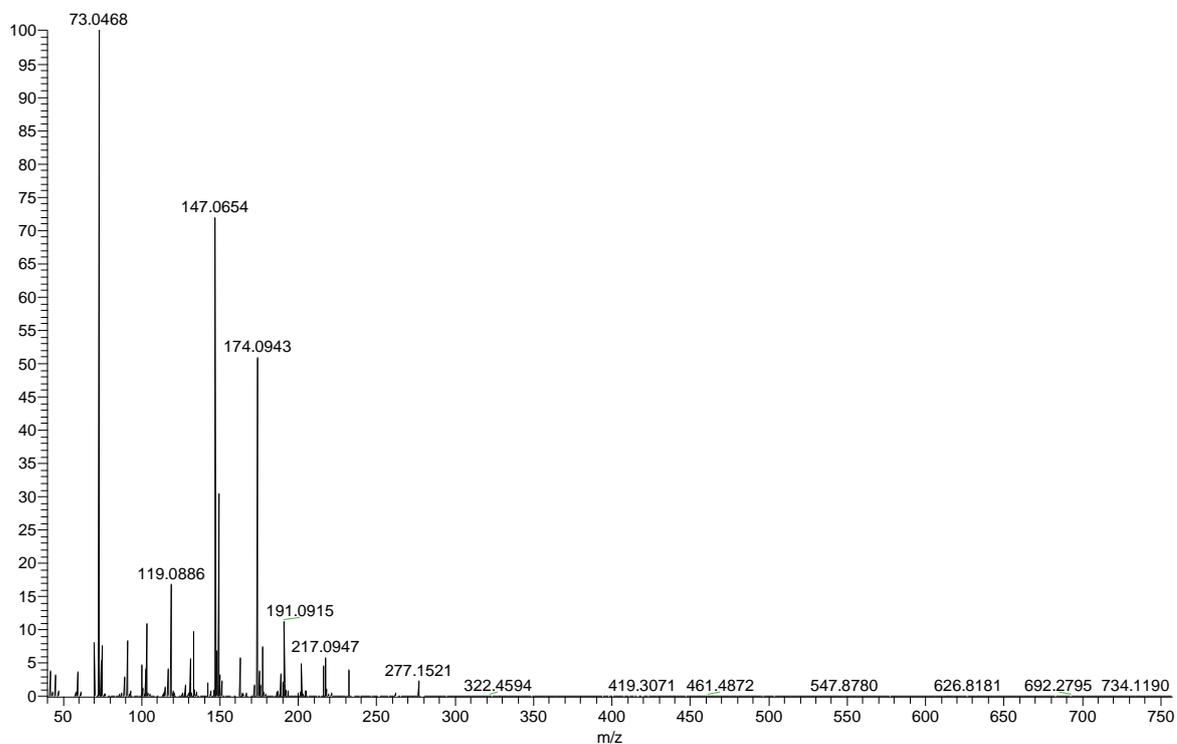


Abbildung 8-25: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycerinaldehyd nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

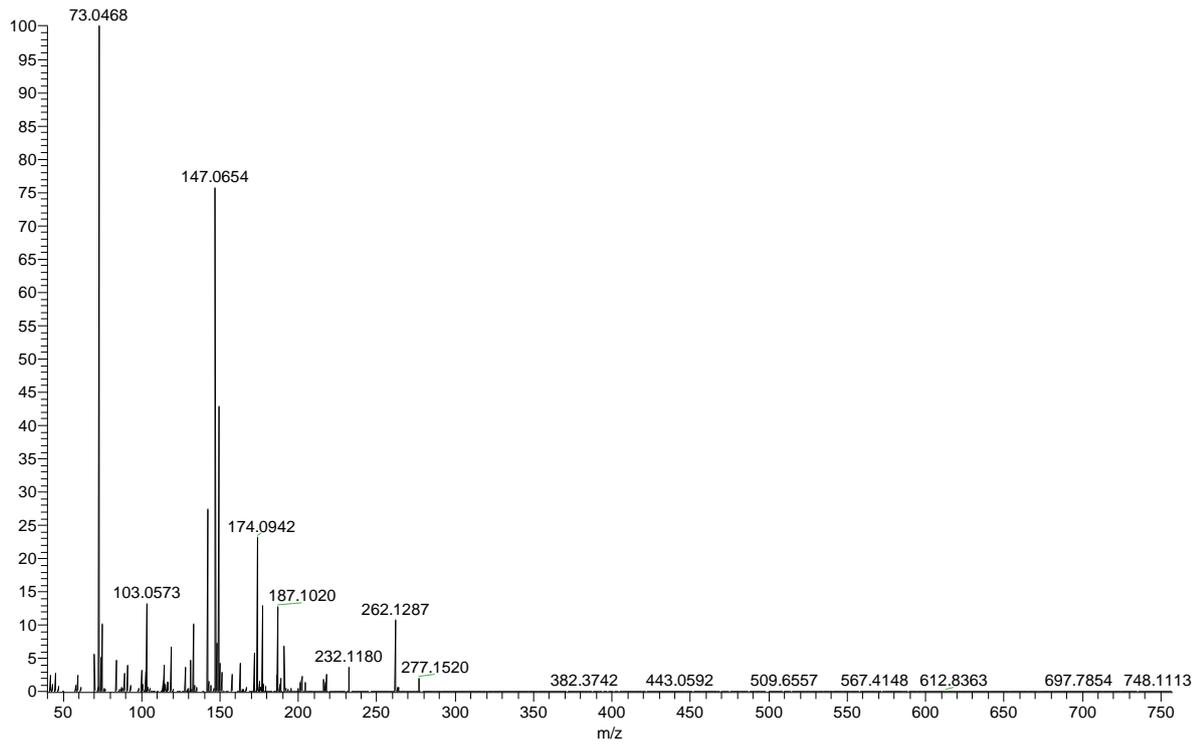


Abbildung 8-26: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Dihydroxyacetone nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

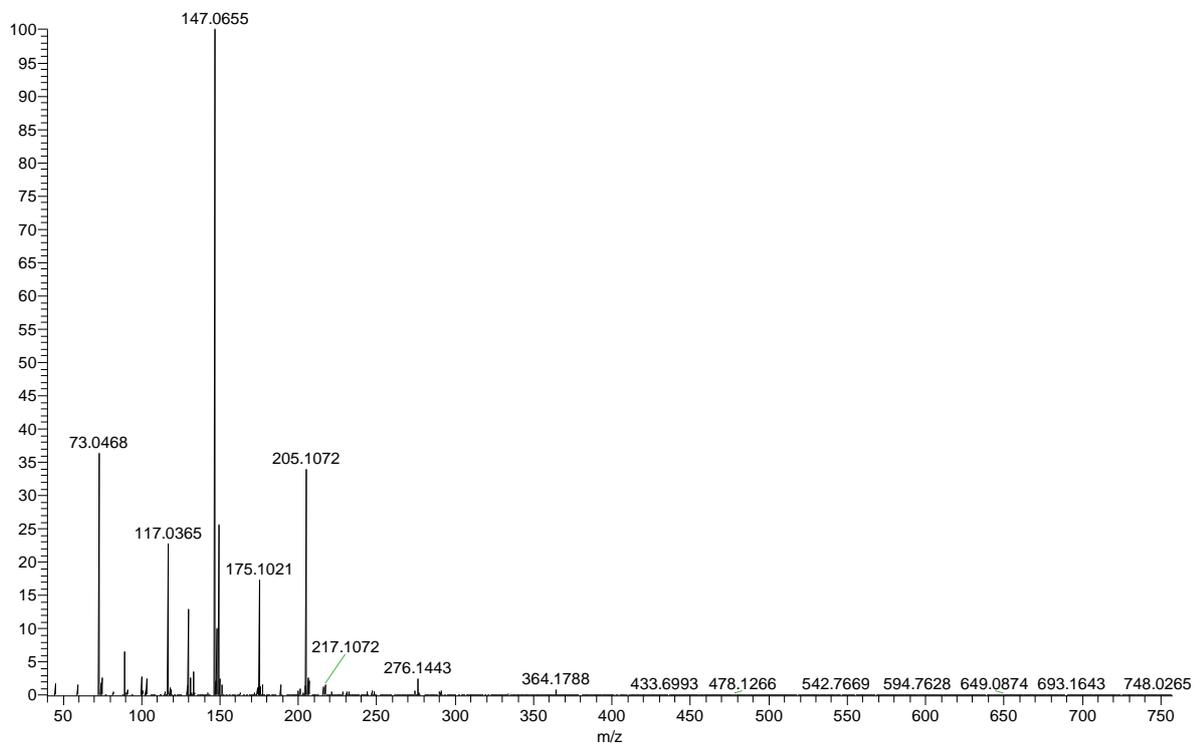


Abbildung 8-27: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldotetrosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

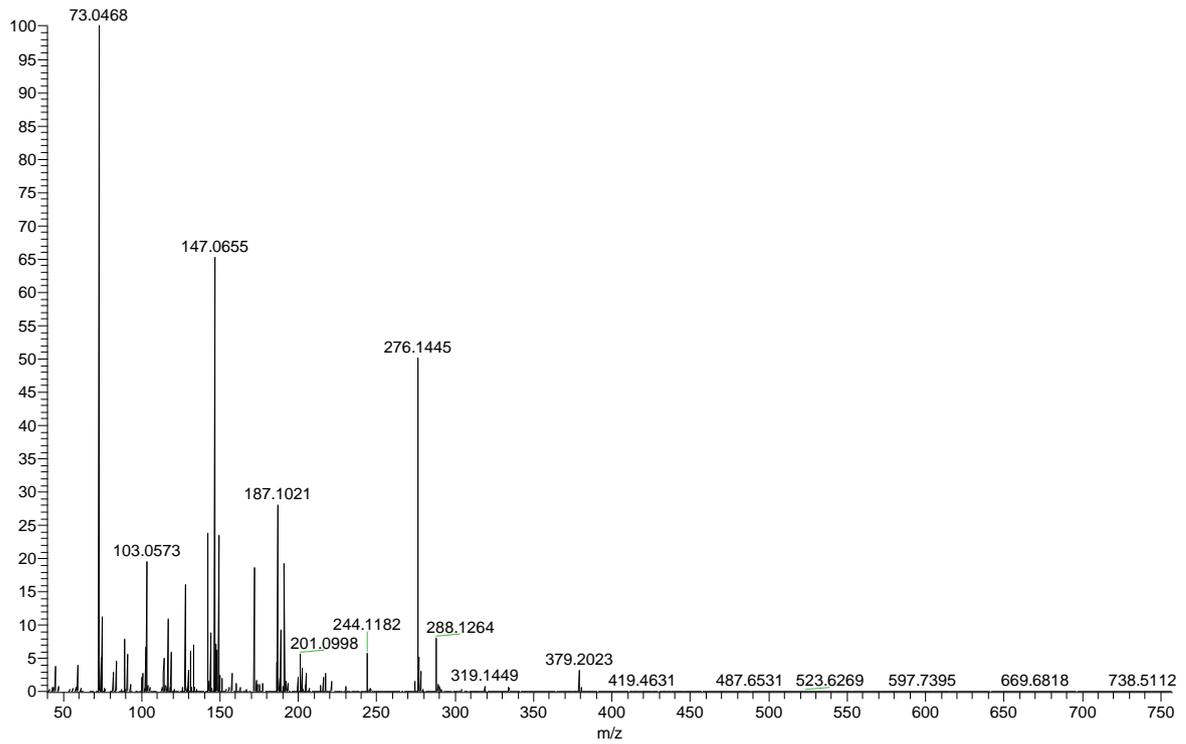


Abbildung 8-28: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Erythrose nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

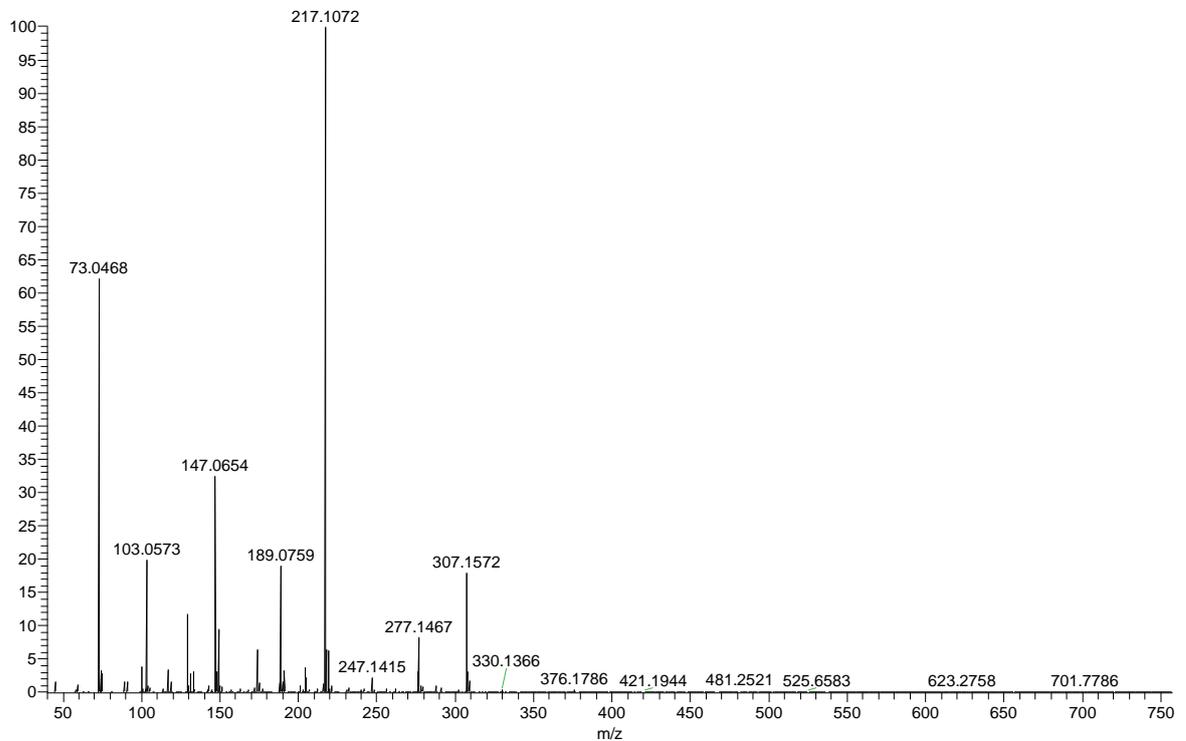


Abbildung 8-29: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldopentosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

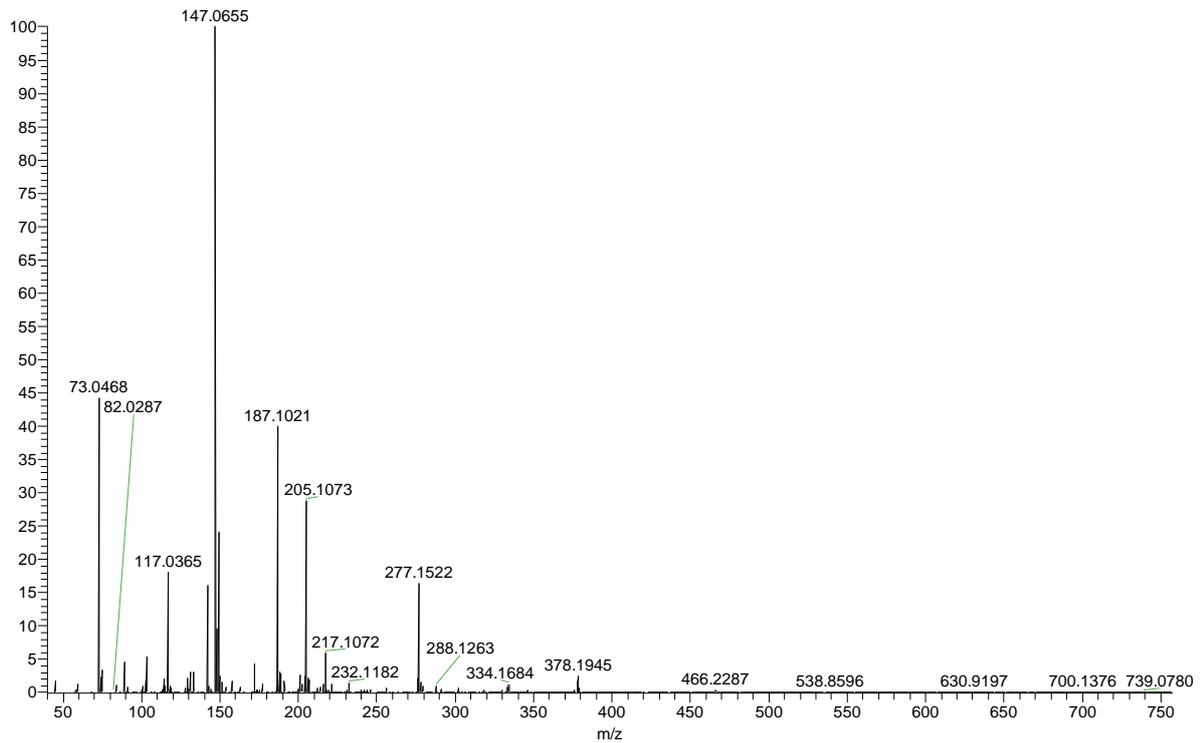


Abbildung 8-30: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Ketopentosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

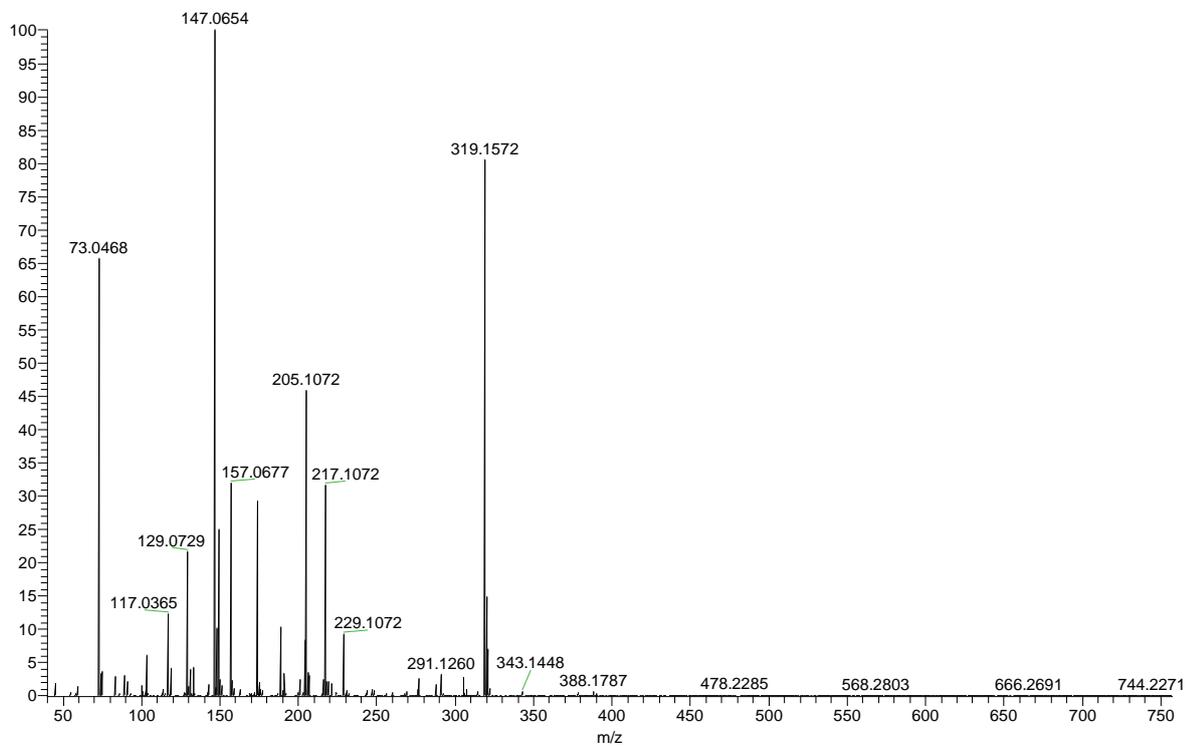


Abbildung 8-31: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldohexosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

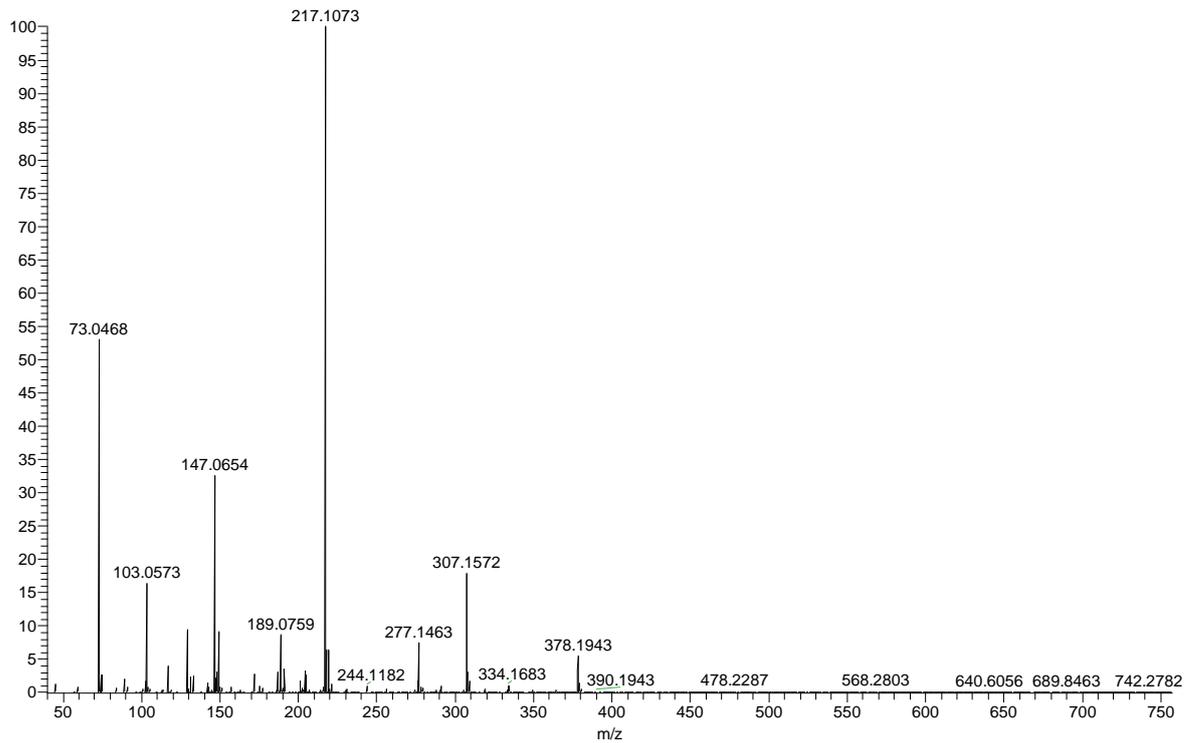


Abbildung 8-32: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Keto-hexosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

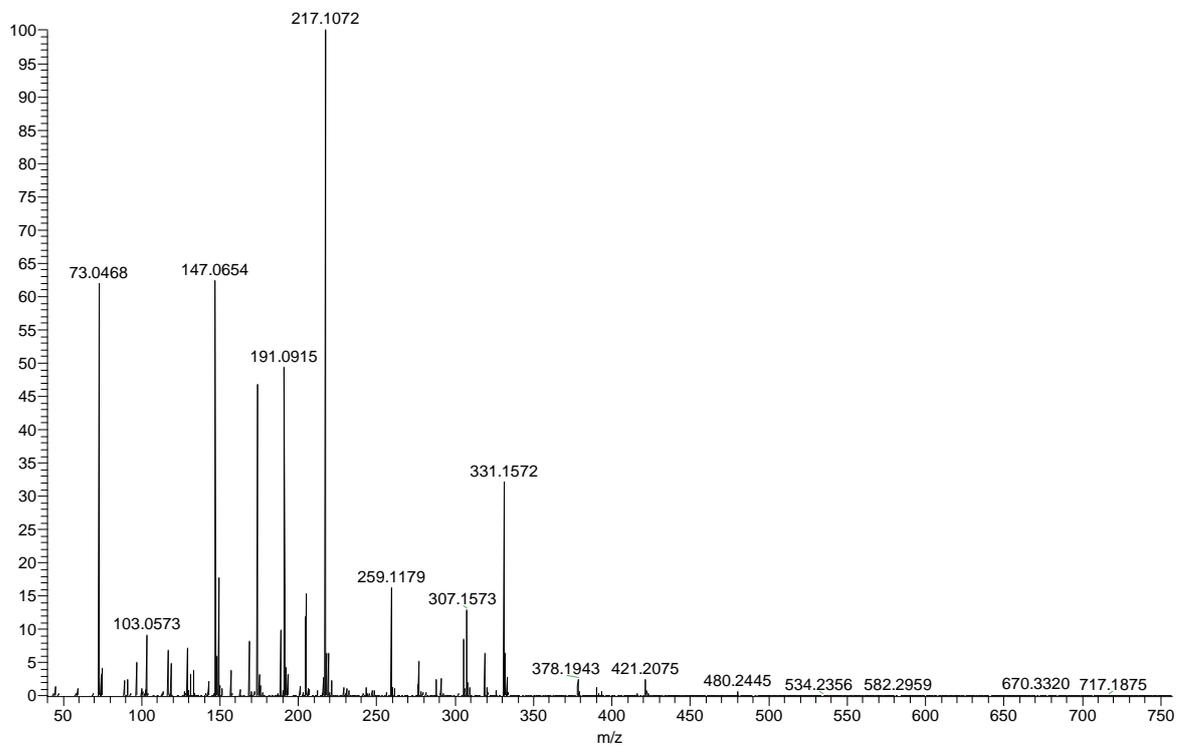


Abbildung 8-33: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Galactose nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

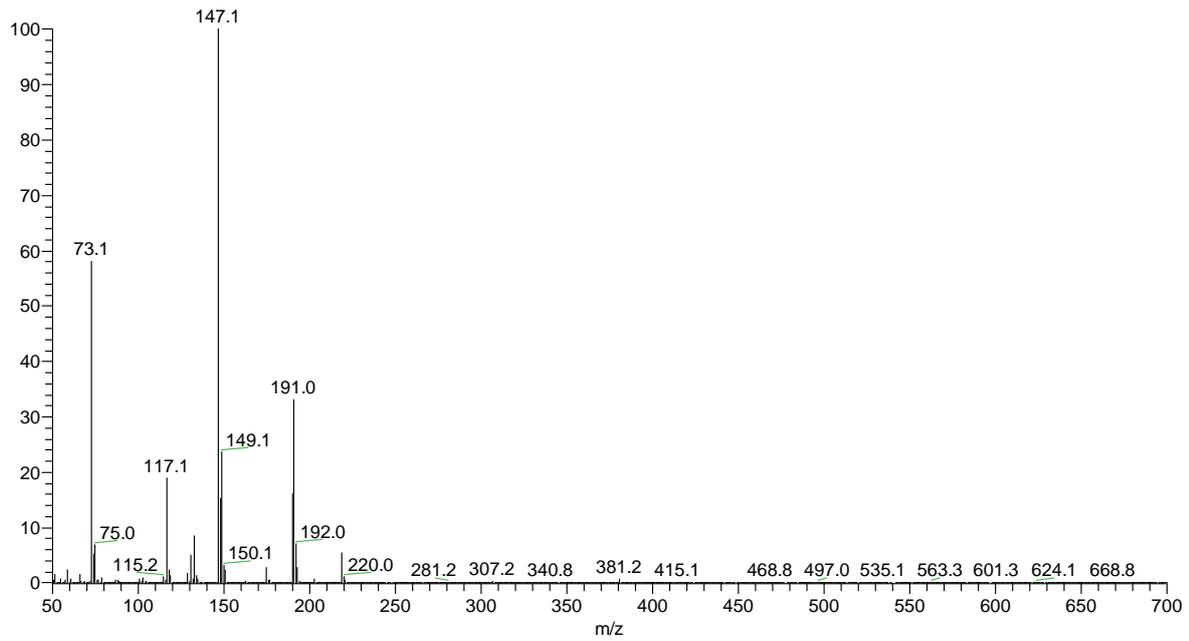


Abbildung 8-34: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Milchsäure nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

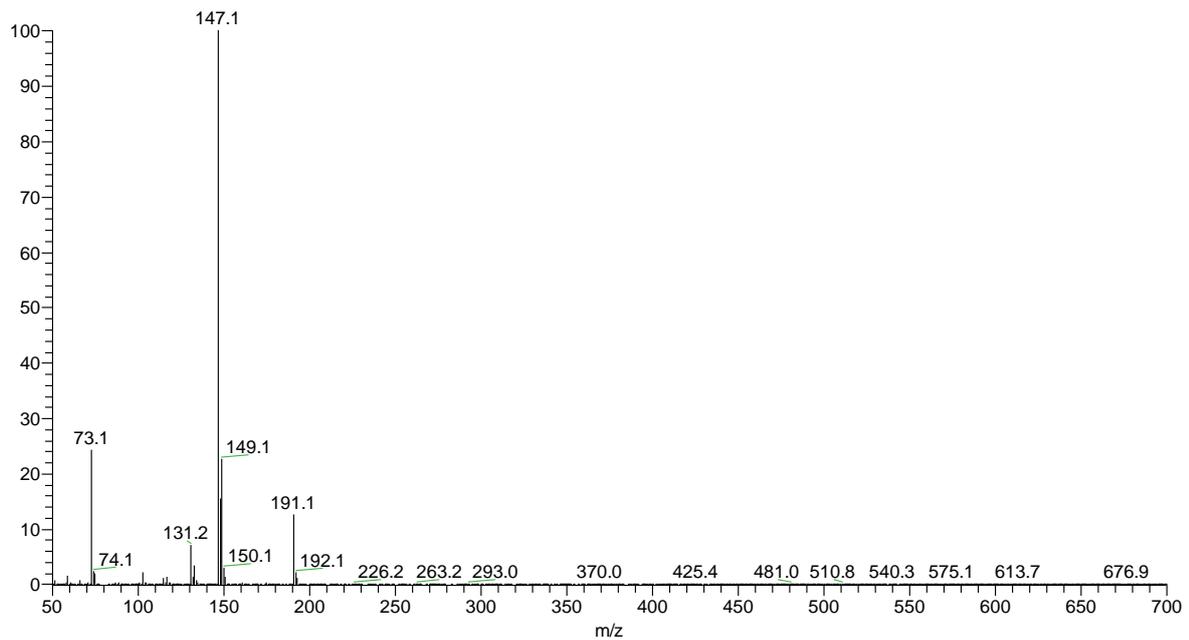


Abbildung 8-35: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glykol nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

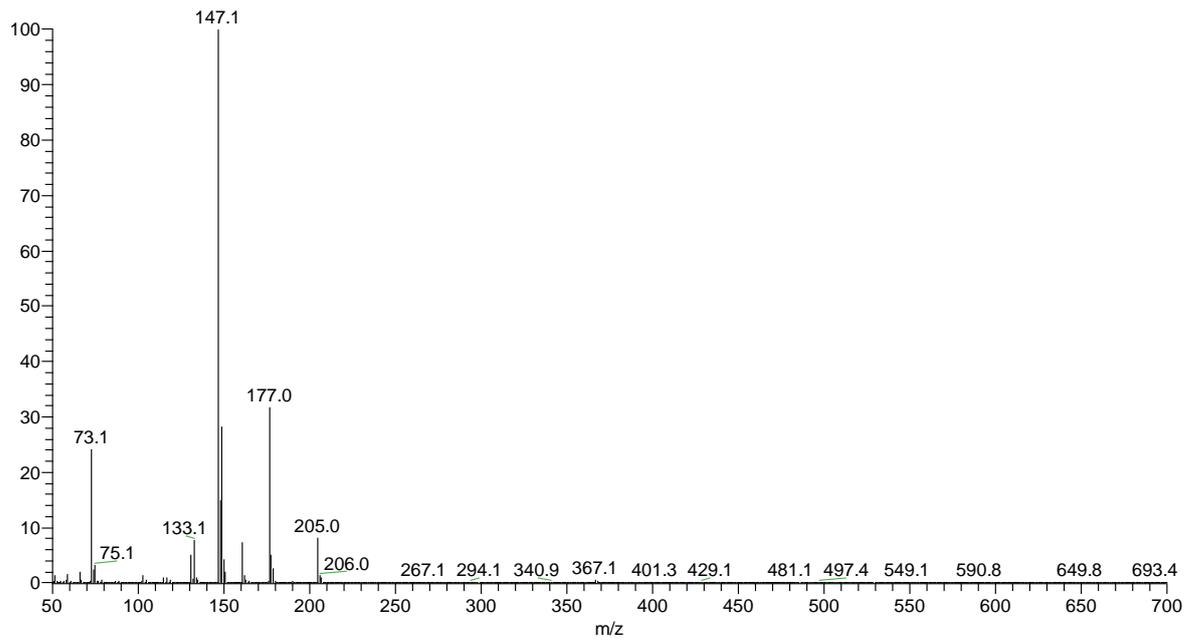


Abbildung 8-36: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycolsäure nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

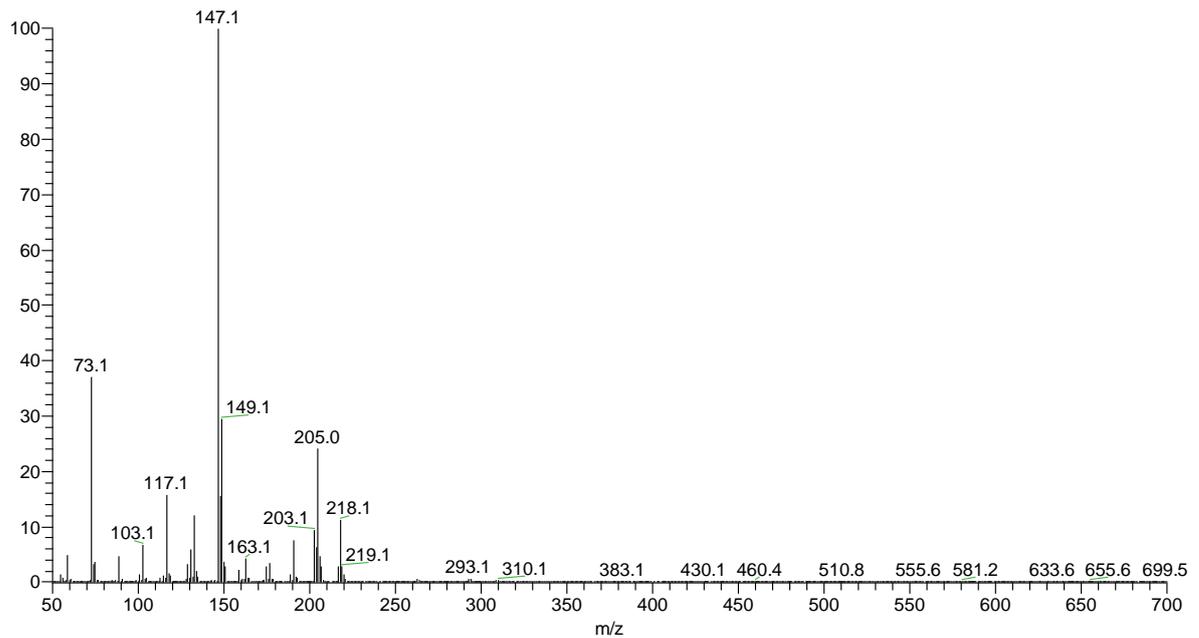


Abbildung 8-37: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycerin nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

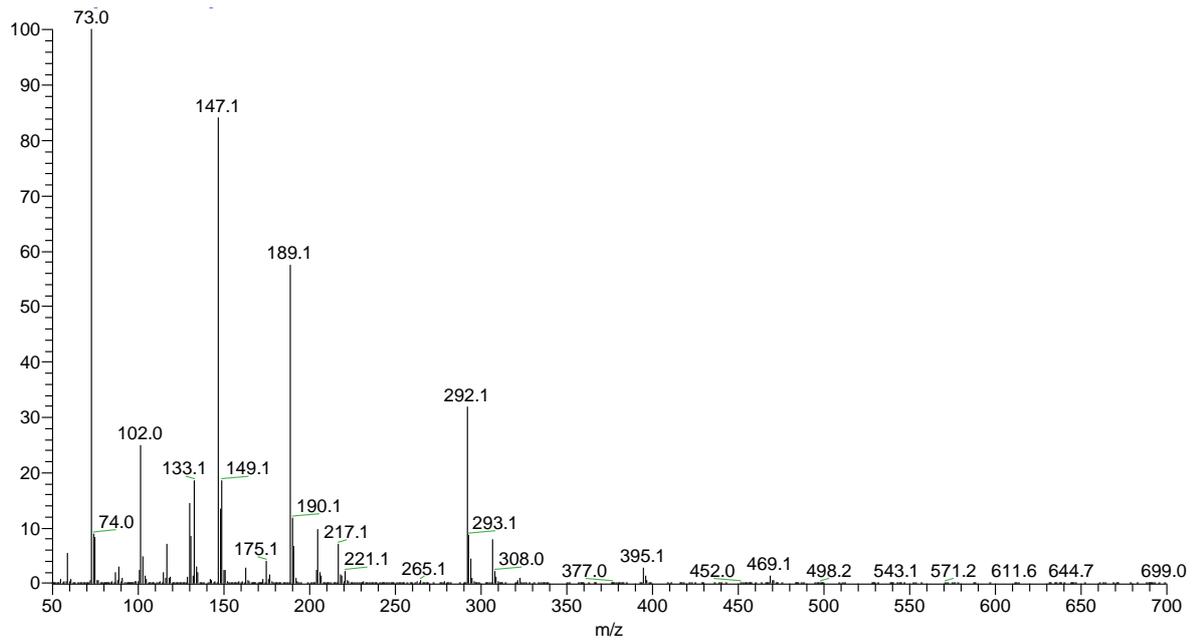


Abbildung 8-38: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycerinsäure nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

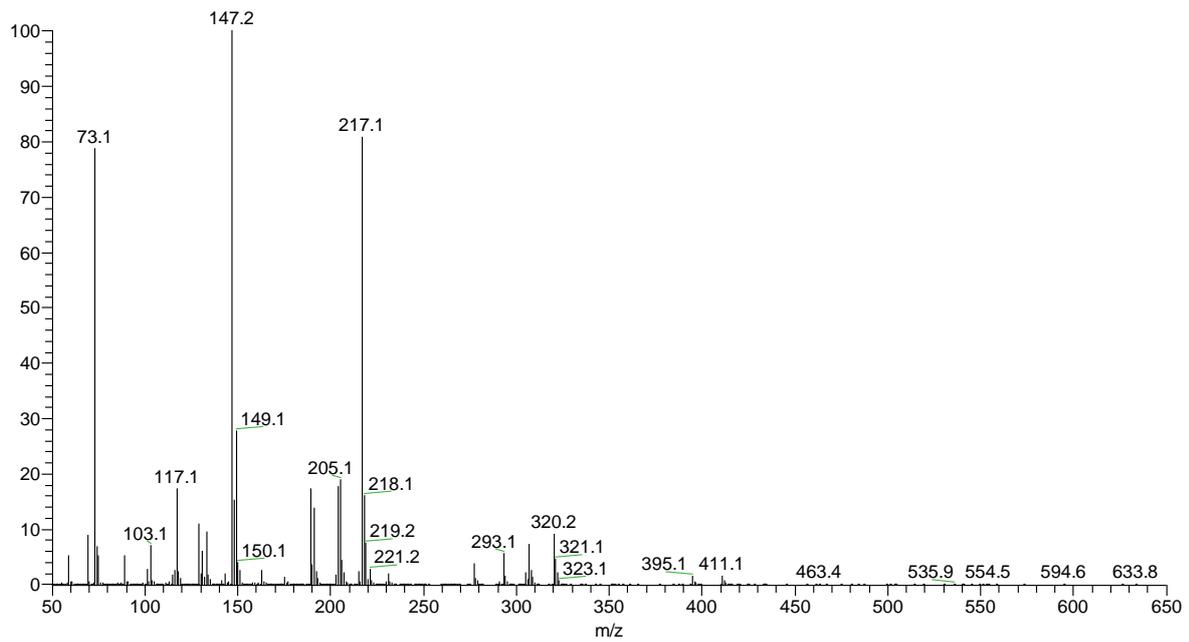


Abbildung 8-39: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Erythrit nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

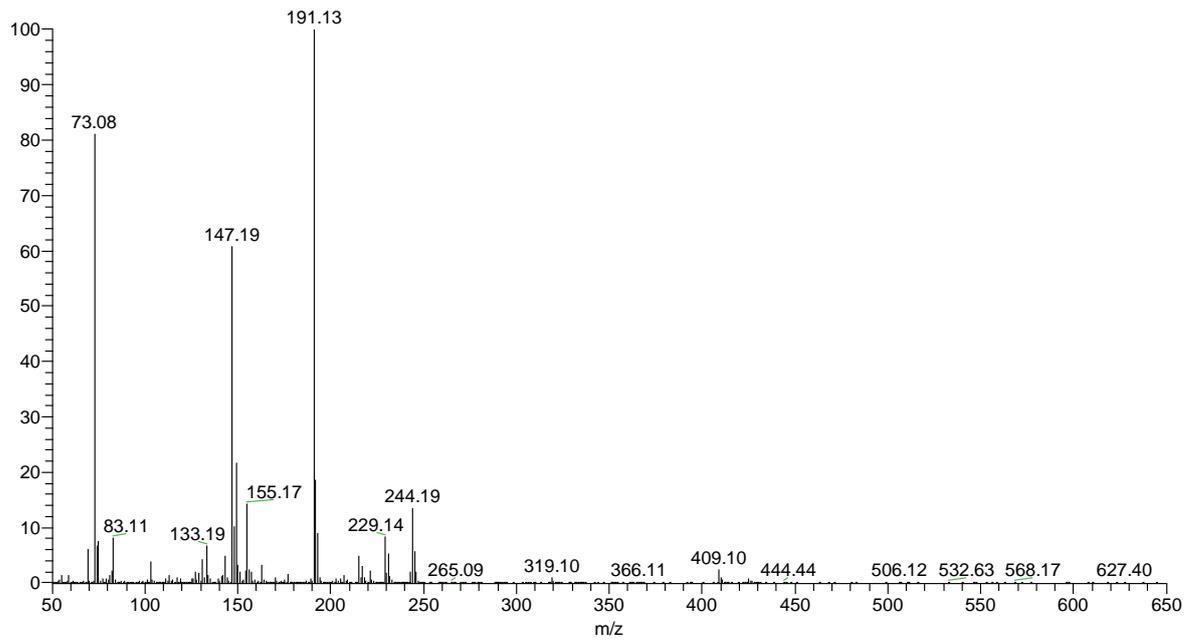


Abbildung 8-40: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Pentaerythrit nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

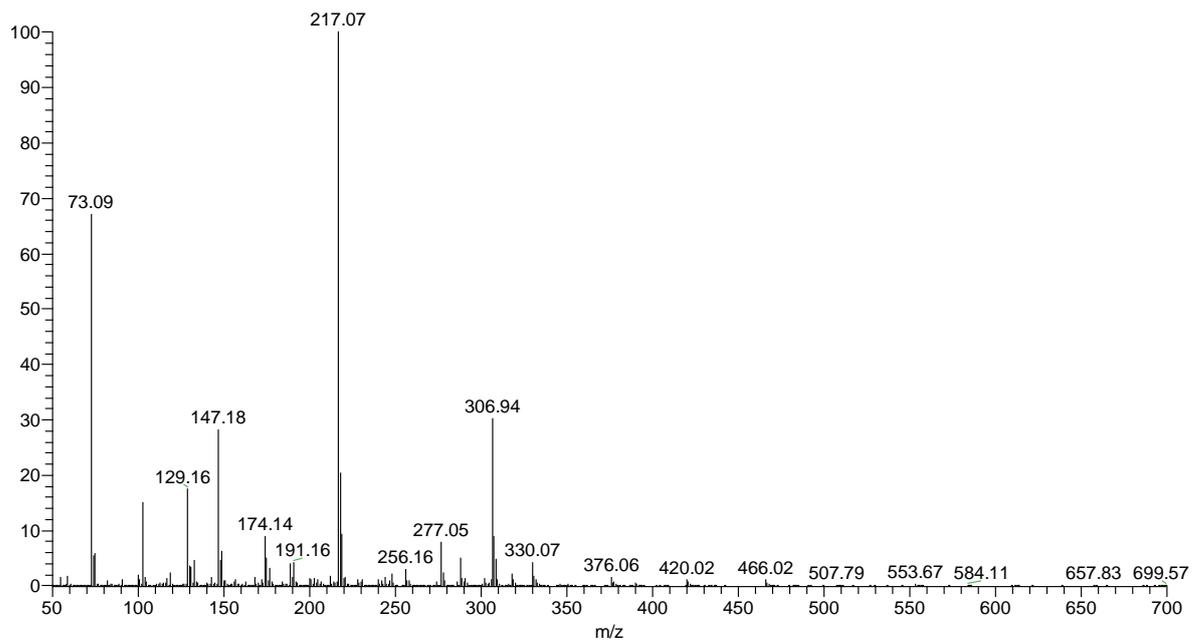


Abbildung 8-41: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Apiose nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

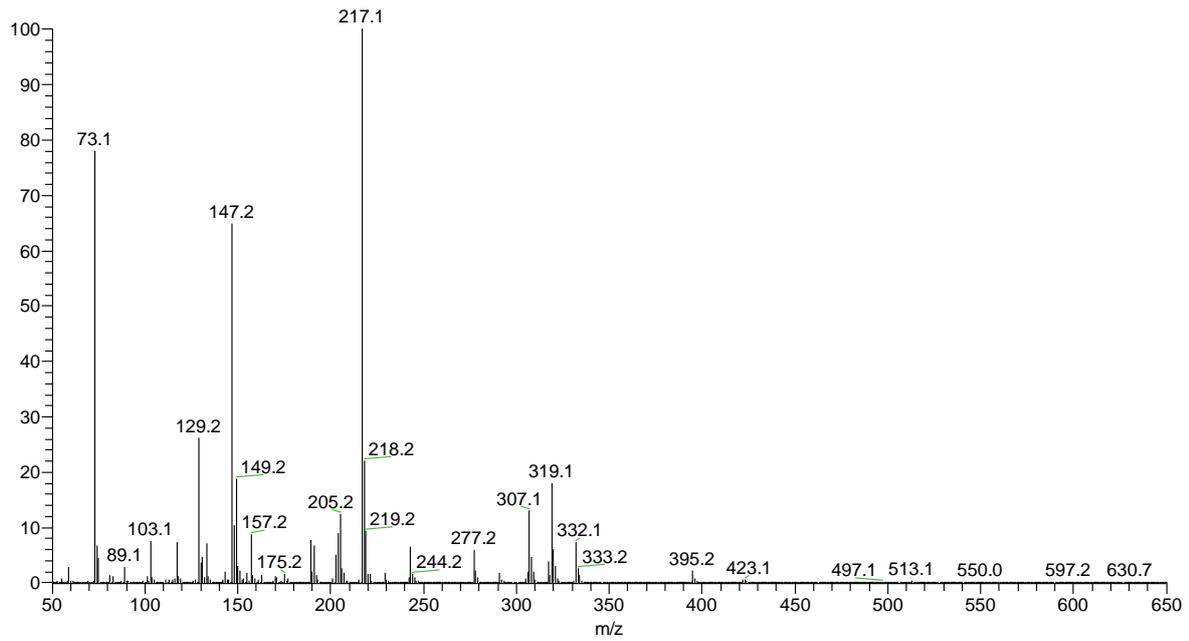


Abbildung 8-42: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Xylit nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

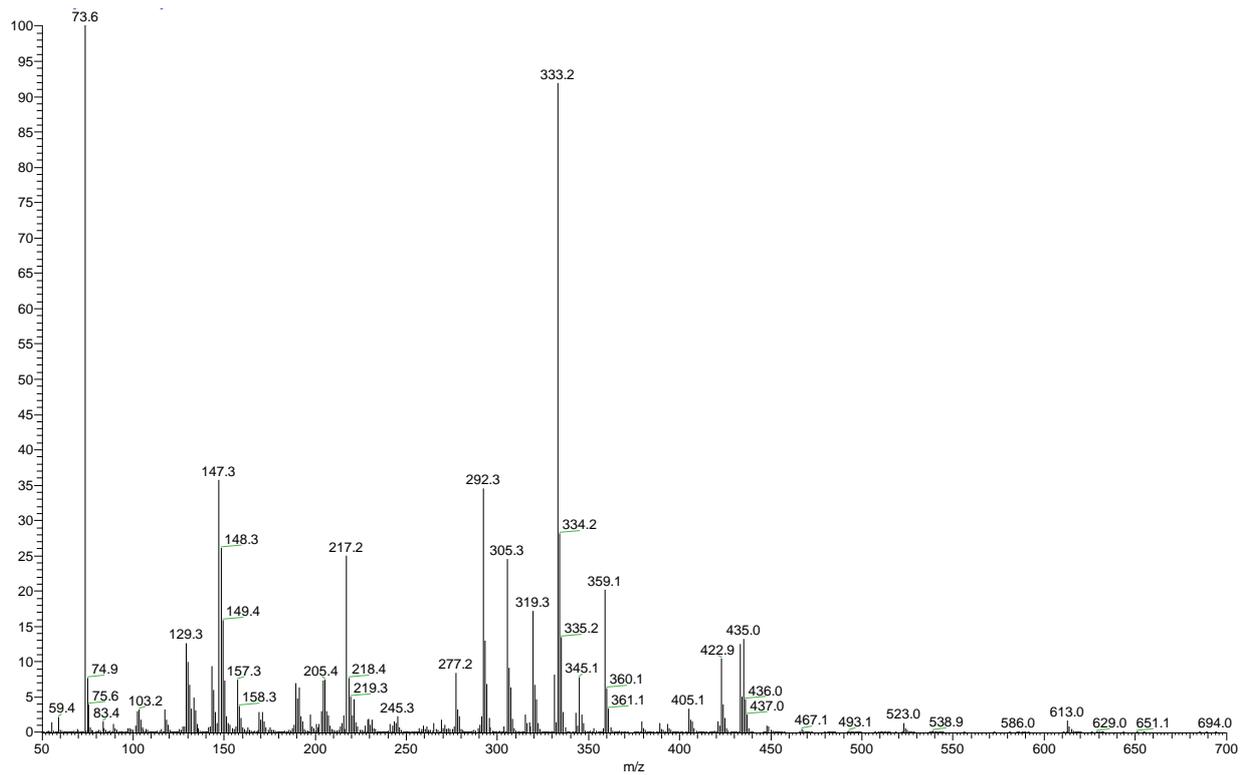


Abbildung 8-43: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Gluconsäure nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

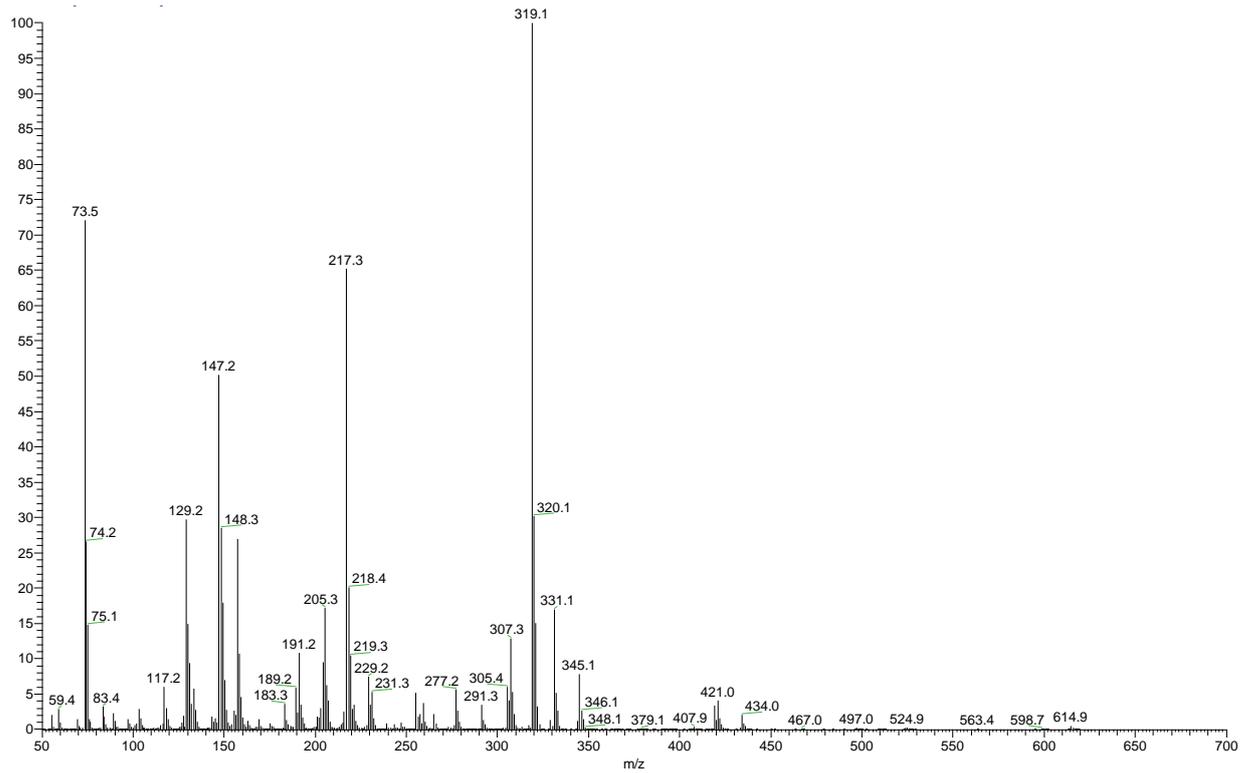


Abbildung 8-44: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Sorbit nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und BSTFA.

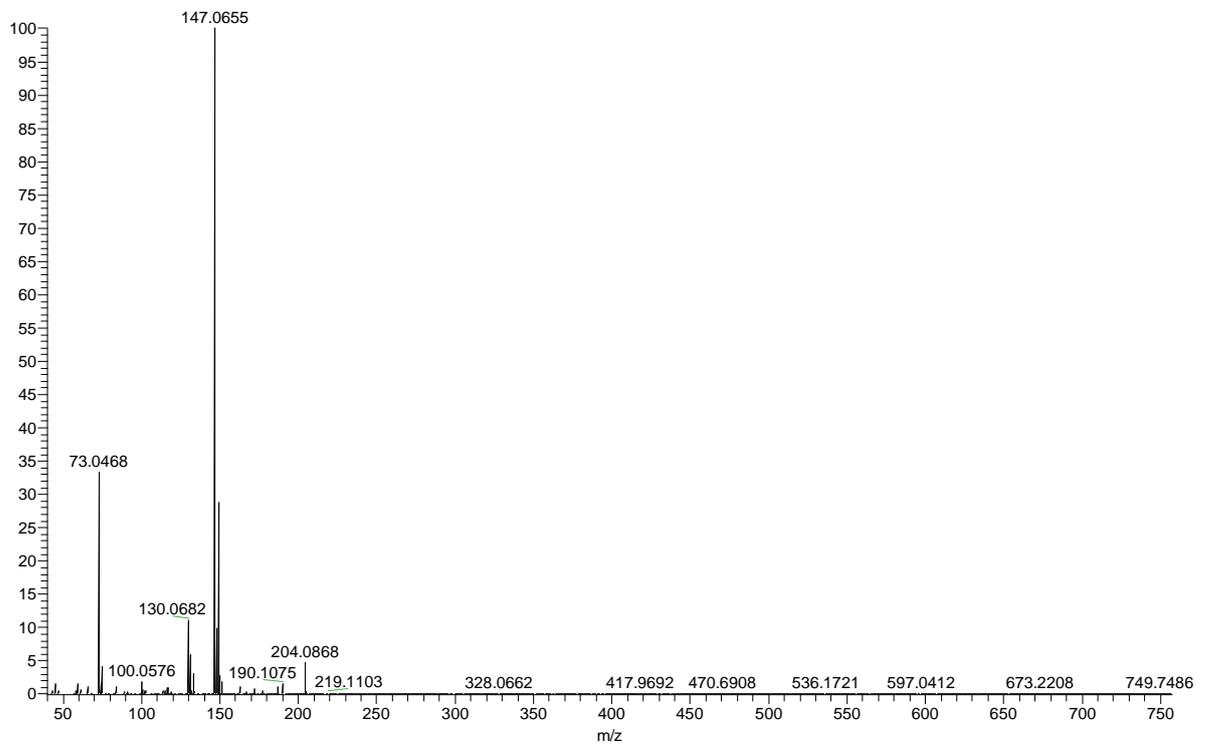


Abbildung 8-45: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycolaldehyd nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

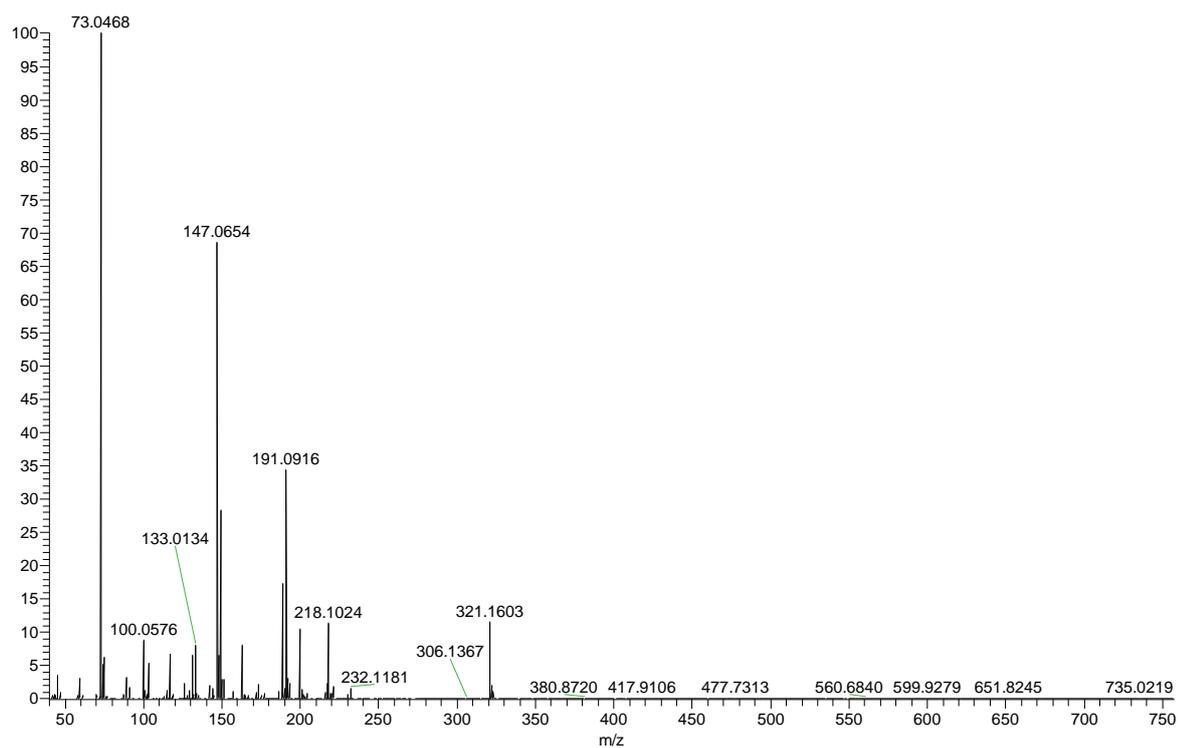


Abbildung 8-46: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycerinaldehyd nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

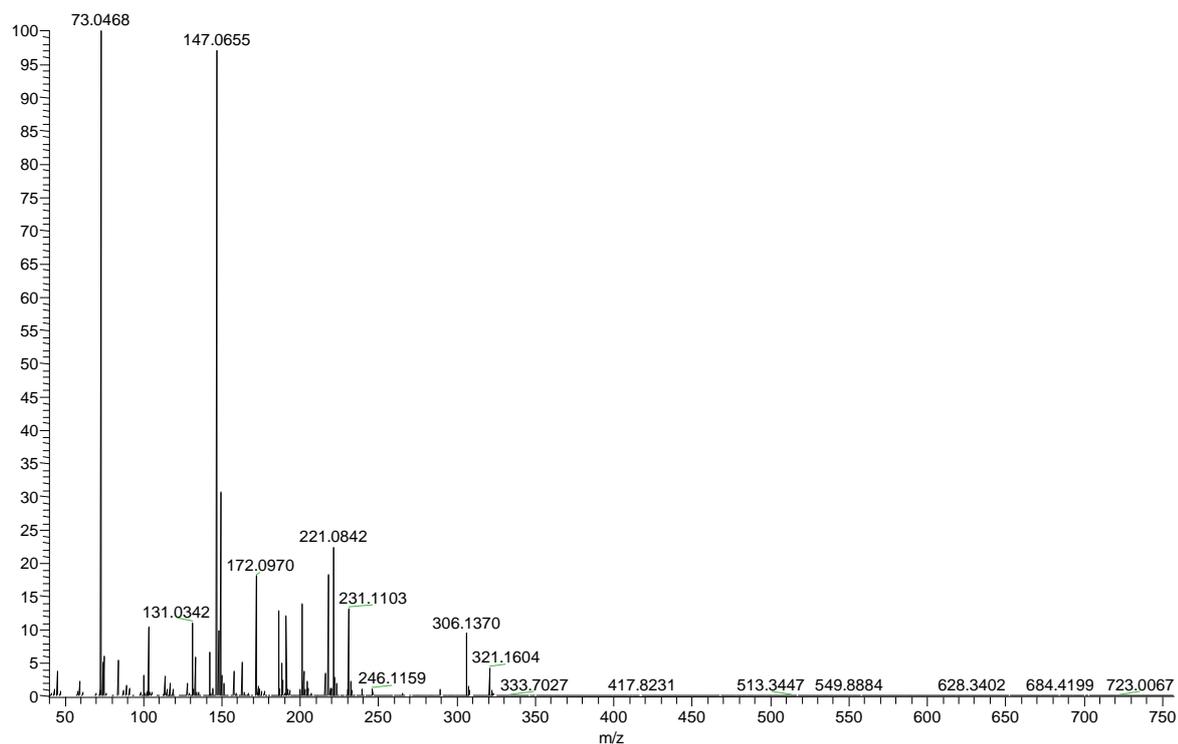


Abbildung 8-47: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Dihydroxyaceton nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

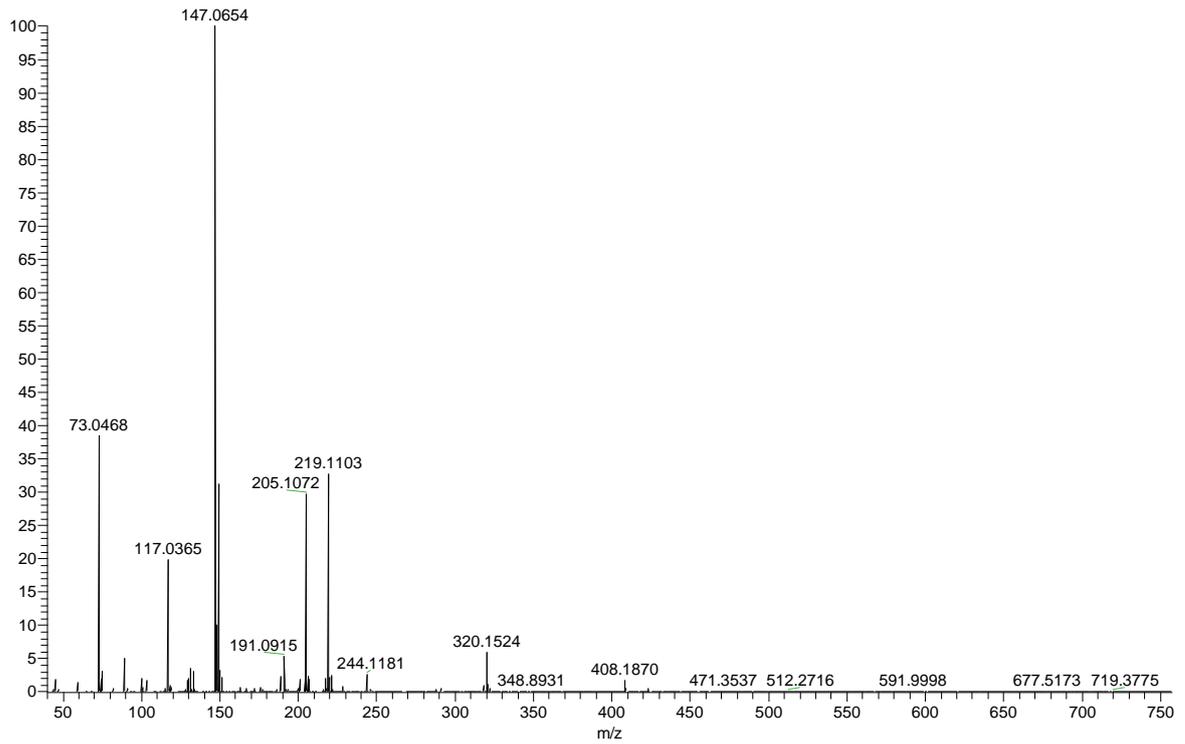


Abbildung 8-48: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldotetrosen nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

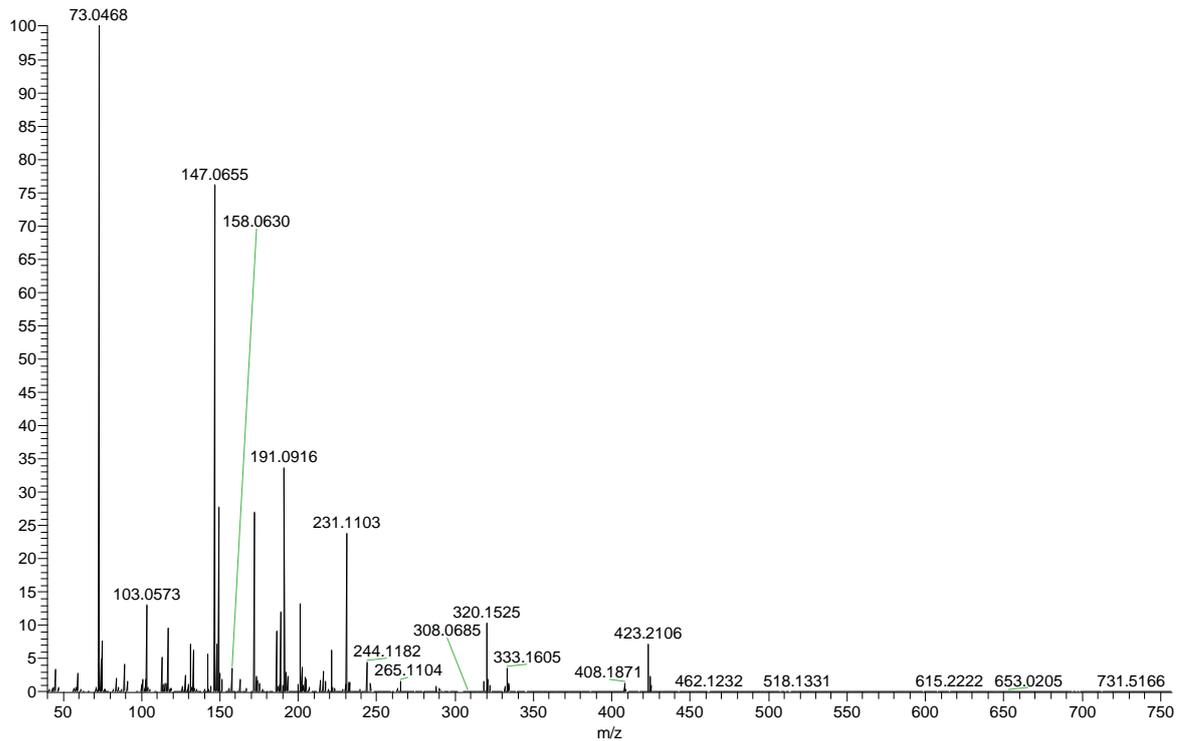


Abbildung 8-49: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Erythulose nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

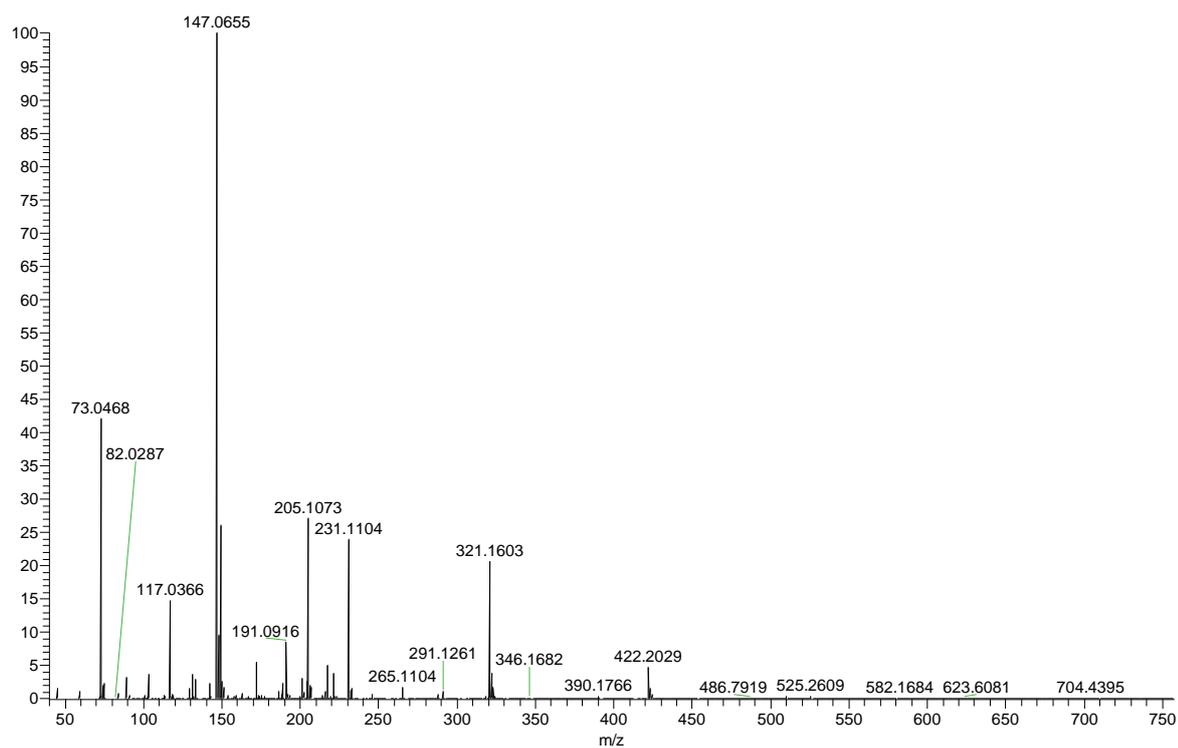


Abbildung 8-50: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Ketopentosen nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

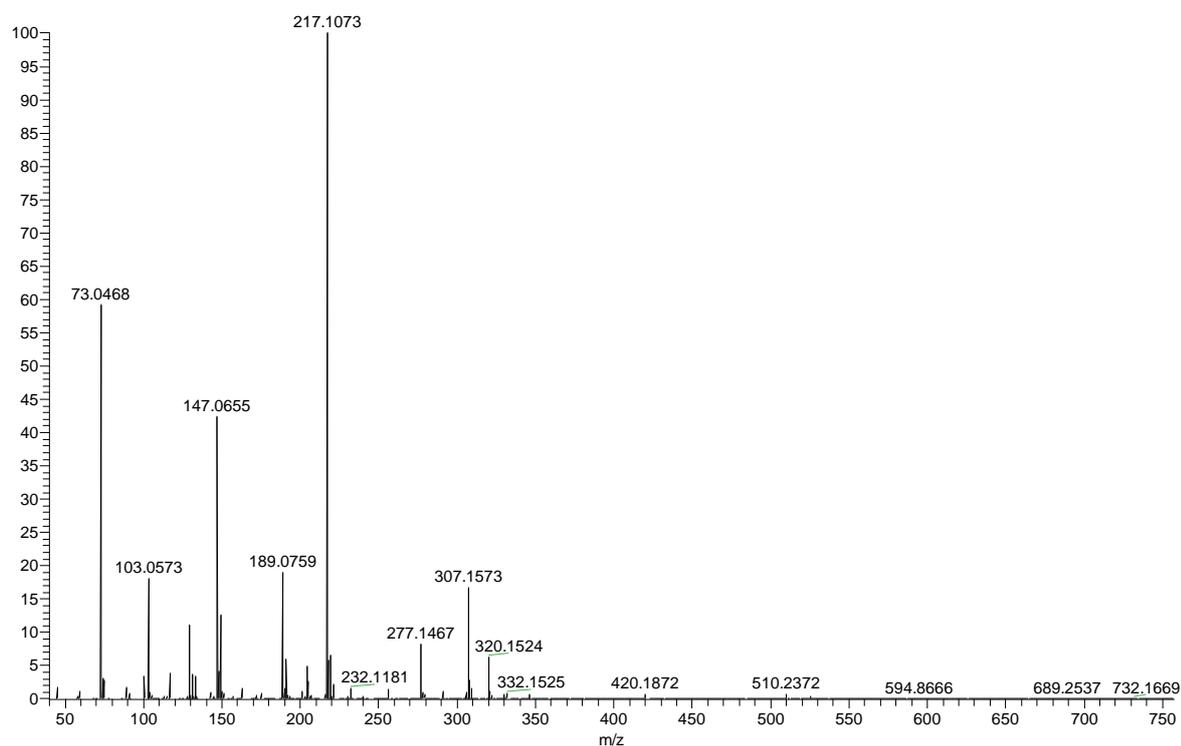


Abbildung 8-51: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldopentosen nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

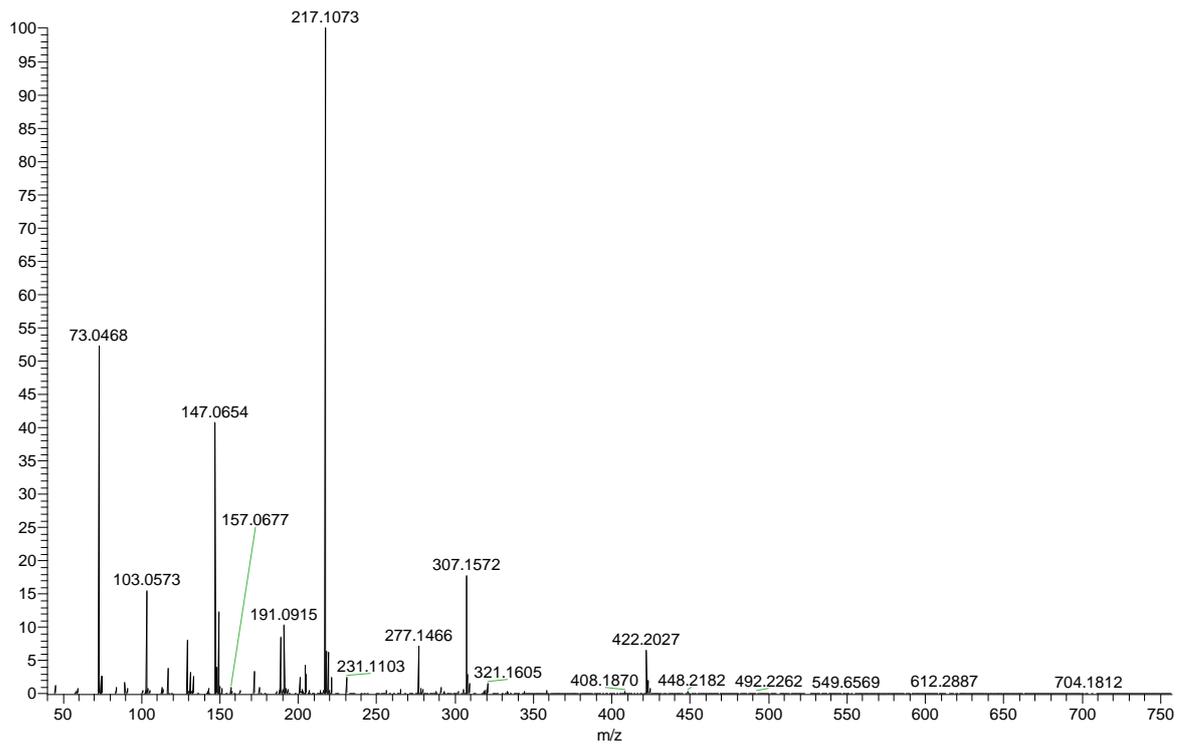


Abbildung 8-52: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Ketohexosen nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

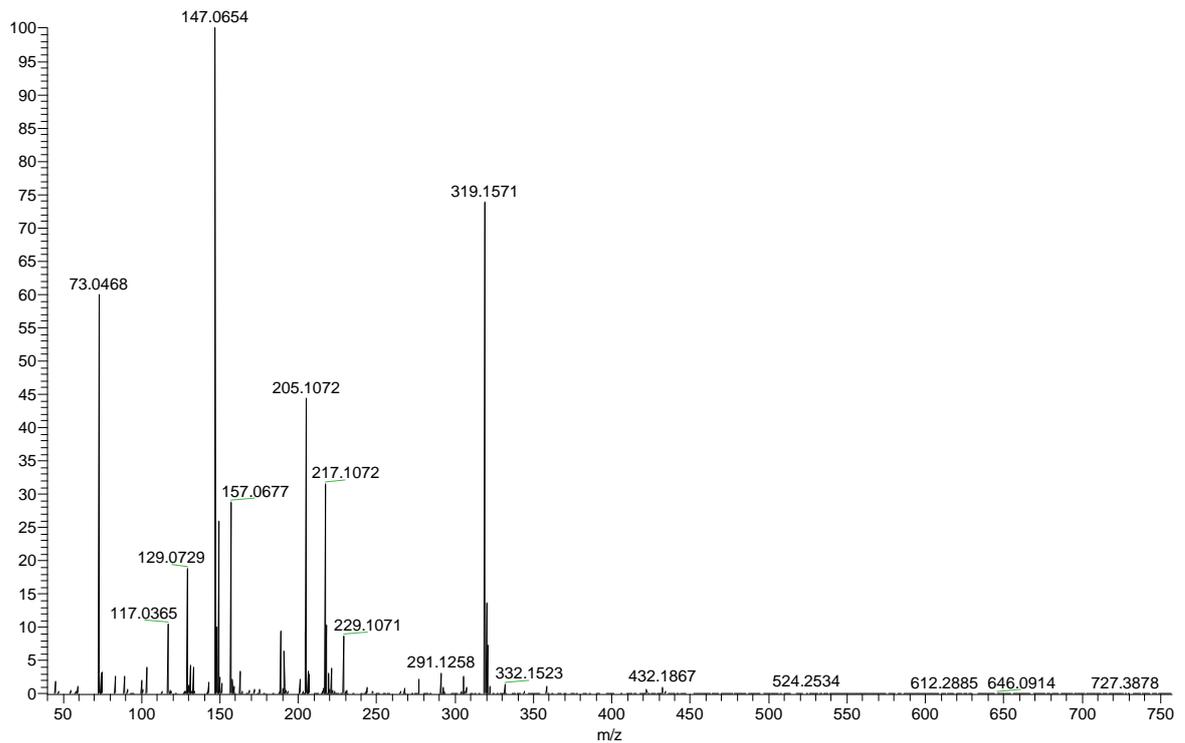


Abbildung 8-53: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldohexosen nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

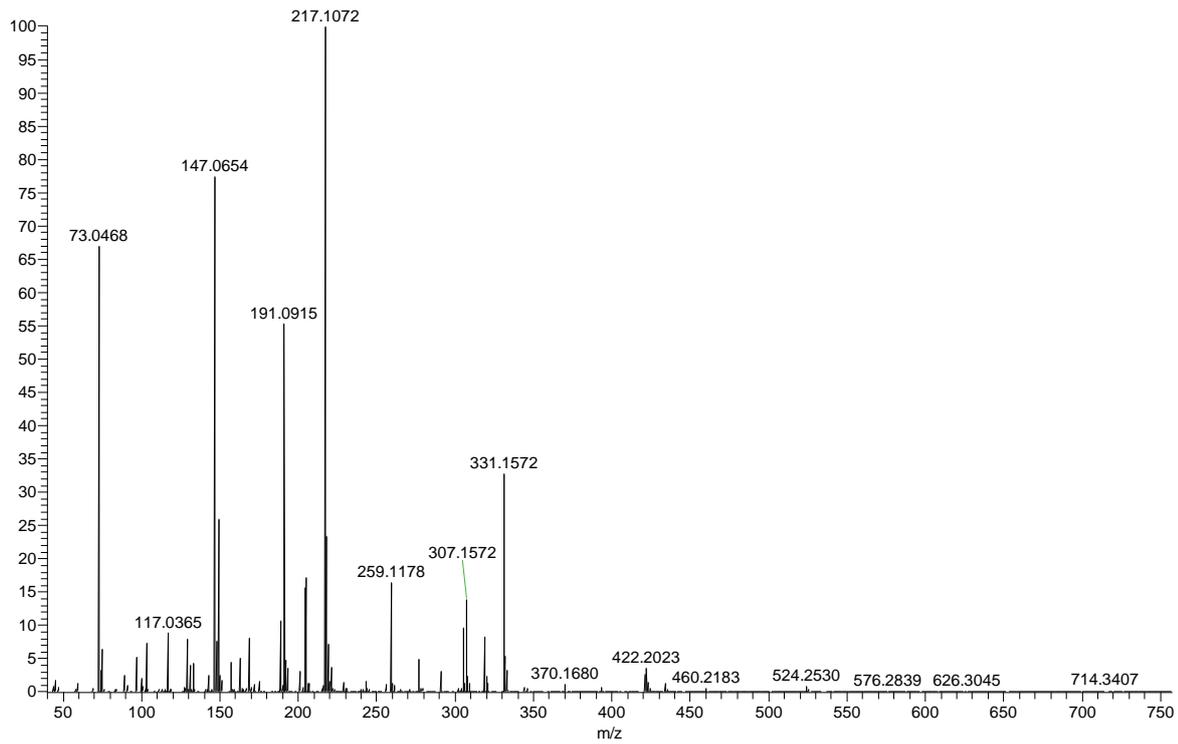


Abbildung 8-54: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Galactoheptose nach Derivatisierung mit HCl und BSTFA.

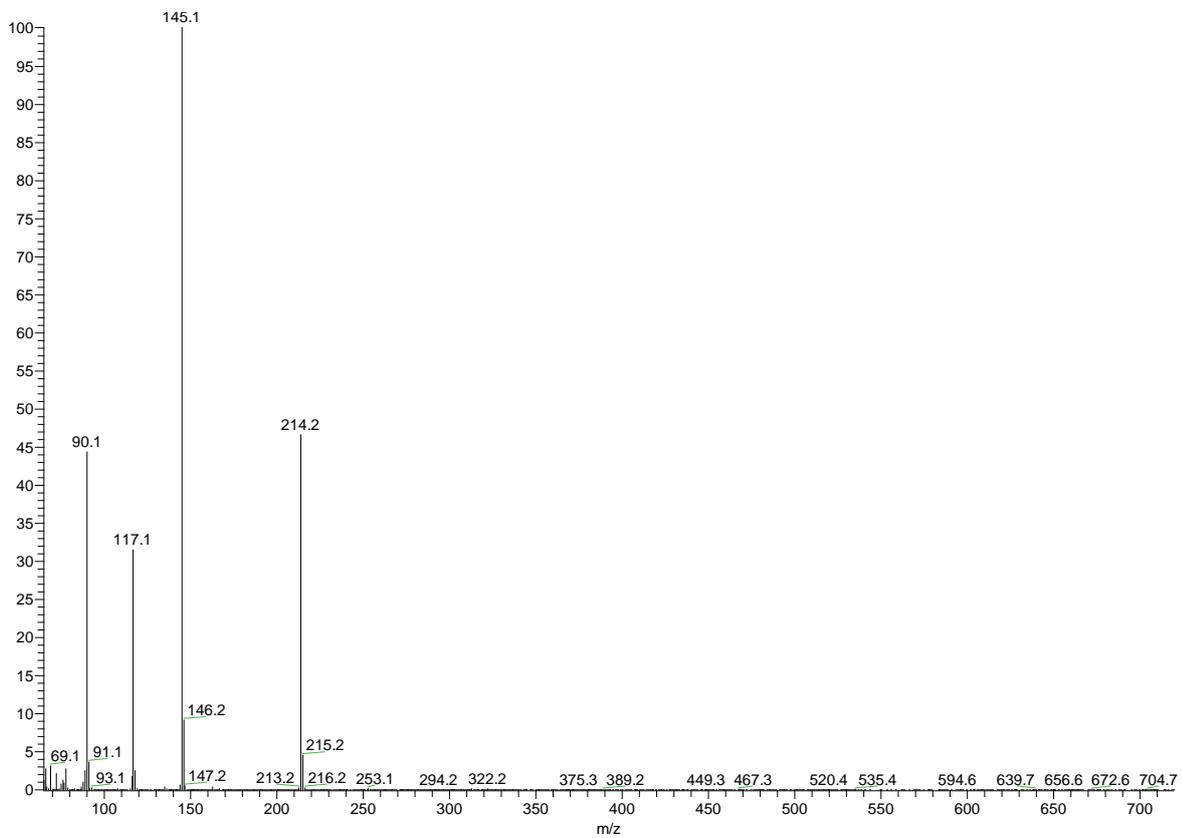


Abbildung 8-55: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycolaldehyd nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

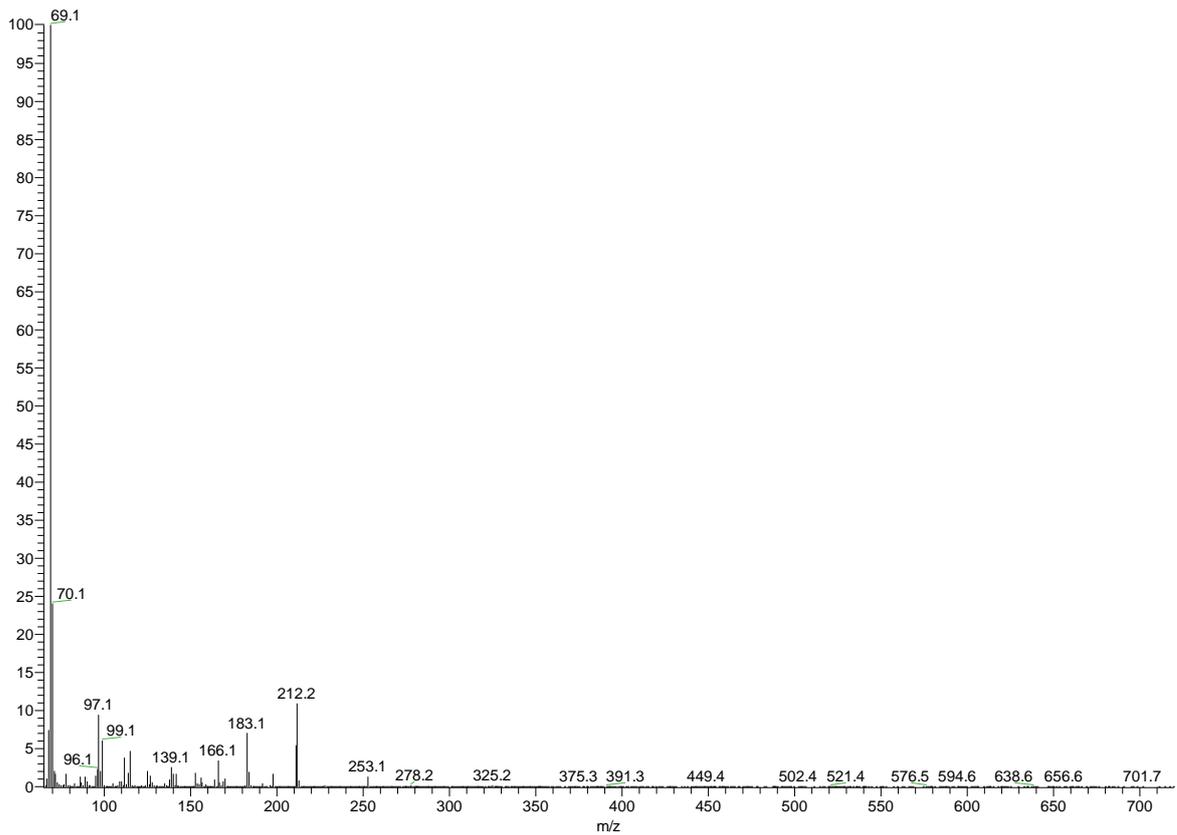


Abbildung 8-56: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Glycerinaldehyd nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

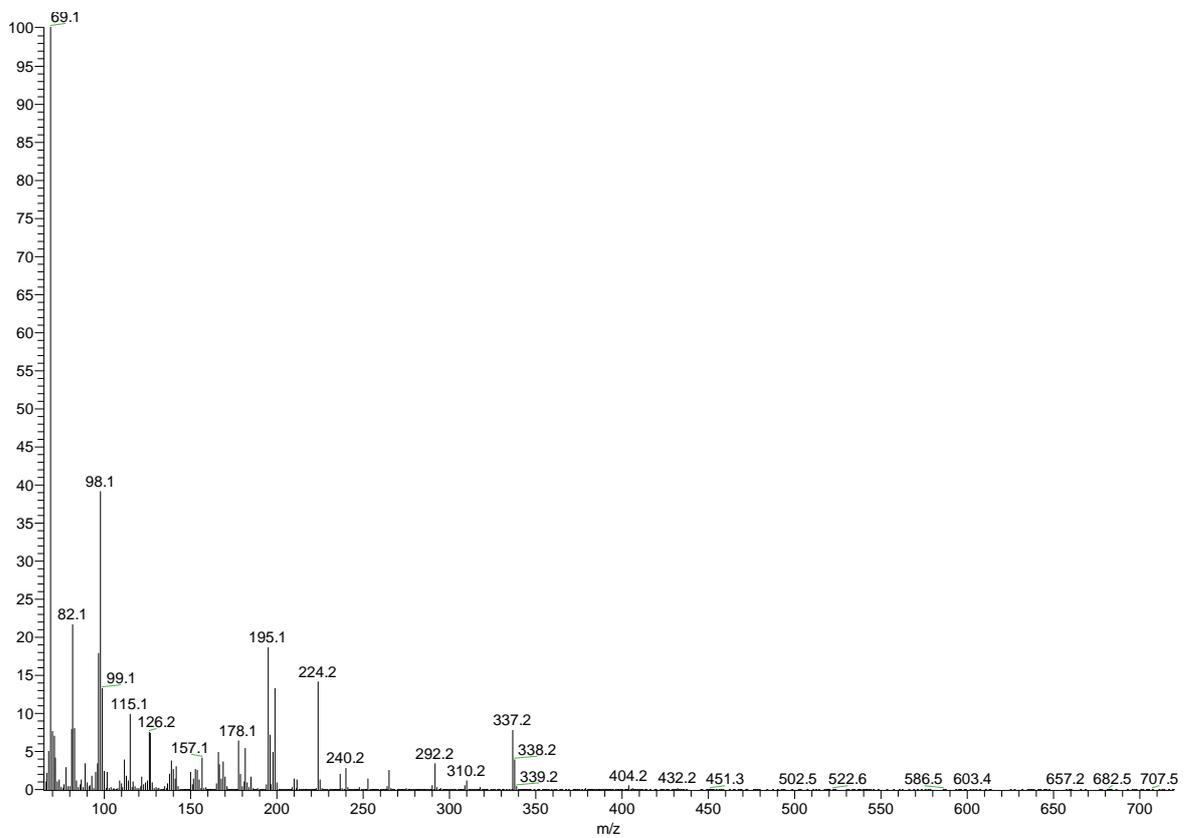


Abbildung 8-57: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldotetrosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

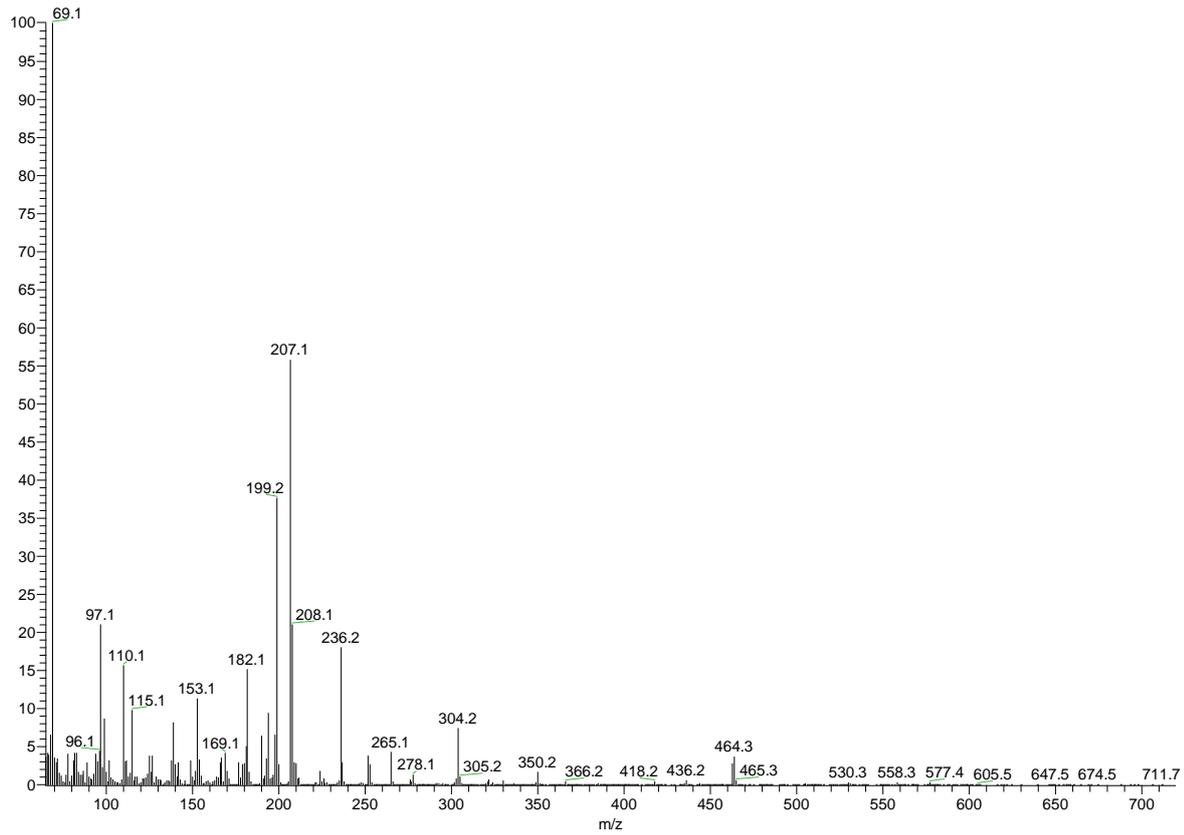


Abbildung 8-58: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldopentosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

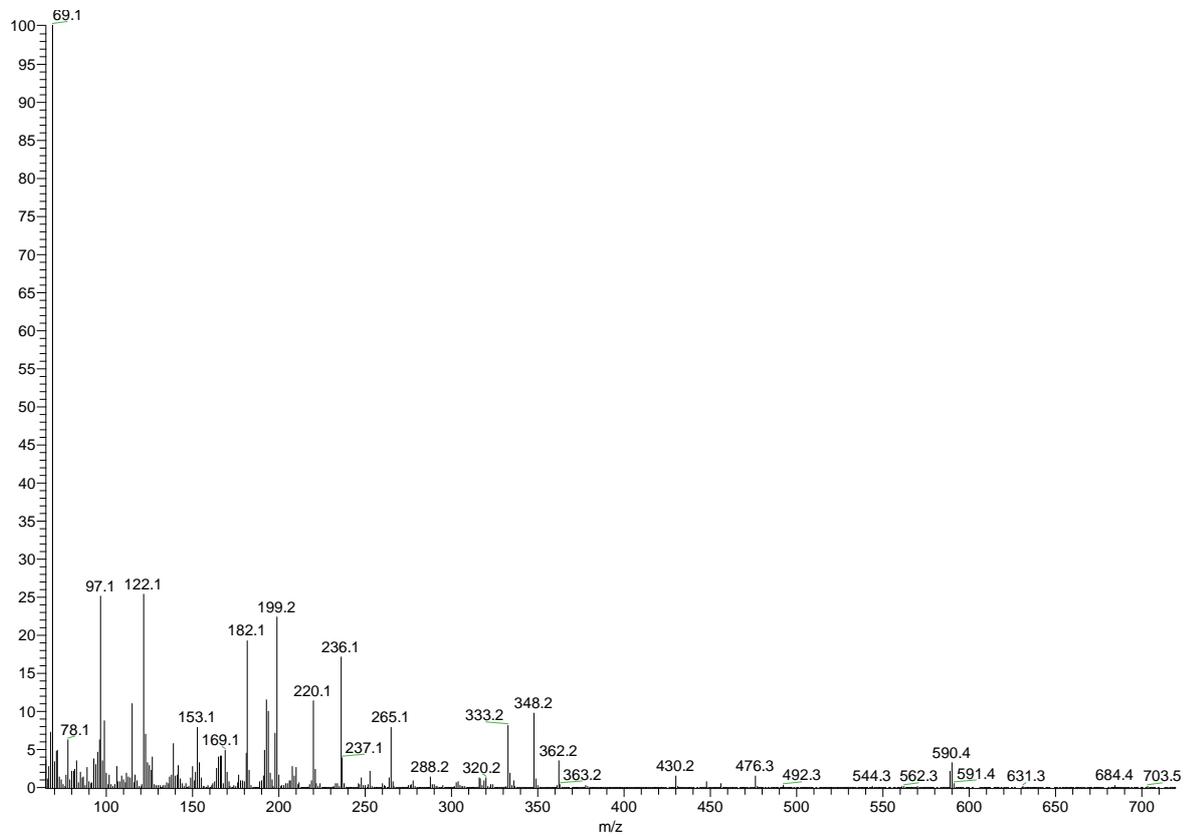


Abbildung 8-59: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum der Aldohexosen nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

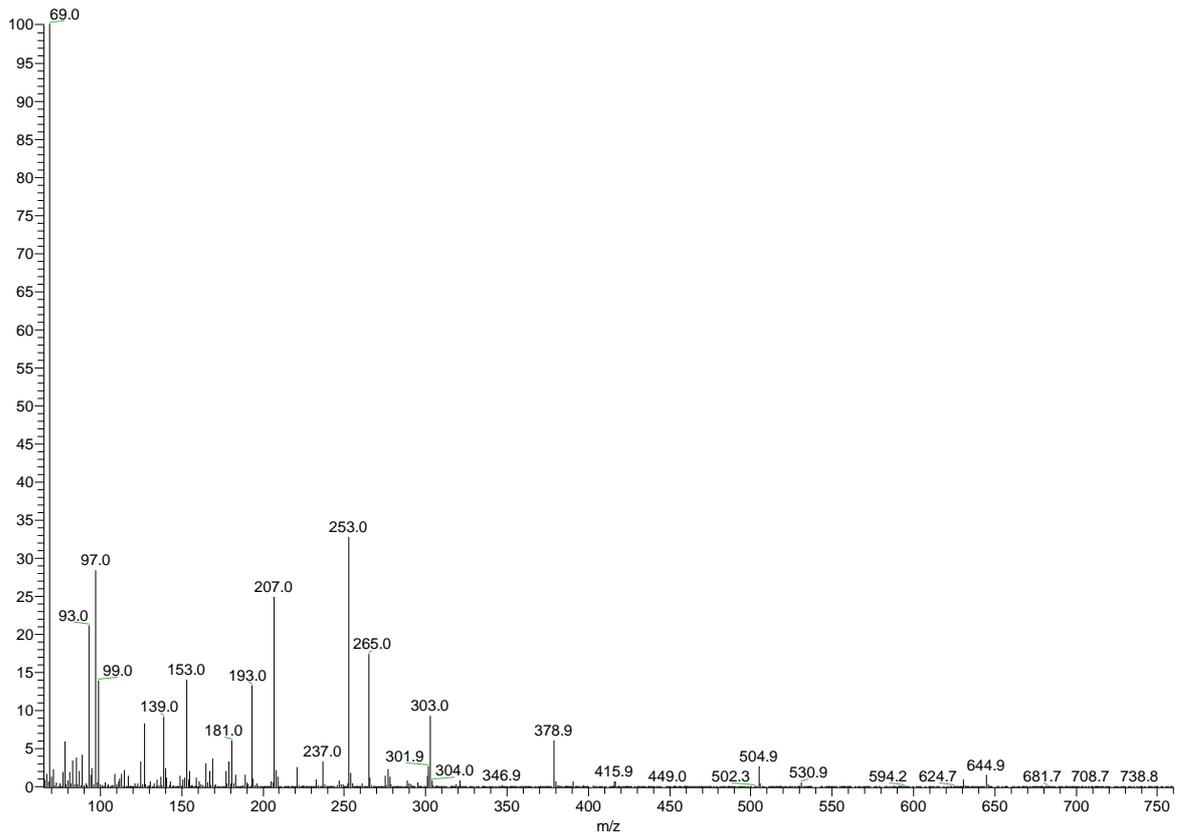


Abbildung 8-60: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Sorbit nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

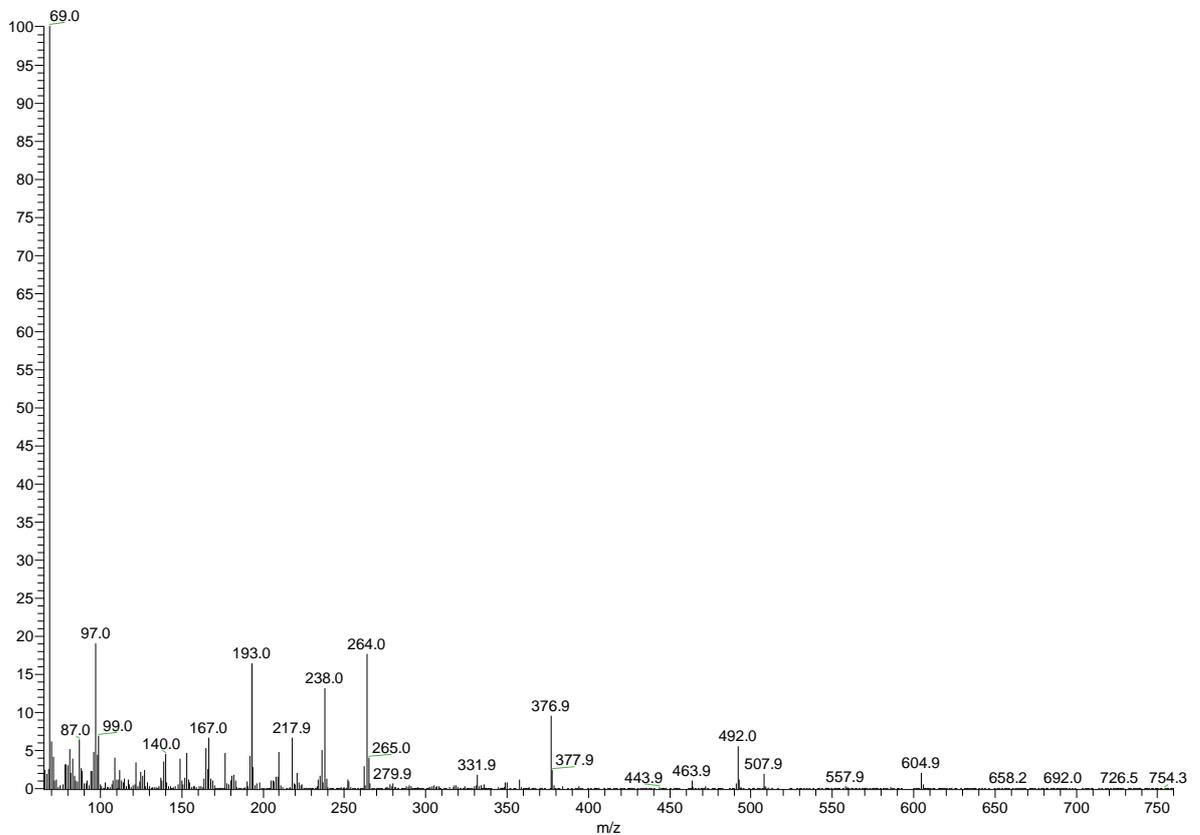


Abbildung 8-61: EI<sup>+</sup>-Massenspektrum von Gluconsäure nach Derivatisierung mit EtOx·HCl und MBTFA.

Tabelle 8-4: Herkunft der verwendeten Mineralien.

Mineral	Klasse	Herkunft	Fundort
<b>Fuchsit</b>	Glimmer	Mineralienhandel Dipl. Geol. A. Spinn, Erlangen, Deutschland	Brasilien
<b>Calcit</b>	Carbonat	Mineralienhandel Dipl. Geol. A. Spinn, Erlangen, Deutschland	unbekannt
<b>Muskovit</b>	Glimmer	Mineralienhandel Dipl. Geol. A. Spinn, Erlangen, Deutschland	Brasilien
<b>Analcim</b>	Zeolith	Alfa Aesar, Haverhill, USA	unbekannt
<b>Colemanit</b>	Borat	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	USA, California, Borax Mine
<b>Anhydrit</b>	Sulfat	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	Deutschland, Kohnstedt Steinbruch
<b>Apatit</b>	Phosphat	abcr, Karlsruhe, Deutschland	unbekannt
<b>Quarz</b>	Silikat	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	unbekannt
<b>Magnesit</b>	Carbonat	Mineralienhandel Dipl. Geol. A. Spinn, Erlangen, Deutschland	unbekannt
<b>Portlandit</b>	Hydroxid	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	Deutschland, Caspar Steinbruch
<b>Brucit</b>	Hydroxid	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	Pakistan, Kharan
<b>Diaspor</b>	Hydroxid	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	Türkei, Selcuk
<b>Peridot</b>	Olivin	Seltene Mineralien, Gunnar Färber, Samswegen, Deutschland	Pakistan, Sapat Gali
<b>Montmorillonit 1</b>	Tonmineral	Alfa Aesar, Haverhill, USA	unbekannt
<b>Montmorillonit 2</b>	Tonmineral	abcr, Karlsruhe, Deutschland	unbekannt
<b>Talk</b>	Silikat	Lithos, Ennsdorf, Österreich	Afghanistan, Khugiani
<b>Basalt</b>	Vulkan-gestein	Bettina Scheu, LMU München, Deutschland	Island, Krafla
<b>Clinoptilolit 1</b>	Zeolith	Zeocem, Bystré, Slowakei	Slovakei, Nižný Hrabovec
<b>Clinoptilolit 2</b>	Zeolith	Lithos, Ennsdorf, Österreich	Rumänien, Zalau
<b>Chabasit</b>	Zeolith	St. Cloud Mining, Tucson, USA	USA, Arizona, Bowie
<b>Schreibersit</b>	Phosphid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	synthetisch

Tabelle 8-5: Ergebnisse der Elementaranalyse zur Zusammensetzung der verwendeten Mineralien. Tabelle angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Mineral	Methode	Analysenergebnis
Fuchsit	ICP-OES	Al: 122.47 mg/g, Ca: 0.18 mg/g, Cr: 7.67 mg/g, Fe: 2.98 mg/g, K: 41.42 mg/g, Mg: 1.44 mg/g, Mn: 0.02 mg/g, Na: 0.79 mg/g, Si: 181.05 mg/g
Calcit	ICP-OES	B: 0.11 mg/g, Ca: 395.65 mg/g, Fe: 0.01 mg/g, K: 0.32 mg/g, Mg: 2.50 mg/g, Mn: 0.15 mg/g, Na: 0.08 mg/g, S: 0.84 mg/g, Si: 0.99 mg/g
Muskovit	ICP-OES	Al: 74.73 mg/g, Fe: 1.36 mg/g, K: 27.60 mg/g, Mg: 0.07 mg/g, Mn: 0.07 mg/g, Na: 4.82 mg/g, Si: 92.47 mg/g
Analcim	ICP-OES	Al: 115.80 mg/g, Ca: 0.60 mg/g, K: 4.10 mg/g, Mg: 0.59 mg/g, Mn: 4.84 mg/g, Na: 72.96 mg/g, Si: 244.11 mg/g
Colemanit	ICP-OES	Al: 5.28 mg/g, B: 141.59 mg/g, Ca: 198.12 mg/g, Fe: 1.90 mg/g, K: 2.44 mg/g, Mg: 2.49 mg/g, Mn: 0.71 mg/g, Na: 1.18 mg/g, S: 4.15 mg/g, Si: 16.31 mg/g
Anhydrit	ICP-OES	B: 0.34 mg/g, Ca: 292.25 mg/g, K: 0.57 mg/g, Mg: 2.08 mg/g, Na: 0.17 mg/g, S: 233.89 mg/g, Si: 0.91 mg/g
Apatit	ICP-OES	Ca: 380.41 mg/g, Mg: 0.30 mg/g, Mn: 0.10 mg/g, Na: 0.98 mg/g, P: 185.85 mg/g
Quarz	ICP-OES	Si: 273.46 mg/g
Magnesit	ICP-OES	B: 0.07 mg/g, Ca: 4.72 mg/g, Fe: 0.07 mg/g, K: 0.35 mg/g, Mg: 289.00 mg/g, Mn: 0.07 mg/g, Na: 0.08 mg/g, S: 0.35 mg/g, Si: 4.60 mg/g
Portlandit	ICP-OES	B: 0.07 mg/g, Ca: 514.18 mg/g, Fe: 1.73 mg/g
Brucit	ICP-OES	B: 0.15 mg/g, Fe: 2.20 mg/g, Mg 433.99 mg/g
Diaspor	REM-EDX	Al: 34%, O: 66%
Peridot	ICP-OES	Cr: 0.08 mg/g, Fe: 12.25 mg/g, Mg: 114.36 mg/g, Mn: 1.05 mg/g, Si: 178.48 mg/g
Montmor. 1	ICP-OES	Al: 88.71 mg/g, Ca: 7.63 mg/g, Fe: 24.38 mg/g, K: 1.09 mg/g, Mg: 13.84 mg/g, Mn: 0.22 mg/g, Na: 9.83 mg/g, Si: 260.00 mg/g
Montmor. 2	ICP-OES	Al: 82.73 mg/g, Ca: 11.44 mg/g, Fe: 22.02 mg/g, K 2.01 mg/g, Mg: 29.93 mg/g, Na: 21.00 mg/g, Si: 244.01 mg/g, Ti: 1.37 mg/g
Talk	ICP-OES	Al: 3.41 mg/g, Ca: 5.02 mg/g, Fe: 3.97 mg/g, Mg 200.00 mg/g, Si: 281.31 mg/g
Basalt	ICP-OES	Al: 67.53 mg/g, Ca: 71.99 mg/g, Fe: 114.91 mg/g, K: 2.57 mg/g, Mg: 35.62 mg/g, Mn: 1.93 mg/g, Na: 12.79 mg/g, Si: 228.79 mg/g, Sr: 0.16 mg/g, Ti: 12.13 mg/g, B: 0.09 mg/g, Cr: 0.13 mg/g, P: 0.88 mg/g, S: 1.63 mg/g
Clinoptilolit 1	ICP-OES	Al: 62.80 mg/g, Ca: 20.80 mg/g, Fe: 8.51 mg/g, K: 28.06 mg/g, Mg: 4.29 mg/g, Na: 3.51 mg/g, Si: 212.10 mg/g, Sr: 0.21 mg/g, Ti: 0.80 mg/g
Clinoptilolit 2	ICP-OES	Al: 60.97 mg/g, Ca: 22.60 mg/g, Fe: 10.00 mg/g, 24.56 mg/g, Mg: 6.01 mg/g, Mn: 0.24 mg/g, Na: 9.87 mg/g, Si: 302.39 mg/g, Sr: 0.41 mg/g, Ti: 0.73 mg/g
Chabasit	ICP-OES	Al: 69.90 mg/g, Ca: 13.53 mg/g, Fe: 21.13 mg/g, K: 9.17 mg/g, Mg: 11.74 mg/g, Mn: 0.16 mg/g, Na: 26.06 mg/g, Si: 253.93 mg/g, Sr: 1.30 mg/g, Ti: 1.08 mg/g
Schreibersit	REM-EDX	Fe: 70.5%, P: 22.9%, O: 5.9%, Mg: 0.7%

**Tabelle 8-6: Produktverteilung der mechanochemischen Monosaccharidbildung aus Glycolaldehyd und Mineralien als Katalysatoren. Tabelle angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.**

Mineral	Apatit	Magnesit	Calcit	Anhydrit	Diaspor	Brucit	Portlandit
<b>Produkte [%]</b>	±	±	±	±	±	±	±
<b>Glycolaldehyd</b>	92.38	0.31	96.86	100.0 <sup>a</sup>	99.89	92.73	44.93
<b>Erythrose</b>	3.19	0.14	1.27	0.00	0.05	2.71	15.79
<b>Threose</b>	3.69	0.13	1.44	0.00	0.06	3.80	21.71
<b>Erythulose</b>	0.30	0.02	0.12	0.00	0.00	0.28	5.42
<b>Hexosen</b>	0.44	0.07	0.31	0.00	0.00	0.47	12.16
<b>Umsatz</b>	14.51	2.02	6.36	0.00	0.22	13.93	73.13
Mineral	Montmoril. 2	Montmoril. 1	Clinoptilolit 2	Clinoptilolit 1	Analcim	Chabasit	Schreibersit
<b>Produkte [%]</b>	±	±	±	±	±	±	±
<b>Glycolaldehyd</b>	85.26	2.86	98.51	98.93	97.08	97.21	99.15
<b>Erythrose</b>	6.17	0.98	0.65	0.44	1.11	1.40	0.36
<b>Threose</b>	7.28	1.51	0.65	0.47	1.49	1.25	0.37
<b>Erythulose</b>	0.74	0.19	0.13	0.12	0.17	0.05	0.03
<b>Hexosen</b>	0.55	0.19	0.05	0.04	0.15	0.09	0.09
<b>Umsatz</b>	26.04	6.82	2.96	2.17	5.82	5.51	1.77
Mineral	Basalt	Colemanit	Peridot	Talk	Quarz	Muskovit	Fuchsit
<b>Produkte [%]</b>	±	±	±	±	±	±	±
<b>Glycolaldehyd</b>	99.03	0.17	99.05	84.55	99.89	98.38	96.69
<b>Erythrose</b>	0.33	0.05	0.38	7.04	0.05	0.70	1.40
<b>Threose</b>	0.41	0.06	0.44	6.93	0.05	0.72	1.38
<b>Erythulose</b>	0.14	0.02	0.05	0.80	0.00	0.20	0.51
<b>Hexosen</b>	0.09	0.05	0.08	0.68	0.00	0.00	0.01
<b>Umsatz</b>	2.00	0.00	1.95	27.19	0.21	3.20	6.41

**Tabelle 8-7: Produktverteilung der mechanochemischen Monosaccharidbildung aus Glycolaldehyd und Formaldehyd adsorbiert auf Mineralien. Tabelle angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.**

Mineral	Fuchsit	Montmorill. 1	Chabasit	Clinoptilolit 1	Clinoptilolit 2	Analcim
Produkte [%]	±	±	±	±	±	±
<b>Glycolaldehyd</b>	60.22	74.28	81.11	95.78	91.19	59.15
<b>Glycerinaldehyd</b>	16.34	8.46	6.59	0.69	1.76	11.39
<b>Dihydroxyaceton</b>	15.78	8.82	1.82	0.15	0.40	0.83
<b>Erythrose</b>	2.63	2.41	4.03	1.47	2.77	11.38
<b>Threose</b>	1.63	2.27	3.40	1.36	2.54	14.39
<b>Erythrulose</b>	2.76	2.81	1.60	0.19	0.64	1.17
<b>andere Pentosen</b>	0.54	0.80	0.99	0.19	0.42	1.16
<b>Ribose</b>	0.07	0.10	0.07	0.01	0.05	0.10
<b>Hexosen</b>	0.03	0.05	0.38	0.07	0.19	0.37
<b>Heptosen</b>	0.00	0.00	0.00	0.09	0.10	0.12
	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01

Tabelle 8-8: Produktverteilung der mechanochemischen Monosaccharidbildung aus Glycolaldehyd und Calciumhydroxid unter Einfluss verschiedener Gasphasen. Tabelle angelehnt an und übersetzt nach M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Mineral-mediated carbohydrate synthesis by mechanical forces in a primordial geochemical setting, *Commun. Chem.* 2020, 3, 140, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00387-w>.<sup>[212]</sup> Copyright durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY.

Atmosphäre	Stickstoff		Kohlenstoffdioxid		Luft		Methan	
Produkte [%]	±		±		±		±	
<b>Glycolaldehyd</b>	30.24	0.59	75.66	3.28	28.00	0.99	29.41	0.97
<b>Erythrose</b>	18.08	0.20	9.21	1.14	17.67	0.15	17.76	0.14
<b>Threose</b>	25.63	0.14	11.77	1.53	25.27	0.12	25.42	0.17
<b>Erythrulose</b>	7.20	0.43	0.90	0.15	7.30	0.17	7.76	0.10
<b>Hexosen</b>	17.47	0.54	2.40	0.42	19.39	0.80	18.18	0.93
<b>Heptosen</b>	0.45	0.05	0.04	0.04	0.67	0.04	0.57	0.03
<b>Octosen</b>	0.93	0.07	0.02	0.02	1.69	0.24	0.91	0.04

Tabelle 8-9: Produktverteilung der Isomerisierung von Glucose unter Mahlbedingungen.

Stoffmenge [ $\mu\text{mol}$ ]	Fructose		Mannose		Glucose		andere Hexosen	
		$\pm$		$\pm$		$\pm$		$\pm$
<b>0</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	693.84	5.00	0.00	0.00
<b>1</b>	4.11	0.09	0.00	0.00	676.76	2.94	12.97	2.85
<b>2</b>	18.61	0.04	3.94	0.15	659.67	0.94	11.62	0.83
<b>3</b>	41.77	0.29	5.50	0.52	637.09	2.80	9.47	2.00
<b>4</b>	80.73	2.64	20.34	1.00	568.23	3.37	24.54	0.27
<b>5</b>	166.42	2.76	29.18	0.36	459.60	1.63	38.64	0.77

Tabelle 8-10: Produktverteilung der Isomerisierung von Fructose unter Mahlbedingungen.

Stoffmenge [ $\mu\text{mol}$ ]	Psicose		Fructose		Mannose		Glucose		andere Hexosen	
		$\pm$		$\pm$		$\pm$		$\pm$		$\pm$
<b>0</b>	0.00	0.00	693.84	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1</b>	1.32	0.08	676.25	0.73	2.68	0.15	4.69	0.40	8.90	0.10
<b>2</b>	14.59	1.03	656.66	2.36	6.04	0.18	12.49	0.62	4.06	0.53
<b>3</b>	27.00	2.09	622.95	5.32	10.34	0.53	25.68	1.56	7.87	1.14
<b>4</b>	26.63	4.60	622.94	8.83	10.24	1.12	26.45	3.23	7.59	0.13
<b>5</b>	21.20	1.31	639.15	4.13	7.77	0.38	18.72	1.02	6.99	1.43

Tabelle 8-11: Produktverteilung der Isomerisierung von Ribose unter Mahlbedingungen.

Stoffmenge [ $\mu\text{mol}$ ]	Xyl/Ara/Lyx		Xlu/Rbu		Ribose		andere Pentosen	
		$\pm$		$\pm$		$\pm$		$\pm$
<b>0</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	766.00	5.00	0.00	0.00
<b>1</b>	3.47	0.04	13.64	0.13	742.45	0.18	6.44	0.08
<b>2</b>	17.06	1.93	50.23	7.67	695.31	11.89	3.41	2.29
<b>3</b>	28.34	0.32	73.16	0.26	661.09	0.24	3.40	0.34
<b>4</b>	92.07	0.66	148.47	1.62	510.84	5.25	14.63	2.97
<b>5</b>	245.50	1.00	152.80	12.10	367.70	13.10	-	-

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] About Life Detection, <https://astrobiology.nasa.gov/research/life-detection/about/>, (Stand: 08.09.2020).
- [2] H. Rauchfuß, *Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens*, Springer, Berlin Heidelberg, **2005**.
- [3] P. A. R. Ade, N. Aghanim, M. Arnaud, M. Ashdown, J. Aumont, *et al.*, *Astron. Astrophys.* **2016**, 594, A13.
- [4] G. F. Smoot, COBE: New Sky Maps of the Early Universe in *Primordial Nucleosynthesis and Evolution of Early Universe, Vol. 169* (Eds.: K. Sato, J. Audouze), Springer, Dordrecht, **1991**, 281-294.
- [5] A. Friedman, *Z. Phys.* **1922**, 10, 377-386.
- [6] A. G. Lemaître, *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **1931**, 91, 483-490.
- [7] E. P. Hubble, *The Realm of the Nebulae*, Yale University Press, **1936**.
- [8] S. Hawking, *A Brief History Of Time: From Big Bang To Black Holes*, Transworld, **2009**.
- [9] A. Bouvier, M. Wadhwa, *Nat. Geosci.* **2010**, 3, 637.
- [10] G. B. Dalrymple, *Geological Society, London, Special Publications* **2001**, 190, 205-221.
- [11] W. F. Bottke, D. Vokrouhlický, S. Marchi, T. Swindle, E. R. D. Scott, *et al.*, *Science* **2015**, 348, 321-323.
- [12] A. N. Halliday, *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **2008**, 366, 4163-4181.
- [13] D. Herwartz, A. Pack, B. Friedrichs, A. Bischoff, *Science* **2014**, 344, 1146-1150.
- [14] S. A. Wilde, J. W. Valley, W. H. Peck, C. M. Graham, *Nature* **2001**, 409, 175-178.
- [15] S. J. Mojzsis, T. M. Harrison, R. T. Pidgeon, *Nature* **2001**, 409, 178-181.
- [16] W. H. Peck, J. W. Valley, S. A. Wilde, C. M. Graham, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, 65, 4215-4229.
- [17] O. Abramov, D. A. Kring, S. J. Mojzsis, *Chem. Erde - Geochem.* **2013**, 73, 227-248.
- [18] O. Abramov, S. J. Mojzsis, *Nature* **2009**, 459, 419-422.
- [19] C. Chyba, P. Thomas, L. Brookshaw, C. Sagan, *Science* **1990**, 249, 366-373.
- [20] N. H. Sleep, K. J. Zahnle, J. F. Kasting, H. J. Morowitz, *Nature* **1989**, 342, 139-142.
- [21] M. D. Hopkins, S. J. Mojzsis, *Contrib. Mineral. Petrol.* **2015**, 169, 30.
- [22] E. A. Bell, P. Boehnke, T. M. Harrison, W. L. Mao, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, 112, 14518-14521.
- [23] Y. Ohtomo, T. Kakegawa, A. Ishida, T. Nagase, M. T. Rosing, *Nat. Geosci.* **2014**, 7, 25-28.
- [24] M. T. Rosing, *Science* **1999**, 283, 674-676.
- [25] M. T. Rosing, R. Frei, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2004**, 217, 237-244.
- [26] M. Schidlowski, *Nature* **1988**, 333, 313-318.
- [27] S. J. Mojzsis, G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman, *et al.*, *Nature* **1996**, 384, 55-59.
- [28] E. J. Javaux, *Nature* **2019**, 572, 451-460.
- [29] T. Kakegawa, Biogenic and Abiogenic Graphite in Minerals and Rocks of the Early Earth in *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence* (Eds.: A. Yamagishi, T. Kakegawa, T. Usui), Springer, Singapore, **2019**, 209-227.
- [30] N. Noffke, D. Christian, D. Wacey, R. M. Hazen, *Astrobiology* **2013**, 13, 1103-1124.
- [31] A. C. Allwood, M. R. Walter, I. W. Burch, B. S. Kamber, *Precambrian Res.* **2007**, 158, 198-227.
- [32] A. C. Allwood, M. R. Walter, B. S. Kamber, C. P. Marshall, I. W. Burch, *Nature* **2006**, 441, 714-718.
- [33] G. R. Byerly, D. R. Lower, M. M. Walsh, *Nature* **1986**, 319, 489-491.
- [34] J. Schopf, B. Packer, *Science* **1987**, 237, 70-73.
- [35] K. M. Cohen, S. C. Finney, P. L. Gibbard, J.-X. Fan, *The ICS International Chronostratigraphic Chart. Episodes* 36, **2013, updated V.2019/05**, 199-204.
- [36] N. H. Sleep, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a002527.

- [37] K. A. Maher, D. J. Stevenson, *Nature* **1988**, *331*, 612-614.
- [38] C.-T. A. Lee, L. Y. Yeung, N. R. McKenzie, Y. Yokoyama, K. Ozaki, *et al.*, *Nat. Geosci.* **2016**, *9*, 417-424.
- [39] T. W. Lyons, C. T. Reinhard, N. J. Planavsky, *Nature* **2014**, *506*, 307-315.
- [40] C. A. Partin, S. V. Lalonde, N. J. Planavsky, A. Bekker, O. J. Rouxel, *et al.*, *Chem. Geol.* **2013**, *362*, 82-90.
- [41] J. Kasting, *Science* **1993**, *259*, 920-926.
- [42] F. Tian, O. B. Toon, A. A. Pavlov, H. De Sterck, *Science* **2005**, *308*, 1014-1017.
- [43] K. Zahnle, L. Schaefer, B. Fegley, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a004895.
- [44] R. Hazen, D. Papineau, W. Bleeker, R. Downs, J. Ferry, *et al.*, *Am. Mineral.* **2008**, *93*, 1693-1720.
- [45] H. James Cleaves II, A. Michalkova Scott, F. C. Hill, J. Leszczynski, N. Sahai, *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5502-5525.
- [46] R. M. Hazen, *Am. J. Sci.* **2013**, *313*, 807-843.
- [47] J. P. Pinto, G. R. Gladstone, Y. L. Yung, *Science* **1980**, *210*, 183-185.
- [48] A. Brack, Extraterrestrial Delivery of Organic Compounds in *Encyclopedia of Astrobiology* (Eds.: R. Amils, M. Gargaud, J. Cernicharo Quintanilla, H. J. Cleaves, W. M. Irvine, D. Pinti, M. Viso), Springer, Berlin, Heidelberg, **2014**, 1-8.
- [49] J. L. Bada, C. Bigham, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 1248-1250.
- [50] C. Goldblatt, M. W. Claire, T. M. Lenton, A. J. Matthews, A. J. Watson, *et al.*, *Nat. Geosci.* **2009**, *2*, 891-896.
- [51] C. Sagan, C. Chyba, *Science* **1997**, *276*, 1217-1221.
- [52] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *409*, 1092-1101.
- [53] I. Ginsburg, M. Lingam, A. Loeb, *The Astrophysical Journal* **2018**, *868*, L12.
- [54] W. M. Napier, *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **2004**, *348*, 46-51.
- [55] E. Parrilli, F. Sannino, G. Marino, M. L. Tutino, *Rend. Lincei Sci. Fis. Nat.* **2011**, *22*, 375-383.
- [56] P. S. Wesson, *Space Sci. Rev.* **2010**, *156*, 239-252.
- [57] N. G. Bochkarev, *Astron. Rep.* **2017**, *61*, 307-309.
- [58] M. Di Giulio, *J. Theor. Biol.* **2010**, *266*, 569-572.
- [59] B. K. D. Pearce, R. E. Pudritz, *The Astrophysical Journal* **2015**, *807*, 85.
- [60] C. Meinert, I. Myrgorodska, P. de Marcellus, T. Buhse, L. Nahon, *et al.*, *Science* **2016**, *352*, 208-212.
- [61] C. Darwin, *Letter to J.D. Hooker*, **1871**, Letter no. 7471, Darwin Correspondence Project, <https://www.darwinproject.ac.uk/letter/DCP-LETT-7471.xml>, (Stand: 15.09.2020).
- [62] B. Bradley, P. Matthew, G. Maheen, C. B. J., V. Francisco, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13249-13253.
- [63] R. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 4396-4401.
- [64] L. P. Knauth, Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution in *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives* (Ed.: N. Noffke), Elsevier, Amsterdam, **2005**, 53-69.
- [65] J. W. Morse, F. T. Mackenzie, *Aquat. Geochem.* **1998**, *4*, 301-319.
- [66] C. Menor-Salvan, M. R. Marin-Yaseli, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5404-5415.
- [67] J. A. Baross, S. E. Hoffman, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1985**, *15*, 327-345.
- [68] W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 805.
- [69] K. E. Nelson, M. P. Robertson, M. Levy, S. L. Miller, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2001**, *31*, 221-229.
- [70] C. B. Mast, D. Braun, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 188102.
- [71] K. L. Von Damm, M. D. Lilley, W. C. Shanks, M. Brockington, A. M. Bray, *et al.*, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2003**, *206*, 365-378.
- [72] D. S. Kelley, J. A. Baross, J. R. Delaney, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2002**, *30*, 385-491.
- [73] D. M. Karl, *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*, CRC Press, Boca Raton, **1995**.
- [74] G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 452-484.
- [75] G. Wächtershäuser, *Syst. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 207-210.
- [76] G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *58*, 85-201.

- [77] K. H.-L. F. Westall, N. Hinman, P. Gautret, K.A. Campbell, J.G. Breheret, F. Foucher, A. Hubert, S. Sorieul, A.V. Dass, T.P. Kee, T. Georgelin, A. Brack, *Astrobiology* **2018**, *18*, 259-293.
- [78] T. Ebisuzaki, S. Maruyama, *Geosci. Front.* **2017**, *8*, 275-298.
- [79] A. Y. Mulkijanian, A. Y. Bychkov, D. V. Dibrova, M. Y. Galperin, E. V. Koonin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E821-E830.
- [80] M. D. Brasier, R. Matthewman, S. McMahon, D. Wacey, *Astrobiology* **2011**, *11*, 725-735.
- [81] S. L. Miller, J. L. Bada, *Nature* **1988**, *334*, 609-611.
- [82] N. Lahav, S. Chang, *J. Mol. Evol.* **1976**, *8*, 357-380.
- [83] S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, *et al.*, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.
- [84] D. S. Ross, D. Deamer, *Life* **2016**, *6*, 28.
- [85] I. Mamajanov, P. J. MacDonald, J. Ying, D. M. Duncanson, G. R. Dowdy, *et al.*, *Macromolecules* **2014**, *47*, 1334-1343.
- [86] N. Lahav, D. White, S. Chang, *Science* **1978**, *201*, 67-69.
- [87] Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, T. Namba, *Nature* **1991**, *352*, 516-519.
- [88] R. Saladino, C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro, *Phys. Life Rev.* **2012**, *9*, 84-104.
- [89] J. E. Šponer, J. Šponer, O. Nováková, V. Brabec, O. Šedo, *et al.*, *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 3572-3586.
- [90] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1971**, *171*, 490-494.
- [91] S. W. Fox, K. Harada, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3745-3751.
- [92] S. W. Fox, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, *59*, 1213-1214.
- [93] R. J. Rapf, V. Vaida, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**.
- [94] R. Sukrit, S. D. D., *Astrobiology* **2016**, *16*, 68-88.
- [95] R. Saladino, E. Carota, G. Botta, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, E2746-E2755.
- [96] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- [97] S. L. Miller, H. C. Urey, *Science* **1959**, *130*, 245-251.
- [98] M. Ferus, F. Pietrucci, A. M. Saitta, A. Knížek, P. Kubelík, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 4306-4311.
- [99] A. P. Johnson, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, *et al.*, *Science* **2008**, *322*, 404-404.
- [100] M. Ferus, D. Nesvorný, J. Šponer, P. Kubelík, R. Michalčíková, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 657-662.
- [101] M. Ferus, F. Pietrucci, A. M. Saitta, O. Ivanek, A. Knizek, *et al.*, *A&A* **2019**, *626*, A52.
- [102] C. Chyba, C. Sagan, *Nature* **1992**, *355*, 125-132.
- [103] J. Velasco, *Biol. Philos.* **2018**, *33*, 31.
- [104] W. F. Martin, F. L. Sousa, N. Lane, *Science* **2014**, *344*, 1092-1093.
- [105] K. B. Muchowska, S. J. Varma, J. Moran, *Nature* **2019**, *569*, 104-107.
- [106] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618-618.
- [107] P. G. Higgs, N. Lehman, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *16*, 7.
- [108] M. Neveu, H.-J. Kim, S. A. Benner, *Astrobiology* **2013**, *13*, 391-403.
- [109] L. E. Orgel, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2003**, *33*, 211-218.
- [110] M. P. Robertson, G. F. Joyce, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a003608.
- [111] I. A. Chen, R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Science* **2004**, *305*, 1474-1476.
- [112] M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak, *Science* **2003**, *302*, 618-622.
- [113] P. L. Luisi, P. Walde, T. Oberholzer, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 33-39.
- [114] P. L. Luisi, F. J. Varela, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1989**, *19*, 633-643.
- [115] S. W. Fox, J. R. Jungck, T. Nakashima, *Orig. Life* **1974**, *5*, 227-237.
- [116] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525-528.
- [117] S. R. Pascale Ehrenfreund, James Cleaves, Liaohai Chen, *Astrobiology* **2006**, *6*, 490-520.
- [118] G. F. Joyce, A. W. Schwartz, S. L. Miller, L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 4398-4402.
- [119] A. Pross, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2004**, *34*, 307-321.
- [120] K. B. Muchowska, S. J. Varma, E. Chevallot-Beroux, L. Lethuillier-Karl, G. Li, *et al.*, *Nat. Ecol. Evo.* **2017**, *1*, 1716-1721.
- [121] S. J. Varma, K. B. Muchowska, P. Chatelain, J. Moran, *Nat. Ecol. Evo.* **2018**, *2*, 1019-1024.

- [122] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, 35, 849-857.
- [123] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, *et al.*, *Cell* **1982**, 31, 147-157.
- [124] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, 459, 239-242.
- [125] J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 9944-9947.
- [126] P. Kristof, R. Hannes, M. R. Bernd, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 1107-1114.
- [127] G. Danger, R. Plasson, R. Pascal, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5416-5429.
- [128] J. C. G. Walker, P. Brimblecombe, *Precambrian Res.* **1985**, 28, 205-222.
- [129] J. F. Kasting, K. J. Zahnle, J. P. Pinto, A. T. Young, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1989**, 19, 95-108.
- [130] I. Halevy, D. P. Schrag, *Geophys. Res. Lett.* **2009**, 36, L23201.
- [131] S. Ranjan, Z. R. Todd, J. D. Sutherland, D. D. Sasselov, *Astrobiology* **2018**, 18, 1023-1040.
- [132] F. W. Bergstrom, *J. Phys. Chem.* **1921**, 26, 876-894.
- [133] *Gmelin-Handbuch der Anorganischen Chemie, Schwefeloxide, Vol. 3*, 8th ed., Springer, Berlin, **1980**.
- [134] A. S. Deeming, E. J. Emmett, C. S. Richards-Taylor, M. C. Willis, *Synthesis* **2014**, 46, 2701-2710.
- [135] J. Luginina, *Synlett* **2014**, 25, 2962-2963.
- [136] T. Hoffmann, B. Ziemer, C. Mügge, U. Bertholdt, E. Wenschuh, *et al.*, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1991**, 600, 55-60.
- [137] J. Li, A. Y. Rogachev, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 1987-2000.
- [138] W. A. Schenk, G. H. J. Hilpert, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 433-439.
- [139] A. Chénéde, I. Fleming, R. Salmon, M. C. West, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 686, 84-93.
- [140] H. Mayr, G. Gorath, B. Bauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 788-789.
- [141] B. G. Soares, *Prog. Polym. Sci.* **1997**, 22, 1397-1430.
- [142] D. Posevins, K. Suta, M. Turks, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 2016, 1414-1419.
- [143] J. Luginina, J. Uzuleņa, D. Posevins, M. Turks, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1760-1771.
- [144] D. Schmidt, H. Leutbecher, J. Conrad, I. Klaiber, S. Mika, *et al.*, *Synlett* **2007**, 2007, 1725-1729.
- [145] D. J. Ritson, C. Battilocchio, S. V. Ley, J. D. Sutherland, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1821.
- [146] J. Xu, D. J. Ritson, S. Ranjan, Z. R. Todd, D. D. Sasselov, *et al.*, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 5566-5569.
- [147] K. J., M. D. Chris, K. H.-J., B. S.A., *Astrobiology* **2019**, 19, 506-516.
- [148] F. Chen, D. Yang, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2007**, 37, 47-54.
- [149] A. Morbidelli, S. Marchi, W. F. Bottke, D. A. Kring, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2012**, 355-356, 144-151.
- [150] T. Komiya, S. Yamamoto, S. Aoki, Y. Sawaki, A. Ishikawa, *et al.*, *Tectonophysics* **2015**, 662, 40-66.
- [151] D. L. Buczkowski, D. Y. Wyrick, *Tectonism and Magmatism on Asteroids*, European Planetary Science Congress, Nantes, **2015**, EPSC2015-2304.
- [152] H. Hansma, *Could Life Originate between Mica Sheets?: Mechanochemical Biomolecular Synthesis and the Origins of Life*, Symposium II – Probing Mechanics at Nanoscale Dimensions, **2009**, 1185-III1103-1115.
- [153] H. G. Hansma, *J. Theor. Biol.* **2010**, 266, 175-188.
- [154] V. P. McCaffrey, N. E. Zellner, C. M. Waun, E. R. Bennett, E. K. Earl, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2014**, 44, 29-42.
- [155] Z. Martins, M. C. Price, N. Goldman, M. A. Sephton, M. J. Burchell, *Nat. Geosci.* **2013**, 6, 1045-1049.
- [156] C. Bolm, R. Mocchi, C. Schumacher, M. Turberg, F. Puccetti, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 2423-2426.
- [157] S. L. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, 23, 480-489.
- [158] G. Schlesinger, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **1983**, 19, 376-382.
- [159] S. Miyakawa, H. Yamanashi, K. Kobayashi, H. J. Cleaves, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 14628-14631.
- [160] K. Harada, S. W. Fox, *Nature* **1964**, 201, 335-336.
- [161] W. Groth, H. von Weysenhoff, *Naturwissenschaften* **1957**, 44, 510-511.
- [162] X. Zhang, G. Tian, J. Gao, M. Han, R. Su, *et al.*, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2017**, 47, 413-425.
- [163] R. J.-C. Hennet, N. G. Holm, M. H. Engel, *Naturwissenschaften* **1992**, 79, 361-365.

- [164] A. S. Burton, H. McLain, D. P. Glavin, J. E. Elsila, J. Davidson, *et al.*, *Meteorit. Planet. Sci.* **2015**, *50*, 470-482.
- [165] S. Pizzarello, D. L. Schrader, A. A. Monroe, D. S. Lauretta, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 11949-11954.
- [166] N. Kitadai, S. Maruyama, *Geosci. Front.* **2018**, *9*, 1117-1153.
- [167] P. G. Higgs, R. E. Pudritz, *Astrobiology* **2009**, *9*, 483-490.
- [168] D. A. M. Zaia, C. T. B. V. Zaia, H. De Santana, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 469-488.
- [169] S. W. Fox, K. Harada, *Science* **1958**, *128*, 1214-1214.
- [170] S. Andini, E. Benedetti, L. Ferrara, L. Paolillo, P. A. Temussi, *Orig. Life* **1975**, *6*, 147-153.
- [171] J. G. Forsythe, S.-S. Yu, I. Mamajanov, M. A. Grover, R. Krishnamurthy, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9871-9875.
- [172] M. Frenkel-Pinter, J. W. Haynes, M. C. A. S. Petrov, B. T. Burcar, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, 201904849.
- [173] S.-S. Yu, R. Krishnamurthy, F. M. Fernández, N. V. Hud, F. J. Schork, *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 28441-28450.
- [174] J. Hulshof, C. Ponnampereuma, *Orig. Life* **1976**, *7*, 197-224.
- [175] J. Rabinowitz, J. Flores, R. Krebsbach, G. Rogers, *Nature* **1969**, *224*, 795-796.
- [176] N. M. Chung, R. Lohrmann, L. E. Orgel, J. Rabinowitz, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 1205-1210.
- [177] J. J. Flores, J. O. Leckie, *Nature* **1973**, *244*, 435-437.
- [178] G. Steinman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 76-82.
- [179] G. Steinman, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1964**, *52*, 27-30.
- [180] M. Halmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *128*, 808-810.
- [181] A. L. Weber, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2005**, *35*, 421-427.
- [182] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59-61.
- [183] A. Brack, *Orig. Life* **1984**, *14*, 229-236.
- [184] H. Sawai, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1975**, *6*, 165-184.
- [185] A. L. Weber, J. M. Caroon, J. T. Warden, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Biosystems* **1977**, *8*, 277-286.
- [186] K. Kawamura, H. Takeya, T. Kushibe, *Adv. Space Res.* **2009**, *44*, 267-275.
- [187] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Anal. Sci.* **1989**, *5*, 411-414.
- [188] A. H. Eder, B. M. Rode, *Dalton Trans.* **1994**, 1125-1130.
- [189] E.-I. Ochiai, *Orig. Life* **1978**, *9*, 81-91.
- [190] B. M. Rode, M. G. Schwendinger, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1990**, *20*, 401-410.
- [191] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1992**, *22*, 349-359.
- [192] M. G. Schwendinger, R. Tattler, S. Saetia, K. R. Liedl, R. T. Kroemer, *et al.*, *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *228*, 207-214.
- [193] K. Plankensteiner, A. Righi, B. M. Rode, R. Gargallo, J. Jaumot, *et al.*, *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 649-656.
- [194] J. Bujdák, K. Faybíková, A. Eder, Y. Yongyai, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1995**, *25*, 431-441.
- [195] P. Canavelli, S. Islam, M. W. Powner, *Nature* **2019**, *571*, 546-549.
- [196] A. Brack, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1993**, *23*, 3-10.
- [197] G. Danger, L. Boiteau, H. Cottet, R. Pascal, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7412-7413.
- [198] A. Brack, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1987**, *17*, 367-379.
- [199] J. Taillades, H. Collet, L. Garrel, I. Beuzelin, L. Boiteau, *et al.*, *J. Mol. Evol.* **1999**, *48*, 638-645.
- [200] R. Pascal, L. Boiteau, A. Commeyras, From the Prebiotic Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids Towards a Primitive Translation Apparatus for the Synthesis of Peptides in *Prebiotic Chemistry* (Ed.: P. Walde), Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**, 69-122.
- [201] M.-C. Maurel, L. E. Orgel, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2000**, *30*, 423-430.
- [202] L. Leman, L. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science* **2004**, *306*, 283-286.
- [203] A. Commeyras, H. Collet, L. Boiteau, J. Taillades, O. Vandenabeele-Trambouze, *et al.*, *Polym. Int.* **2002**, *51*, 661-665.
- [204] A. Eschenmoser, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12821-12844.
- [205] V. Naidu Sagi, P. Karri, F. Hu, R. Krishnamurthy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8127-8130.
- [206] V. N. Sagi, V. Punna, F. Hu, G. Meher, R. Krishnamurthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3577-3589.

- [207] A. Butlerow, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1861**, 120, 295-298.
- [208] R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* **1959**, 1, 22-26.
- [209] S. L. Miller, L. E. Orgel, *The Origins of Life on the Earth*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, **1974**.
- [210] C. Reid, L. E. Orgel, *Nature* **1967**, 216, 455-455.
- [211] A. W. Schwartz, R. M. de Graaf, *J. Mol. Evol.* **1993**, 36, 101-106.
- [212] M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, *Commun. Chem.* **2020**, 3, 140.
- [213] K. Runge, R. Mayer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, 707, 161-169.
- [214] H. W. Wanzlick, *Angew. Chem.* **1962**, 74, 129-134.
- [215] A. H. Weiss, T. John, *J. Catal.* **1974**, 32, 216-229.
- [216] O. Pestunova, A. Simonov, V. Snytnikov, V. Stoyanovsky, V. Parmon, *Adv. Space Res.* **2005**, 36, 214-219.
- [217] T. Matsumoto, H. Yamamoto, S. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4829-4832.
- [218] W. L. Beck, *Angew. Chem.* **1949**, 61, 186-188.
- [219] A. K. Eckhardt, M. M. Linden, R. C. Wende, B. Bernhardt, P. R. Schreiner, *Nature Chem.* **2018**, 10, 1141-1147.
- [220] M. J. H. Kemper, J. M. F. Van Dijk, H. M. Buck, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7841-7846.
- [221] S. J. Angyal, *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 279-281.
- [222] Z. Iqbal, S. Novalin, *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 769-788.
- [223] C. Appayee, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 3720-3723.
- [224] R. Shapiro, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1988**, 18, 71-85.
- [225] R. Larralde, M. P. Robertson, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 8158-8160.
- [226] J. M. De Bruijn, A. P. G. Kieboom, H. V. Bekkiun, *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, 5, 561-569.
- [227] H.-J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 9457-9468.
- [228] A. G. Cairns-Smith, P. Ingram, G. L. Walker, *J. Theor. Biol.* **1972**, 35, 601-604.
- [229] D. Kopetzki, M. Antonietti, *New J. Chem.* **2011**, 35, 1787-1794.
- [230] A. F. Jalbout, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, 38, 489-497.
- [231] Y. Furukawa, Y. Chikaraishi, N. Ohkouchi, N. O. Ogawa, D. P. Glavin, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, 116, 24440-24445.
- [232] S. Lamour, *Untersuchung relevanter Modellsysteme im präbiotischen Kontext*, Dissertation, LMU München Department Chemie, **2019**.
- [233] W. R. Taylor, *J. Theor. Biol.* **1986**, 119, 205-218.
- [234] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie*, 6 ed., Springer, Berlin Heidelberg, **2005**.
- [235] R. Schuster, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1988**, 431, 271-284.
- [236] D. P. Glavin, M. P. Callahan, J. P. Dworkin, J. E. Elsila, *Meteorit. Planet. Sci.* **2010**, 45, 1948-1972.
- [237] I. Betnér, P. Földi, *Chromatographia* **1986**, 22, 381-387.
- [238] B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen, T. L. Tarvin, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1984**, 336, 93-104.
- [239] A. Roy-Lachapelle, M. Sollicec, S. Sauvé, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 5487-5501.
- [240] S. A. Cohen, D. P. Michaud, *Anal. Biochem.* **1993**, 211, 279-287.
- [241] J. Díaz, J. L. Lliberia, L. Comellas, F. Broto-Puig, *J. Chromatogr. A* **1996**, 719, 171-179.
- [242] P. Fürst, L. Pollack, T. A. Graser, H. Godel, P. Stehle, *J. Chromatogr. A* **1990**, 499, 557-569.
- [243] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* **2002**, 961, 9-21.
- [244] M. Piraud, C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J.-P. Steghens, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 1297-1311.
- [245] K. Hiraoka, K. Murata, I. Kudaka, *J. Mass Spec. Soc. Jap.* **1995**, 43, 127-138.
- [246] J. Qu, Y. Wang, G. Luo, Z. Wu, C. Yang, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2034-2040.
- [247] M. Piraud, C. Vianey-Saban, C. Bourdin, C. Acquaviva-Bourdain, S. Boyer, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 3287-3297.
- [248] W. A. H. Waterval, J. L. J. M. Scheijen, M. M. J. C. Ortmans-Ploemen, C. D. Habets-van der Poel, J. Bierau, *Clin. Chim. Acta* **2009**, 407, 36-42.
- [249] R. Guerrasio, C. Haberhauer-Troyer, D. Mattanovich, G. Koellensperger, S. Hann, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 915-922.
- [250] G. Zhou, M. Wang, Y. Li, Y. Peng, X. Li, *Amino Acids* **2015**, 47, 1589-1603.

- [251] H. C. M. T. Prinsen, B. G. M. Schiebergen-Bronkhorst, M. W. Roeleveld, J. J. M. Jans, M. G. M. de Sain-van der Velden, *et al.*, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2016**, *39*, 651-660.
- [252] T. Soga, D. N. Heiger, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1236-1241.
- [253] P. Coufal, J. Zuska, T. van de Goor, V. Smith, B. Gaš, *Electrophoresis* **2003**, *24*, 671-677.
- [254] M. J. Thornton, J. S. Fritz, C. W. Klampfl, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 647-652.
- [255] T. Bergman, B. Agerberth, H. Jörnvall, *FEBS Lett.* **1991**, *283*, 100-103.
- [256] T. Soga, Y. Kakazu, M. Robert, M. Tomita, T. Nishioka, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1964-1972.
- [257] N. M. Schiavone, S. A. Sarver, L. Sun, R. Wojcik, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr. B* **2015**, *991*, 53-58.
- [258] Z. Zhang, Y. Qu, N. J. Dovichi, *Trends Analyt. Chem.* **2018**, *108*, 23-37.
- [259] J. Horvath, V. Dolník, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 644-655.
- [260] R. L. C. Voeten, I. K. Ventouri, R. Haselberg, G. W. Somsen, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 1464-1481.
- [261] M. Gilges, M. H. Kleemiss, G. Schomburg, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2038-2046.
- [262] B. L. Karger, W. Goetzinger, Polyvinyl alcohol (PVA) based covalently bonded stable hydrophilic coating for capillary electrophoresis, Patent C25B 9/0, **1998**, 1 - 20.
- [263] B. Yu, P. Liu, H. Cong, J. Tang, L. Zhang, *Electrophoresis* **2012**, *33*, 3066-3072.
- [264] D. Belder, A. Deege, H. Husmann, F. Kohler, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3813-3818.
- [265] S. Hjertén, *J. Chromatogr. A* **1985**, *347*, 191-198.
- [266] J. Bodnar, L. Hajba, A. Guttman, *Electrophoresis* **2016**, *37*, 3154-3159.
- [267] M. Beneito-Cambra, P. Anres, J. Vial, P. Gareil, N. Delaunay, *Talanta* **2016**, *150*, 546-552.
- [268] Z. Zhang, G. Zhu, E. H. Peuchen, N. J. Dovichi, *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 921-925.
- [269] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601-601.
- [270] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99-111.
- [271] B. Paizs, S. Suhai, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 508-548.
- [272] V. Vidova, Z. Spacil, *Anal. Chim. Acta* **2017**, *964*, 7-23.
- [273] Y. Chen, J. Vu, M. G. Thompson, W. A. Sharpless, L. J. G. Chan, *et al.*, *PLoS One* **2019**, *14*, e0211582.
- [274] Y. Liu, S. Forcisi, M. Lucio, M. Harir, F. Bahut, *et al.*, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11692.
- [275] V. A. Yaylayan, S. Harty-Majors, A. A. Ismail, *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 31-38.
- [276] G. Sesta, *Apidologie* **2006**, *37*, 84-90.
- [277] P. H. Gamache, *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques*, Wiley-VCH, **2017**.
- [278] G. Ricochon, C. Paris, M. Girardin, L. Muniglia, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1529-1536.
- [279] T. Zweckmair, S. Böhmendorfer, A. Bogolitsyna, T. Rosenau, A. Potthast, *et al.*, *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *52*, 169-175.
- [280] N. K. Karamanos, A. Hjerpe, T. Tsegenidis, B. Engfeldt, C. A. Antonopoulos, *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 410-419.
- [281] D. T. Li, G. R. Her, *Anal. Biochem.* **1993**, *211*, 250-257.
- [282] J. Han, V. Tschernutter, J. Yang, T. Eckle, C. H. Borchers, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5965-5973.
- [283] O. L. Brady, G. V. Elsmie, *Analyst* **1926**, *51*, 77-78.
- [284] N. K. Karamanos, T. Tsegenidis, C. A. Antonopoulos, *J. Chromatogr. A* **1987**, *405*, 221-228.
- [285] C. Ding, L. Wang, C. Tian, Y. Li, Z. Sun, *et al.*, *Chromatographia* **2008**, *68*, 893-902.
- [286] W. Bai, X. Fang, W. Zhao, S. Huang, H. Zhang, *et al.*, *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 645-651.
- [287] F. N. Lamari, R. Kuhn, N. K. Karamanos, *J. Chromatogr. B* **2003**, *793*, 15-36.
- [288] I. Mikšić, J. Gabriel, Z. Deyl, *J. Chromatogr. A* **1997**, *772*, 297-303.
- [289] K. Mopper, L. Johnson, *J. Chromatogr. A* **1983**, *256*, 27-38.
- [290] T. J. P. Naven, D. J. Harvey, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 829-834.
- [291] X. Wang, Y. Chen, *Carbohydr. Res.* **2001**, *332*, 191-196.
- [292] S. A. Perez, L. A. Colón, *Electrophoresis* **1996**, *17*, 352-358.
- [293] M. Z. Iqbal, S. Novalin, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5116-5121.
- [294] Z. Sun, C. Song, L. Xia, X. Wang, Y. Suo, *et al.*, *Chromatographia* **2010**, *71*, 789-797.
- [295] D. R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, Wiley-VCH, **1979**.
- [296] H. Björndal, C. G. Hellervist, B. Lindberg, S. Svensson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 610-619.

- [297] C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2497-2507.
- [298] J. E. Sullivan, L. R. Schewe, *J. Chromatogr. Sci.* **1977**, *15*, 196-197.
- [299] S. Morgenlie, *Carbohydr. Res.* **1975**, *41*, 285-289.
- [300] A. I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M. L. Sanz, I. Martínez-Castro, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1226-1240.
- [301] R. O. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 1707-1710.
- [302] N. Sakauchi, E. C. Horning, *Anal. Lett.* **1971**, *4*, 41-52.
- [303] J. F. Klebe, H. Finkbeiner, D. M. White, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3390-3395.
- [304] M. Donike, *J. Chromatogr. A* **1969**, *42*, 103-104.
- [305] D. L. Stalling, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *31*, 616-622.
- [306] V. Schurig, H.-P. Nowotny, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 939-957.
- [307] W. A. König, P. Mischnick-Lübbecke, B. Brassat, S. Lutz, G. Wenz, *Carbohydr. Res.* **1988**, *183*, 11-17.
- [308] S. Honda, N. Yamauchi, K. Kakehi, *J. Chromatogr. A* **1979**, *169*, 287-293.
- [309] A. Lluveras, I. Bonaduce, A. Andreotti, M. P. Colombini, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 376-386.
- [310] R. A. Laine, C. C. Sweeley, *Anal. Biochem.* **1971**, *43*, 533-538.
- [311] B. W. Li, K. W. Andrews, *Chromatographia* **1986**, *21*, 596-598.
- [312] M. Becker, F. Liebner, T. Rosenau, A. Potthast, *Talanta* **2013**, *115*, 642-651.
- [313] H. Schweer, *Carbohydr. Res.* **1982**, *111*, 1-7.
- [314] M. A. Andrews, *Carbohydr. Res.* **1989**, *194*, 1-19.
- [315] H. Schweer, *J. Chromatogr. A* **1982**, *236*, 355-360.
- [316] M. Becker, T. Zweckmair, A. Forneck, T. Rosenau, A. Potthast, *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1281*, 115-126.
- [317] T. Zweckmair, S. Schiehser, T. Rosenau, A. Potthast, *Carbohydr. Res.* **2017**, *446*, 7-12.
- [318] S. Veli, B. Pekey, *Fresenius Environ. Bull.* **2004**, *13*, 244-250.
- [319] L.-C. Lin, R.-S. Juang, *Chem. Eng. J.* **2005**, *112*, 211-218.
- [320] X. Fu, M. Cebo, T. Ikegami, M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* **2020**, *1609*, 460500.
- [321] R. Lohrmann, *J. Mol. Evol.* **1972**, *1*, 263-269.
- [322] C. U. Lowe, M. W. Rees, R. Markham, *Nature* **1963**, *199*, 219-222.
- [323] M. Gull, M. A. Mojica, F. M. Fernández, D. A. Gaul, T. M. Orlando, *et al.*, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17198.
- [324] M. Gull, A. Omran, T. Feng, M. A. Pasek, *Life* **2020**, *10*, 122.
- [325] S. Saetia, K. R. Liedl, A. H. Eder, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1993**, *23*, 167-176.
- [326] Y. Suwannachot, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1998**, *28*, 79-90.
- [327] P. C. Zhang, W.; Ang, I.L.; Wei, R.; Lam, M.M.T.; Lei, K.M.K.; Poon, T.C.W., *Molecules* **2019**, *24*, 747.
- [328] H. Lioe, R. A. J. O'Hair, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1429-1437.
- [329] P. C. Jocelyn, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 327-331.
- [330] P. Vany, *Electrochemical Series in CRC Handbook of Chemistry and Physics, Vol. 97* (Ed.: D. R. Lide), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, **2016**, 8-24.
- [331] B. M. Rode, A. H. Eder, Y. Yongyai, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *254*, 309-314.
- [332] H. C. Betts, M. N. Puttick, J. W. Clark, T. A. Williams, P. C. J. Donoghue, *et al.*, *Nat. Ecol. Evo.* **2018**, *2*, 1556-1562.
- [333] M. C. Weiss, F. L. Sousa, N. Mrnjavac, S. Neukirchen, M. Roettger, *et al.*, *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16116.
- [334] Y. Sobolevsky, E. N. Trifonov, *J. Mol. Evol.* **2006**, *63*, 622-634.
- [335] Y. Sobolevsky, Z. M. Frenkel, E. N. Trifonov, *J. Mol. Evol.* **2007**, *65*, 640-650.
- [336] Y. Sobolevsky, E. N. Trifonov, *J. Mol. Evol.* **2005**, *61*, 591-596.
- [337] Y. Sobolevsky, R. C. Guimarães, E. N. Trifonov, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2013**, *31*, 1293-1300.
- [338] J. Kofoed, J. Nielsen, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2445-2447.
- [339] H. J. Martin, B. List, *Synlett* **2003**, *2003*, 1901-1902.
- [340] S. B. Tsogoeva, S. B. Jagtap, *Synlett* **2004**, *2004*, 2624-2626.
- [341] W. Zou, I. Ibrahim, P. Dziedzic, H. Sundén, A. Córdova, *Chem. Commun.* **2005**, 4946-4948.
- [342] J. Duschmalé, H. Wennemers, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 1111-1120.
- [343] S. B. Tsogoeva, S. Wei, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1947-1951.

- [344] M. Lei, S. Xia, J. Wang, Z. Ge, T. Cheng, *et al.*, *Chirality* **2010**, *22*, 580-586.
- [345] H. Wennemers, J. S. Möhler, T. Schnitzer, *Chem. - Eur. J.* **2020**, *26*, 15623.
- [346] G. McRae, C. M. Monreal, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2205-2215.
- [347] M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, *1568*, 160-167.
- [348] M. M. Koek, B. Muilwijk, M. J. van der Werf, T. Hankemeier, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1272-1281.
- [349] G. Petersson, *Org. Mass Spectrom.* **1972**, *6*, 565-576.
- [350] S. Dong, P. K. Dasgupta, *Atmos. Environ.* **1986**, *20*, 1635-1637.
- [351] S. Lamour, S. Pallmann, M. Haas, O. Trapp, *Life* **2019**, *9*, 52.
- [352] H. J. Cleaves II, *Precambrian Res.* **2008**, *164*, 111-118.
- [353] H. W. Maurer, J. N. Bemiller, G. V. Smith, *J. Catal.* **1987**, *103*, 239-248.
- [354] F. Sauer, C. Sydow, O. Trapp, *Electrophoresis* **2020**, *41*, 1280-1286.
- [355] K. Grob, *Making and manipulating capillary columns for gas chromatography*, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, **1986**.
- [356] M. Jaroš, V. Hruška, M. Štědrý, I. Zusková, B. Gaš, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3080-3085.